

T0005110

최 종
연구보고서

인체유용 표지유전자를 이용한 바이러스
무병감자의 대량 생산에 관한 연구

Mass Production of Virus Free Potato
Transformed With ADA New Selectable
Marker Gene

연구기관
(주) 바이오피아

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “인체유용 표지유전자를 이용한 바이러스 무병감자의 대량 생산에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002년 11 월 10일

주관연구기관명 :

(주) 바이오피아

총괄연구책임자 :

책임연구원 양덕춘

연 구 원 :

책임연구원 이종철

연 구 원 :

책임연구원 최광태

연 구 원 :

연구원 조미숙

협동연구기관명 :

익산대학교

협동연구책임자 :

교 수 방극수

연 구 원 :

위촉연구원 김지영

연 구 원 :

위촉연구원 정순진

요 약 문

I. 제 목

인체유용 표지유전자를 이용한 바이러스 무병감자의 대량생산

II. 연구개발의 목적 및 필요성

영양번식을 하는 감자는 바이러스에 의한 씨감자의 병리적 퇴화가 생산성에 커다란 영향을 미치므로 씨감자 생산전문기관을 두어 기본종--> 기본식물--> 원원종--> 원종--> 보급종등 5단계의 증식체계를 세워 국가에서 무병씨감자를 생산하여 농가에 보급하고 있으나 종서 보급률이 20-30% 정도밖에 되지 않는다(Lee, 1987). 그러나 기본종을 만들기 위해서 바이러스 무병 기내조직배양묘를 성장점배양에 의해서 획득하고 있지만 성장점배양에 의해서 유도된 조직배양묘일지라도 바이러스에 이미 감염되었거나, 감염될 수 있는 기회가 매우 높다는 것은 이미 알려진 사실이다(Zhuk et al, 1975). 따라서 기내에서 각종 항바이러스제를 사용하여 최초 기본종 생산에 활용하고자 하고 있으나 항바이러스제 자체가 바이러스를 죽일 수 있는 고농도에서는 식물체의 성장도 억제하거나 고사시킴으로 완전하게 바이러스를 제거하기가 매우 어렵다. 예를 들면 식물에서 항바이러스제로 많이 활용하고 있는 ribavirin의 경우 100 μ M 정도를 사용하며 바이러스를 약 70-80% 가량 감소시킬 수 있으나, 이때 식물체의 성장에도 커다란 영향을 미치며, 200 μ M 이상에서는 식물바이러스는 완전히 제거할 수 있으나, 식물체도 전혀 생존하지 못한다(Lerch et al, 1987). 따라서 ribavirin과 같은 항바이러스제에 내성을 갖은 감자 기본종이 개발된다면 고농도의 ribavirin을 처리함으로써 바이러스를 완전히 제거한 후 몇세대(5단계) 동안 키워 씨감자를 생산하는 현 보급단계에서 최소한 씨감자에서는 바이러스가 감염되어 있지 않은 무병감자를 보급할 수 있을 것으로 생각된다.

한편 식물유전공학기술의 발달로 기존의 육종방법에 비해 육종기간이 매우 빠른 식물형질전환기술이 보급되면서 이제는 비교적 쉽게 외부유용유전자를 식물의 핵내에 도입, 발현시킴으로서 새로운 형질전환체를 획득할 수 있게 되

었다. 그러나 식물형질전환체에 대한 인식이 각종 환경단체들에 의해서 부정적인 측면만 거론이 되고 있어 형질전환연구가 매우 어려운 상황에 있으나 각종 환경장애 및 각종 병충해 등의 창궐 등으로 기존의 육종방법에 의해서는 뒤 따라가기가 어렵기 때문에 신기술에 의한 형질전환체의 사용이 불가피하다고 볼 수 있다. 이런 측면에서 형질전환체 선발시 활용되는 표지유전자(marker gene)의 사용이 주로 항생제내성 유전자인 NPT II gene를 사용하기 때문에 이에 대한 거부감이 있는 것으로 보고 되어있으며(Herrera-Estrella et al, 1983), 특히 이 항생제내성 유전자가 자연 포장에서 타 작물로 전이 및 항생제내성유전자가 함유된 식물체를 사람이 먹었을 때 인체내의 대장균내에 전이될 경우 인체가 항생제에 대해서 내성을 보이기 때문에 신체에 이상이 있어 항생제를 복용했을 때 전혀 항생제에 대한 효과가 없을 가능성때문에 계속적으로 토론이 이어지고 있다. 또한 새로운 형질전환체를 계속적으로 개발하기 위해서는 여러 종류의 표지유전자가 절대적으로 필요하며 특히 형질전환된 식물체에 다시 새로운 유전자를 도입하고자 할 때에는 최초로 사용한 표지유전자는 다시 사용할 수 없기 때문에 새로운 표지유전자가 필요하다.

본 연구에서는 식물체에는 전혀 존재하지 않으며 사람등 동물조직에만 존재하는 Adenosine deaminase 유전자를 새로운 표지유전자로 활용하고자 하며, 특히 이 유전자에 의해서 유도된 효소가 사람에게 부족할 때는 면역결핍증이 유발되는 사람에게는 매우 유용한 효소이기도 하기 때문에(Fox et al, 1978; Yeung et al, 1985) 본 유전자에 의해서 감자의 형질전환이 가능하다면 형질전환체의 선발에 표지유전자로써 사용뿐만 아니라 면역결핍증을 예방할 수 있는 새로운 효소를 생산하는 감자를 개발할 수도 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 새로운 표지유전자로 ADA gene의 가능성을 진단하고자 수행하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

가. 인체유용 표지유전자를 이용한 바이러스 무병감자의 개발

- 1) Purine계열의 항바이러스 물질이 감자의 생장에 미치는 영향조사
- 2) ADA 유전자를 표지유전자로 이용한 감자의 형질전환 및 형질전환율의 증대
- 3) RT-PCR에 의한 감자 바이러스 진단방법의 확립
- 4) ADA gene를 표지유전자로 하는 식물형질전환용 binary vector에 재조

합 및 확인

- 가) ADA 유전자의 식물세포 발현용 vector에 재조합
 - 나) Cassette vector의 식물형질전환용 binary vector에 재조합
 - 다) *Agrobacterium*에 binary vector의 도입 및 확인
- 5) 새로운 표지유전자와 유용내성유전자가 재조합된 binary vector에 의한 감자의 형질전환
- 가) 감자에 재조합 유전자의 형질전환 및 발현여부 확인
 - 나) 새로운 형질전환체 확인방법 개발
 - (1) Tuber-specific promoter를 이용한 binary vector의 재조합 및 감자의 형질전환
 - (2) 고농도의 항바이러스물질에서 형질전환체의 생존여부 확인
 - (3) 감자바이러스의 인공 기내감염 후 고농도의 항바이러스물질 처리 후 형질전환 감자에서 RT-PCR에 의한 바이러스 감염여부조사
 - 다) ADA유전자 함유 감자와 정상 감자에 바이러스의 감염
 - (1) 정상감자잎, 사람 ADA 유전자가 함유된 형질전환 감자잎 바이러스를 감염시킨후 1개월 배양 후에 감염여부 조사.
 - (2) 각종 식물체의 바이러스감염율을 RT-PCR에 의해서 확인
 - 라) Ribavirin처리에 의해서 바이러스제거 가능성의 조사
- 나. 인체유용 표지유전자를 이용한 바이러스 무병감자의 대량증식 및 포장검정
- 1) 형질전환 유식물체의 포장재배 및 수량성 조사
 - 가) 감자 형질전환체 기내 뿌리의 유도 및 순화처리
 - 나) 토양활착정도의 증대방법 구명
 - 다) 감자 형질전환체의 바이러스 내성 포장조사
 - 라) RT-PCR에 의한 바이러스 감염정도 조사
 - 2) Tank배양의 기술확립과 실용화 및 유묘의 대량생산 공정개발
 - 가) 유식물체의 tank 내에서의 생육최적조건 확립
 - 나) 유묘의 경삼방법 및 발근 조건확립
 - 다) 유묘를 이용한 pot재배 및 피경생산 방법확립
 - 3) 형질전환체의 포장적용 시험
 - 가) 바이러스 내성시험
 - 나) 생육조사

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 항바이러스 물질(purin계열)이 감자의 생장에 미치는 영향조사

식물에서 사용가능한 항바이러스제는 purine계 물질인 ribavirin을 위시하여 vidarabine, Ara-A, deoxyadenosine, cordycepin, Xyl-A등이 가능할 것으로 사료된다. 따라서 우선 이런 물질을 항바이러스제 뿐만아니라 형질전환체 선발물질로 사용가능성을 조사하기 위해서 정상식물체서 고사하는 농도를 조사하였던 바, 역시 항바이러스에 따라서 그 농도를 다른 것을 나타내었으며 고농도에서는 정상 식물체를 모두 고사시켰으므로 항바이러스제뿐만 아니라 선발물질로 사용이 가능함을 나타내었다.

나. ADA gene를 표지유전자로 하는 새로운 식물형질전환용 binary vector의 재조합 및 확인

항바이러스제를 형질전환체 선발물질로 사용이 가능하므로 사용될 ADA 유전자를 도입하여 새로운 식물체를 만들기 위해서 ADA gene를 식물형질전환용 binary vector에 재조합하였다. 성공적으로 ADA 유전자가 식물세포 발현용 vector에 재조합, 및 식물형질전환용 binary vector에 재조합됨을 확인하였으며, *Agrobacterium*에 성공적으로 도입되었음을 확인할 수 있었다.

다. 새로운 표지유전자를 이용한 형질전환체 선발 및 형질전환율의 증대 방법조사

독성 adenosine 유도체(항바이러스제)는 가격이 매우 비싸기 때문에 본 연구에서 개발된 ADA 새로운 표지유전자로 사용하기 위해서는 값싼 deoxyadenosine과 혼합하여 선발 agent로 사용할 필요가 있다. 따라서 상호혼합하여 값이 약간 저렴한 선발물질을 확인할 수 있었다.

Phosphinothricin의 활용가능성과 ADA 효소의 inhibitor인 deoxycoformycin의 역할 조사하여 쉽게 선발체를 확인할 수 있는 방법을 개발하였다.

라. RT-PCR에 의한 감자 바이러스 진단방법의 확립

감자바이러스를 효율적으로 진단하기 위해서 항체를 이용한 바이러스 진단방법보다 약 1000배가량 감도가 높은 RT-PCR를 이용하여 바이러스를 진단하기 위해서 primer를 제작하였으며, 바이러스간에 변이주가 많아 거의 대부분 진단할수 있는 방법을 개발하였으며 감자바이러스 RT-PCR를 위한 효소반응액을 구명하였고, 또한 RT-PCR을 위한 PCR 최적조건을 구명하여 성공적으로 한국 토양내에 있는 바이러스를 RT-PCR에 의해서 확인할 수 있었다.

마. ADA 유전자의 감자에서 발현 및 새로운 detection 방법의 개발

ADA유전자가 표지유전자로 활용이 가능하다면 쉽게 확인할 수 있는 방법이 필요하다. 현재 사용되고 있는 kanamycin의 경우에는 선발 marker는 가능하지만 report marker는 아니다. 반면 GUS의 경우는 쉽게 눈으로 확인할 수 있는 report marker이지만 형질전환체를 획득할 수 있는 선발 marker는 아니다. 그러나 ADA 표지유전자는 어찌는 선발(selection marker) 유전자뿐만아니라 reporter로써도 사용이 가능할 것으로 생각된다. 따라서 ADA 표지유전자를 사용할 경우 효과적으로 선발도 가능하지만 쉽게 눈으로 볼 수 있는 방법을 개발하였다.

바. 감자 유식물의 기내 대량번식과 생육조건 확립

형질전환체가 개발되면 대량으로 생산하여 농민들에게 공급해야하므로 기내 대량배양시스템을 확립하고자 하였다. 따라서 15리터 탱크배양시스템을 개발하여 대량으로 줄기를 생산하고 직접 토양에 삽목하여 발근 시킨후 씨감자를 생산할 수 있는 방법을 개발하였다.

사. 기내의 무병건전주의 경삽방법 개발

기내배양 감자의 토양에서 효과적인 뿌리의 유도를 위해서 순화처리, 토양활착정도의 증대방법을 구명하였으며 mircotuber 생산방법보다 이 방법을 사용할 경우 더 값싸게 종서를 생산할 수 있을것으로 사료된다.

2. 활용에 대한 건의

- 가. 현재 성장점배양에 의하여 유도된 기내 감자 유식물체에서 바이러스 무병주로 씨감자를 생산하여 공급하고 있으나 실제로는 기내 배양묘에서 이미 바이러스가 증식되고 있는 경우가 매우 많다. 그러나 본 연구결과 개발된 바이러스 무병감자는 확실하게 바이러스를 제거한 감자이기 때문에 씨감자로 대량생산하여 공급함으로써 생산성을 증대시킬 수 있을 것이다.
- 나. 새로운 표지유전자로 ADA 유전자로 활용할 수 있어 식물세포의 형질전환시 사용된 항생제 표지유전자를 대체할 수 있어 형질전환체사용에 대한 거부감을 완화시킬 수 있을 것이다.
- 다. 본 연구결과 바이러스 무병주를 생산하는 방법을 활용하여 조직배양묘로 판매되고 있는 각종 화훼류(카네이션, 장미, 난?) 등에서도 본 방법을 활용할 수 있을 것이다.
- 라. 감자의 tank배양 기술과 유묘의 생산공정 기술개발은 우량종서의 생산확대와 우량종서의 자가 채종으로 종서보급율에 많은 영향을 미칠뿐만아니라 기내삽목에 의하여 기내번식하는 타작물에도 이용할 수 있는 모델 시스템으로서 본 연구는 매우 유용할 것으로 기대된다.
- 마. 핵심 기술로 부각되고 있고 물질특허, UR, 등 생물자원의 산업무기화 되고 있으므로 국가 경쟁력 제고에 기여할 자원으로도 활용될 것이다.
- 바. 현재 RT-PCR에 의하여 바이러스 진단방법은 믹스식으로 진단 kit를 만들어 실제 포장에서 사용하고 있다(방극수 교수 활용함).
- 사. 현재 GMO에 대한 관심이 고조되고 있어 본 연구결과 새로운 표지유전자가 개발되면 GMO에 대한 인식이 상당히 희석될것으로 생각된다.

SUMMARY

I. Title of the Study

Mass Production of Virus Free Potato transformed With ADA New Selectable Marker Gene

II. Objectives of the Study

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is a major food source in many parts of the world. In Korea, potato is the major horticultural crop, however its production faces several problems due to diseases, pests and chilling injury. In early spring, young potato seedlings are frequently damaged by frost, so not only production has decreased but also quality has deteriorated. For this reason much efforts have been devoted to the breeding of cold resistant potato cultivar. However, potato cultivars, in general, are highly heterozygotes which show significant difficulties to breeding programs. Recently, the introduction of foreign genes into potato by genetic engineering methods such as *Agrobacterium* mediated gene transfer has become possible.

The aim of our study was to develop virus free potato cultivar by using gene manipulation technology. Therefore, we have tried to introduce ADA and PLRV CP genes into the potato genome by using leaf disc transformation mediated by *A. tumefaciens* MP90. PCR analysis of both ADA and CP genes, and northern blot analysis ADA activity assay were carried out to confirm successful integration and expression of the gene in transgenic potato plants.

III. The Scope of the Study

A. Development of virus free potato using ADA selectable marker gene

- 1) The effect of purine compound on the inhibition to the growth of potato.
- 2) Transformation of potato using ADA marker gene
- 3) Diagnosis of potato virus using RT-PCR method
- 4) Construction of binary vector system with ADA gene as selectable marker
 - (A) Recombination of cassette vector for expression of ADA gene in the potato
 - (B) Recombination of binary vector for transformation to the potato
 - (C) Introduction and confirm of binary vector system to the *Agrobacterium*
- 5) Transformation of potato using new selectable marker and anti-virus relative gene
 - (A) Transformation of potato using binary vector with ADA marker and CP genes
 - (B) New method for confirm of transgenic plant
 - (C) Production of virus free potato stock on the medium with ribavirin

B. Mass production and field test of virus free potato introduced ADA new selectable marker gene

- 1) Field culture and yield test of transgenic potato plant
 - (A) *In vitro* rooting test and accumulation of transgenic potato
 - ㄱ) Development of accumulation of transgenic potato
 - ㄴ) Field test of virus free transgenic potato
 - ㄷ) Diagnosis of transgenic plant using RT-PCR method
- 2) Tank system for mass processing of transgenic potato cultured *in vitro*
 - 가) Optimum culture method for tank system of transgenic potato
 - ㄴ) Condition for stem cutting and rooting of transgenic potato
 - ㄷ) Pot culture method in field and production of potato tuber

IV. Results and Possible Application of the Study

A. The effects of antiviral compounds(purine type magterials) on the inhibition of growth of potato

The development of selectable markers for transformation has been a major factor in the successful genetic manipulation of plant. We established a new selectable marker system for potato transformation using chimeric adenosine deaminase(ADA) gene, which confers resistance to cytotoxic adenosine analogues, vidarabine, deoxyadenosine, Xyl-A 9- β -D-arabinofuranosyl adenine(Ara-A) and cordycepin, and these compounds were used as antiviral agents.

B. Recombination and confirm of binary vector containing with ADA gene for plant transformation

We have established an efficient selection method for transgenic potato using the chimeric adenosine deaminase (E.C.3.5.4.4, ADA) gene. Leaf disc explants were infected with *Agrobacterium tumefaciens* pCP-ADA containing mammalian ADA cDNA constructs, consisting of double CaMV 35S promoter as binary type plant transformation vector were evaluated.

C. Selection of transgenic plant and enlargement of transformation ratio of potato using new selectable ADA marker

We used cheap deoxyadenosine as selectable agent in replace of expensive purine agents for using of ADA new selectable marker.

D. Establishment of diagnosis for potato virus by RT-PCR

We established virus diagnosis method using RT-PCR, which is more effectible than antibody test for virus check. For this, we made broad RT-PCR primer and optimum condition for reaction solution and PCR methods. Now, it is possible for check of virus using RT-PCR.

E. Development of new detection method for confirm of expression of ADA gene into potato

A lot of transgenic plants were obtained by checking of color change. The transgenic plants emitted an intense blue color as compared to wild type plant. Color change indicated that the gene coding for the ADA enzyme was integrated in the potato genome and could be expressed in potato tissue. Incorporation of the ADA gene into potato plants was confirmed by PCR analysis of DNA. Enzyme activity is very different among transgenic lines as judged by spectrophotometric measurement. Activity of ADA in these transgenic plants was inhibited by deoxycoformycin, an inhibitor of adenosine deaminase. These results demonstrate that the mammalian ADA gene is successfully expressed in potato transgenic plant, and can be used as selectable marker for transformation of potato.

F. Development of optimum method for mass production and growth condition of potato *in vitro* culture

we developed new mass culture method using small size reactor system(15L) for supply to the farmer with cheap price. So, a lot of virus free stock of potato stems were grown into the 15L reactor system, and then, plantlets were transferred to the soil directly. we could get many potato microtubers after rooting from stem of plantlet.

G. Development of stem cutting method of *in vitro* virus free potato stock

We developed the good methods of accumulation and adaptation to the soil for inducing roots. For production of potato minituber cheaply, these methods of stem cutting were more effective than making the microtuber *in vitro*.

CONTENTS

Chapter 1. Synopsis of this study

Chapter 2. State of the art

Chapter 3. Experimental schemes and the results of this study

3-1. Development of virus free potato using ADA selectable marker gene

3-2. Mass production and field test of virus free potato introduced ADA new selectable marker gene

Chapter 4. Achievement of the goals and contribution

Chapter 5. Plans for application of the results

Chapter 6. Information gathered during this study

Chapter 7. References

목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
 - 제 1 절 연구개발의 목적
 - 제 2 절 연구개발의 필요성
 - 제 3 절 연구개발의 범위

- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
 - 제 1 절 국내기술의 현황
 - 제 2 절 외국기술의 현황
 - 제 3 절 앞으로 전망
 - 제 4 절 기술도입의 타당성

- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
 - 제 1 절 연구추진전략
 - 제 2 절 연구개발 내용
 - 제 3 절 연구수행 결과

- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
 - 제 1 절 연구개발 목표의 달성도
 - 제 2 절 관련분야에 기여도

- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 제 7 장 참고문헌

List of Tables and Figures

- Table 1. The effects of phytohormone on the shoot regeneration from Atlantic leaf and stem of *Solanum tuberosum* L. in the MS medium with IBA 0.1mg/L.
- Table 2. The effects of AgNO₃ and PVP on the shoot regeneration from leaves and stems of various *Solanum tuberosum* L. in the MS medium with IBA 0.1mg/L and BA 0.5 mg/L.
- Table 3. The effect of Ara-A(A), Cordycepin(B) and Xyl-A(C) on the growth of stem derived from *Solanum tuberosum* L. Desiree.
- Table 4. The effect of Ara-A(A), Cordycepin(B) and Xyl-A(C) on the growth of stem derived from *solanum tuberosum* L. Superior.
- Table 5. The effect of Ribavirin on the growth of stem derived from *solanum tuberosum* L. Superior and Desiree.
- Table 6. Tri-parental mating for conjugants of *Agrobacterium* with CP and ADA genes.
- Table 7. Comparison of susceptibility with wild type strains of *Agrobacterium spp.* of the different potato varieties.
- Table 8. Characteristics of hairy roots derived from *Solanum tuberosum*.
- Table 9. Effect of 2, 4-D treatment on the formation of hairy root from various *S. tuberosum* according to infection of *Agrobacterium spp.*
- Table 10. Effect of pre-culture period on the putative transgenic shoot formation of *Solanum tuberosum*.
- Table 11. Effect of co-culture methods on the putative transgenic shoot formation of *Solanum tuberosum*.
- Table 12. Effect of antibiotics on the inhibition of growth in *Agrobacterium tumefaciens* MP90.
- Table 13. Growth of *Agrobacterium* co-cultured with leaf and stem explant according to cultural day.
- Table 14. Adenosine deaminase activity of wild type and transgenic potato plant according to extraction buffer pH, reaction time and reaction temperature by spectrophotometer.

Table 15. Spectrophotometric measurement of ADA activity in transgenic potato plants.

Table 16. Effects of culture media on the rooting during induction of rooted cutting of *Solanum tuberosum*.

Table 17. Effects of cutting parts on the rooting and yield at artificial soil.

Table 18. Effects of seedling heights on the tuber production of *Solanum tuberosum*.

Table 19. Results of geophonics of rooted cutting of of *Solanum tuberosum*.

Fig. 1. The effects of concentration of MS media and sucrose on the growth of stem explants(*Solanum tuberosum* L.) on the suspension media.

Fig. 2. The effects of concentration of ascorbic acid and sucrose on the growth of stem explants(*Solanum tuberosum* L.) on the suspension media.

Fig. 3. The effects of concentration of IBA on the growth of stem explants(*Solanum tuberosum* L.) on the suspension media.

Fig. 4. PCR products of PLRV coat protein gene using RT-PCR technology.

Fig. 5. Check of PLRV in the leaf derived from tissue culture using RT-PCR technology. Any band is not detected in the tissue extract.

Fig. 6. Recombination of ADA for expression into potato. Digestion of pADA5-29(upper) with Nco1 and EcoRV(A), and isolation of 1.3kb fragment with ADA gene(B). and selection of ligate (5 kb, arrow) with cassette vector (3.7kb) inserted ADA gene (C).

Fig. 7. Isolation of PLRV coat protein gene from infected potato.

Fig. 8. Recombination of patatin promoter and ADA and PLRV CP gene for expression into potato.

- Fig. 9. Recombination of binary vector using patatin promoter and ADA and PLRV CP genes for transformation into potato.
- Fig. 10. Co-culture of *Agrobacterium* with potato leaf discs and stems.
- Fig. 11. Effect of acetosyringone(100 μ M) on the frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation in potato.
- Fig. 12. Color change according to various condition of potato transformant on the plate.
- Fig. 13. Typical calibration curve of the incubation time on activity of adenosine deaminase of transgenic potato plant.
- Fig. 14. Optimum condition for extraction (A) and assay (B) for determination of adenosine deaminase activity by spectrophotometer from transgenic and normal plants in *Solanum tuberosum*.
- Fig. 15. Native-PAGE (15%) separation, and activity determination of mouse ADA expressed in potato. Lanes were loaded with samples from isoenzyme (Sigma type V) of bovine spleen (A), wild type (B) and transgenic potato (C) that had been preprocessed by ammonium sulfate (AS) precipitation and Mono Q (MQ) chromatography.
- Fig. 16. The effect of deoxycoformycin for inhibition of ADA gene in transgenic and control potato calli
- Fig. 17. Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products of the adenosine deaminase gene in transgenic (T) and nontransgenic (N) potato plants.
- Fig. 19. Transgenic potato shoot with ADA gene introduced grown on the regenerative media(A), Mature transgenic potato plants grown in soil (B).
- Fig. 20. Confirm of PLRV virus(upper) and check of PLRV from potato transgenic plant cultured on the Ribavirin contained media(bellow).
- Fig. 21. Bioreactor for potato shoot culture. Old system(A) is difficult for harvest of cultured shoots, however new system(B) is good for harvest.
- Fig. 22. From *in vitro*(A) to the soil(B-D) of transgenic potatoes. Trans-

genic potato plantlet cultured in the container *in vitro*(A) and transfer to the soil(B), after 15days planting(C) and stem cutting in the pots(D).

Fig. 23. Effects of mixed treatment of Disen M-45 and rare earth on the plant height and rooting of Daejima of *Solanum tuberosum*.

Treatment : 1. Disen M-45 0.2mg/l

2. Disen M-45 0.2mg/l + Rare earth 0.2mg/l

3. Disen M-45 0.2mg/l + Rare earth 0.6mg/l

4. Disen M-45 0.2mg/l + Rare earth 1.0mg/l

5. Disen M-45 0.2mg/l + Rare earth 1.4mg/l

6. Disen M-45 0.2mg/l + Rare earth 1.8mg/l

7. Disen M-45 0.2mg/l + Rare earth 2.0mg/l

Fig. 24. Effects of mixed treatment of NAA and BAP on the formation and enlargement of tuber.

Fig. 25. Transgenic plantlets cultured in flower bed of *in vitro* potatoes (upper) and mature potatoes using stem cutting method(lower).

Fig. 26. Transgenic potatoes into ADA gene.

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

감자에서 가장 문제가 되고 있는 바이러스 무병주를 대량생산하기 위해서 인체유용표지유전자로 활용가능한 ADA유전자를 이용하여 감자의 형질전환을 유도하고 이를 대량배양할 수 있는 시스템과 토양에 활착시킬수 있는 방법을 개발하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

영양변식을 하는 감자는 바이러스에 의한 씨감자의 병리적 퇴화가 생산성에 커다란 영향을 미치므로 씨감자 생산전문기관을 두어 기본종--> 기본식물--> 원원종--> 원종--> 보급종등 5단계의 증식체계를 세워 국가에서 무병씨감자를 생산하여 농가에 보급하고 있으나 종서 보급률이 20-30% 정도밖에 되지 않는다(Lee, 1987). 그러나 기본종을 만들기 위해서 바이러스 무병 기내조직배양묘를 성장점배양에 의해서 획득하고 있지만 성장점배양에 의해서 유도된 조직배양묘일지라도 바이러스에 이미 감염되었거나, 감염될 수 있는 기회가 매우 높다는 것은 이미 알려진 사실이다(Zhuk et al, 1975). 따라서 기내에서 각종 항바이러스제를 사용하여 최초 기본종 생산에 활용하고자 하고 있으나 항바이러스제 자체가 바이러스를 죽일 수 있는 고농도에서는 식물체의 생장도 억제하거나 고사시킴으로 완전하게 바이러스를 제거하기가 매우 어렵다. 예를 들면 식물에서 항바이러스제로 많이 활용하고 있는 ribavirin(1-β-D-Ribofuranosyl -1,2,4-triazole-3-carboxamide)의 경우 100μM 정도를 사용하며 바이러스를 약 70-80% 가량 감소시킬 수 있으나, 이때 식물체의 생장에도 커다란 영향을 미치며, 200 μM 이상에서는 식물바이러스는 완전히 제거할 수 있으나, 식물체도 전혀 생존하지 못한다(Lerch et al, 1987). 따라서 ribavirin과 같은 항바이러스제에 내성을 갖은 감자 기본종이 개발된다면 고농도의 ribavirin을 처리함으로써 바이러스를 완전히 제거한 후 몇세대(5단계) 동안 키워 씨감자를 생산하는 현 보급단계에서 최소한 씨감자에서는 바이러스가

감염되어 있지 않은 무병감자를 보급할 수 있을 것으로 생각된다. 한편 식물유전공학기술의 발달로 기존의 육종방법에 비해 육종기간이 매우 빠른 식물형질 전환기술이 보급되면서 이제는 비교적 쉽게 외부유용유전자를 식물의 핵내에 도입, 발현시킴으로서 새로운 형질전환체를 획득할 수 있게 되었다(An, 1987; Bevan, 1984; Hoekema et al, 1983). 그러나 식물형질전환체에 대한 인식이 각종 환경단체들에 의해서 부정적인 측면만 거론이 되고 있어 형질전환연구가 매우 어려운 상황에 있으나 각종 환경장애 및 각종 병충해 등의 창궐 등으로 기존의 육종방법에 의해서는 뒤 따라가기 어렵기 때문에 신기술에 의한 형질전환체의 사용이 불가피하다고 볼 수 있다. 이런 측면에서 형질전환체 선발시 활용되는 표지유전자(marker gene)의 사용이 주로 항생제내성 유전자인 NPT II gene를 사용하기 때문에 이에 대한 거부감이 있는 것으로 보고 되어 있으며(Herrera-Estrella et al, 1983), 특히 이 항생제내성 유전자가 자연 포장에서 타 작물로 전이 및 항생제내성유전자가 함유된 식물체를 사람이 먹었을 때 인체내에서 발생할 수 있는 가정(즉 항생제내성유전자가 완전히 파괴되지 않고 인체내의 대장균내에 전이될 경우 인체가 항생제에 대해서 내성을 보이기 때문에 신체에 이상이 있어 항생제를 복용했을 때 전혀 항생제에 대한 효과가 없음, 그러나 이런 가능성은 거의 없을 것으로 사료되지만 이에 대한 논의는 계속되고 있음) 때문에 계속적으로 토론이 이어지고 있다. 또한 새로운 형질전환체를 계속적으로 개발하기 위해서는 여러 종류의 표지유전자가 절대적으로 필요하며 특히 형질전환된 식물체에 다시 새로운 유전자를 도입하고자 할 때에는 최초로 사용한 표지유전자는 다시는 사용할 수 없기 때문에 새로운 표지유전자가 필요하다.

본 연구에서는 식물체에는 전혀 존재하지 않으며 사람등 동물조직에만 존재하는 Adenosine deaminase 유전자를 새로운 표지유전자로 활용하고자 하며 (Yang et al, 1995). 특히 이 유전자에 의해서 유도된 효소가 사람에게 부족할 때는 면역결핍증이 유발되는 사람에게는 매우 유용한 효소이기도 하기 때문에 (Fox et al, 1978; Yeung et al, 1985) 본 유전자에 의해서 감자의 형질전환이 가능하다면 형질전환체의 선발에 표지유전자로써 사용뿐만 아니라 면역결핍증을 예방할 수 있는 새로운 효소를 생산하는 감자를 개발할 수도 있을 것이다. Adenosine deaminase(E.C.3.5.4.4)는 adenosine를 inosine으로 변환시키는 purine대사에 관여하는 효소로서 식물세포의 조직배양시 adenosine 대신 독성 adenosine유도체(ribavirin, vidarabine등 항바이러스물질등)가 첨가되면 ADA

효소가 없기 때문에 adenosine kinase에 의해서 AMP가 되면서 cyclic AMP에서 독성을 나타내서 식물체가 고사하게 된다(Yeung et al. 1983). 그러나 만약 식물세포가 ADA효소를 가지고 있다면 독성 adenosine를 무독성인 inosine으로 변환시킴으로써 독성을 제거하게 된다. 또한 연초에서 예비실험결과 inosine이 많아도 식물체는 생장에 전혀 영향이 없으며 오히려 분화가 잘되는 경향을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 새로운 표지유전자(ADA gene, 사람에게서 면역결핍을 예방할 수 있는 유전자)로 사용가능성이 본 연구진에 의해서 이미 보고 되었으며, 특허를 이미 획득한 바 있기 때문에 본 표지유전자를 활용하여 면역예방할 수 있는 adenosine deaminase효소를 생산하는 새로운 감자를 개발하고자 하며, 특히 표지유전자로 사용하는 ADA 유전자는 항바이러스 물질인 ribavirin(독성 adenosine 유도체)에 대해서 내성을 나타내는 유전자이기 때문에 고농도의 ribavirin에 의해서도 생존이 가능하므로 영양번식작물에서 문제가 되고 있는 바이러스를 완전히 제거할 수 있는 일석이조 - 즉 표지유전자 및 항바이러스 물질에 대한 내성을 동시에 활용할 수 있다.

또한 최근 UR, GR등에 따라 농업자원의 보호 및 경쟁력 강화가 국가적으로 매우 중요한 문제로 대두되고 있는 바, 생산비 절감 및 고부가가치 농작물의 개발이 요구되고 있다. 감자는 세계 4대 주요 주식작물로서 각종 영양분을 골고루 함유하고있는 주요한 알칼리성 식품으로 전세계적으로 그 수요가 날로 증가하고 있다. 그러나 국내에서는 좁은 경지면적과 안정적으로 우수한 씨감자의 보급이 원활치 못해 다소 그 생산면에서 다른 나라에 비해 떨어지고 있는 실정이다(Choi et al, 1997). 따라서 바이러스 무병주의 우수한 씨감자를 안정적으로 공급할 수 있다면 경제적인 면에서 농가에 많은 도움이 될것으로 사료된다. 특히 인체에서 면역결핍증을 예방할 수 있는 adenosine deaminase 효소를 생산할 수 있는 바이러스 무병감자가 대량으로 생산될 수 있는 체계가 확보된다면 산업적으로 활용도가 넓어질 것이다. 또한 생물공학 기술은 최근 차세대 농업 육성 및 의료 복지등 미래산업의 핵심 기술로 부각되고 있고 물질특허, UR, 등 생물자원이 산업무기화되는 경향으로 인해 선진각국의 기술개발 노력 및 기술 보호 강화 추세가 지속되고 있어 국내에서도 이에 대한 대책 마련에 부심 하는 시점에서 국내 유용 유전자원의 확보 차원에서도 본 연구에서 수행하고자 하는 내용이 대단히 중요한 가치를 갖는다고 사료된다.

제 3 절 연구개발의 범위

가. 인체유용 표지유전자를 이용한 바이러스 무병감자의 개발

- 1) Purine계열의 항바이러스 물질이 감자의 생장에 미치는 영향조사
- 2) ADA 유전자를 표지유전자로 이용한 감자의 형질전환 및 형질전환율의 증대
- 3) RT-PCR에 의한 감자 바이러스 진단방법의 확립
- 4) ADA gene를 표지유전자로 하는 식물형질전환용 binary vector에 재조합 및 확인

가) ADA 유전자의 식물세포 발현용 vector에 재조합

나) Cassette vector의 식물형질전환용 binary vector에 재조합

다) *Agrobacterium*에 binary vector의 도입 및 확인

- 5) 새로운 표지유전자와 유용내성유전자가 재조합된 binary vector에 의한 감자의 형질전환

가) 감자에 재조합 유전자의 형질전환 및 발현여부 확인

나) 새로운 형질전환체 확인방법 개발

(1) Tuber-specific promoter를 이용한 binary vector의 재조합 및 감자의 형질전환

(2) 고농도의 항바이러스물질에서 형질전환체의 생존여부 확인

(3) 감자바이러스의 인공 기내 감염 후 고농도의 항바이러스물질 처리 후 형질전환 감자에서 RT-PCR에 의한 바이러스 감염여부조사

다) ADA유전자 함유 감자와 정상 감자에 바이러스의 감염

(1) 정상감자잎, 사람 ADA 유전자가 함유된 형질전환 감자잎 바이러

스를 감염시킨후 1개월 배양 후에 감염여부 조사.

(2) 각종 식물체의 바이러스감염율을 RT-PCR에 의해서 확인

라) Ribavirin처리에 의해서 바이러스제거 가능성의 조사

나. 인체유용 표지유전자를 이용한 바이러스 무병감자의 대량증식 및 포장검정

1) 형질전환 유식물체의 포장재배 및 수량성 조사

가) 감자 형질전환체 기내 뿌리의 유도 및 순화처리

나) 토양활착정도의 증대방법 구명

다) 감자 형질전환체의 바이러스 내성 포장조사

라) RT-PCR에 의한 바이러스 감염정도 조사

2) Tank배양의 기술확립과 실용화 및 유묘의 대량생산 공정개발

가) 유식물체의 tank 내에서의 생육최적조건 확립

나) 유묘의 경삽방법 및 발근 조건확립

다) 유묘를 이용한 pot재배 및 괴경생산 방법확립

3) 형질전환체의 포장적응 시험

가) 바이러스 내성시험

나) 생육조사

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내기술의 현황

본 연구는 국내외를 막론하고 전혀 식물에서는 연구되어 있지 않으며 본 연구팀에 의해서 표지유전자로 사용될 동물유전자인 ADA gene이 식물세포에서 성공적으로 발현됨이 최초로 연구되었으며, 이미 연초, 인삼, 감자, 고추 등에서 훌륭하게 발현됨을 확인한 바 있다(Yang et al, 1995; Yang et al, 1996; Choi et al, 1996; Yang et al, 1997). 다만 형질전환율이 비교적 낮은 점이 단점이지만 본 연구가 진행된다면 형질전환율을 증대될 수 있을 것이다. 형질전환감자의 대량증식의 경우에는 국내에서 농촌진흥청의 고령지시험장과 각 지역의 농업기술센터 등에서 우량묘의 대량번식과 이를 활용한 수경재배의 기술을 개발하여 우량종서를 대량으로 생산하는 기술을 확립하여 이에 따른 경쟁력을 확보하고 있다. 그러나 유식물체의 기내급속증식과 이를 활용한 유묘의 대량번식의 기술은 거의 이루어지고 있지 않다.

제 2 절 외국기술의 현황

본 연구는 새로운 표지유전자에 의해서 형질전환가능성을 조사하는데 그 목적이 있고, 특히 항바이러스 제재인 purine계열의 물질에 내성여부를 조사하는 연구로 이 분야에 대해서는 전세계적으로 연구가 전무한 상태이다. 감자 형질전환체의 대량증식의 경우에는 지금까지 백합등 주로 인편 번식하는 영양작물의 증식방법으로 생물공정 system을 개발하는 연구가 진행되고 있으며, 감자 등의 작물에 대하여는 새로운 증식의 체계보다는 기내 인공씨감자에 의존하고 있다. 그러나 인공씨감자의 기내생산의 경우는 유식물체의 기내증식의 단계와 인공씨감자의 생산단계, 생산된 인공씨감자의 휴면타과의 기간등 공정히 번거롭고 생산에 필요한 소요기간이 길기 때문에 경제성을 고려해야 할 것으로 사료된다.

제 3 절 앞으로 전망

형질전환체의 사용에 대한 논의가 계속될 경우 새로운 표지유전자에 대한 연구가 가속화될 것으로 사료되는 바, 기존에 사용한 항생제 kanamycin에 내성 유전자인 NPT II gene의 사용을 억제하고 사람에게는 없어서는 안되는 효소 즉 - adenosine deaminase 유전자를 이용하여 선발표지유전자로 활용할 수 있을 경우 그 파장효과는 매우 클 것으로 사료된다. 특히 adenosine deaminase 유전자는 사람에게 부족시 면역결핍증을 유발하는 효소로서 사람에게는 절대적으로 필요한 유전자이다. 따라서 이미 식물에서 발현되면 효소의 생산이 가능함을 확인한 바, 있기 때문에 본 연구의 성공가능성은 매우 높다. 또한 adenosine deaminase는 항바이러스 물질인 ribavirin에 대해서 내성을 보임으로 기내 형질전환 감자에서 바이러스 무병주를 성공적으로 획득할 수 있어 실용화 될 수 있는 전망이 매우 높다고 할 수 있다. 형질전환체의 대량증식 연구는 최소의 생산비를 투자하여 단기간에 대량의 우량 농산물을 생산하여 적지적소에 공급하여 이에 따른 농가의 소득을 창출케 하는 우량종묘의 생산 system이 절실하게 요구될 것으로 사료되고, 이와 관련된 일련의 일들이 plug 묘 생산공급과 생물공정 system 개발인데 감자의 부분에서도 금후에 이러한 생물공정 system이 개발되어 단기간에 필요한 품종을 적지적소에 공급할 수 있을 것으로 생각된다. 생물공학을 이용한 우량형질의 식물을 단기간에 대량 번식하여 이를 농가에 활용하게 하는 기술은 새로운 품종의 기술개발과 더불어 아주 중요하다.

제 4 절 기술도입의 타당성

생물공학 분야는 기술자체를 국가 자원으로 인식하는 추세에 있으므로 선진각국의 보호정책으로 인하여 기술도입이 어렵고 특히 본 연구는 본 연구팀에서 최초로 보고되었으며 또한 특허도 획득되었기 때문에 외국에서는 연구가 수행되지 않아서 유전자 조작 기술 및 형질전환기술등이 확립되지 못한 상태이므로 반드시 독자적으로 개발하여야만 한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구추진전략

제1차년도에는 식물에서 항바이러스제로 사용되고 있는 각종 purine계열의 물질을 이용하여 감자의 생장에 미치는 영향을 조사하고, ADA gene를 표지 유전자로 하는 새로운 식물형질전환용 binary vector의 재조합 및 확인한 후 새로운 표지유전자를 이용한 형질전환체 선발 및 형질전환율의 증대방법을 조사하였다. 또한 ADA 유전자의 감자에서 발현 및 새로운 detection 방법을 개발하고, RT-PCR에 의한 감자 바이러스 진단방법의 확립하여 2차년도에 바이러스 무병주를 확인할 때 사용하였다. 형질전환체 대량번식 연구에서는 감자 유식물의 기내 대량번식과 생육조건을 확립하고 경삽절편의 토양 적응성 및 발근정도를 조사하였다. 제2차년도에는 1차년도에 유도한 ADA 유전자가 도입된 감자로부터 형질전환체에 도입된 유전자의 발현여부를 각각 확인하고, 또한 고농도의 항바이러스 물질에서 생존여부를 조사하여 실제 포장에서 활용가능성을 확인하였다. 또한 형질전환체와 정상감자유식물체에 감자바이러스의 인공 기내 감염시킨 후 고농도의 항바이러스물질을 처리하여 바이러스를 제거한 후 형질전환 감자에서 RT-PCR에 의한 바이러스 감염여부를 조사하였다. 이미 예비실험에서 ADA 도입 형질전환체의 경우에는 자체 바이러스 내성 가능성이 있었으므로 형질전환감자에서 바이러스내성여부도 함께 조사한다. 형질전환체 대량증식 연구에서는 tank 배양에 의한 증식방법을 강구하고 유묘를 이용한 pot 재배 및 괴경생산방법을 확립하였다. 제3차년도에는 adenosine deaminase를 다량 생산하며 바이러스 무병력을 동시에 가진 감자유식물체를 기내에서 생산하고 아울러 포장에서 성장하고 있는 형질전환체의 바이러스 감염여부를 조사한다. 또한 형질전환체의 특성 및 괴경 형성율을 조사하고 ADA 유전자의 활용을 위한 값싼 항바이러스제의 screen를 수행하였다. 참여기업인 건농감자영농조합에 넘길 수 있는 씨감자를 생산한다.

제 2 절 연구개발 내용

가. 인체유용 표지유전자를 이용한 바이러스 무병감자의 개발

1) Purine계열의 항바이러스 물질이 감자의 생장에 미치는 영향조사

새로운 표지유전자로 사용될 adenosine deaminase(ADA) gene은 사람에게는 절대적으로 필요한 유전자이며 식물세포에는 전혀 존재하지 않고 사람 조직에서는 adenosine을 inosine으로 변화시키는 유전자이다. 따라서 식물세포배양시 독성 adenosine 유도체를 배지에 첨가하면(항생제 표지유전자 NPT II gene의 경우 kanamycin과 같이) 식물체는 모두 고사하지만 ADA gene을 가지고 있는 형질전환 식물체는 독성 adenosine을 무독성인 inosine으로 변환시키기 때문에 생존하게 되어 표지유전자로 사용할 수 있다. 또한 독성 adenosine 유도체의중에서 ribavirin, Ara-A 등은 항바이러스 물질로서 정상 식물체에 고농도로 처리할 경우 식물체가 모두 고사하기 때문에 저농도의 항바이러스 물질을 첨가해야하지만 낮은 농도에서는 방제하고자 하는 바이러스도 함께 생존하기 때문에 어려움이 있다. 그러나 ADA 유전자가 도입된 형질전환체는 고농도의 항바이러스 물질이 함유된 배지에서도 생존하기 때문에 바이러스가 감염된 감자에서도 쉽게 바이러스를 제거할 수 있었다.

2) ADA 유전자를 표지유전자로 이용한 감자의 형질전환 및 형질전환율의 증대

연초에서 발현이 확인된 ADA 유전자도입 binary vector에 의해서 감자를 형질전환시키고 표지유전자로 사용가능성을 조사하였다. 사용한 binary vector의 구조는 이미 개발한 mouse ADA gene 함유 pDY vector에 NPT II gene를 제거한 새로운 vector를 재조합하였다. 또한 동물유전자인 adenosine deaminase가 식물체에서도 성공적으로 발현이 되며 고농도의 독성 adenosine 유도체에서도 생존이 가능하나 *Agrobacterium*을 이용하여 형질전환시킬 때 선발방법에 다소의 문제가 있는 것으로 판단되었다. 특히 독성 adenosine 유도체는 가격이 비싸기 때문에 값싼 deoxyadenosine을 활용하여 조합 처리하

었다. 또한 adenosine을 ADA효소가 inosine으로 변환시킬 때 많은 NH₃가 발생하므로 이때 glutamine synthetase의 역할을 분석하여 효과적인 선발 방법을 조사하였다. 이때 glutamine synthetase의 inhibitor로 사용되는 phosphinothricin의 활용가능성과 ADA 효소의 inhibitor인 deoxy-coformycin의 역할도 조사하며 각종 암모늄의 농도에 따른 선발방법을 조사하였다.

3) RT-PCR에 의한 감자 바이러스 진단방법의 확립

RT-PCR에 의해서 감자바이러스를 확인할 수 있는 방법을 개발하였다. 우선 간이방법에 의해서 바이러스 RNA를 추출할 수 있는 방법과 각종 효소의 처리방법을 수행하였다.

4) ADA gene를 표지유전자로 하는 식물형질전환용 binary vector에 재조합 및 확인

가) ADA 유전자의 식물세포 발현용 vector에 재조합

- (1) 이미 개발된 binary vector에는 kanamycin 저항성 유전자가 도입되어 있으므로 kanamycin저항성 유전자를 adenosine deaminase 유전자로 재조합 하였다.
- (2) ADA gene 은 35S/35S/AMV promoter-Tnos cassette vector (524-Xba)에 재조합
- (3) 524-Xba cassette vector를 NcoI 및 BamHI으로 절단 및 순수분리
- (4) Cloning vector을 NcoI 및 BamHI으로 절단 및 순수분리
- (5) Ligation 후 최종적으로 cassette vector의 획득
- (6) Cassette vector의 *E. coli* 에 도입 및 대량증식

나) Cassette vector의 식물형질전환용 binary vector에 재조합

- (1) Ti-plasmid의 border sequence를 함유하고 있는 pRD400 binary vector의 대량 증식
- (2) Cassette vector(Insert) 및 pRD400 vector(binary vector)의 Xba으로

절단 및 순수분리

(3) 절단된 binary vector 및 cassette insert의 ligation 및 *E. coli* 에 도입

(4) 최종적으로 NPTII gene 이 제거된



의 binary vector의 획득

(5) Binary vector의 *E. coli* 에 도입 및 대량증식

(6) X-gal 및 iptg함유 LB(kanamycin함유) 배지에서 형질전환균주의 선별 및 확인

다) *Agrobacterium*에 binary vector의 도입 및 확인

(1) Tri-parental mating방법에 의하여 ADA gene 함유 binary vector *Agrobacterium*에 도입 및 확인

5) 새로운 표지유전자와 유용대성유전자가 재조합된 binary vector에 의한 감자의 형질전환

가) 감자에 재조합 유전자의 형질전환 및 발현여부 확인

(1) 형질전환과 분석방법이 빠른 연초에서 확인이 된 후 감자의 형질전환을 유도하여 동일한 방법에 의하여 형질전환체를 확인.

(2) 형질전환체의 Southern, Northern blot, Western blot등에 의하여 형질전환체의 발현여부 확인

나) 새로운 형질전환체 확인방법 개발

(1) Visible marker 에 의한 형질전환체 선별

(2) ADA activity에 의한 선별

6) Tuber-specific promoter를 이용한 binary vector의 재조합 및 감자의 형질전환

- 가) Tuber-specific promoter와 ADA 유전자의 도입 binary vector에 재조합
- 나) Binary vector에 의한 감자의 형질전환
- 다) 형질전환체의 부위별 발현여부조사

7) 고농도의 항바이러스물질에서 형질전환체의 생존여부 확인

- 가) ADA 표지유전자에 의하여 형질전환된 감자의 항바이러스물질에 나타내는 반응을 조사.
 - (1) 감자바이러스의 인공 기내 감염 후 고농도의 항바이러스물질 처리후 형질전환 감자에서 RT-PCR에 의한 바이러스 감염여부조사
- 나) ADA유전자 함유 감자와 정상 감자에 바이러스의 감염
 - (1) 정상감자잎, 사람 ADA 유전자가 함유된 형질전환 감자잎 바이러스를 감염시킨후 1개월 배양 후에 감염여부 조사.
 - (2) 각종 식물체의 바이러스감염율을 RT-PCR에 의해서 확인
- 다) Ribavirin처리에 의해서 바이러스제거 가능성의 조사
 - (1) Ribavirin의 함량이 식물체 치사농도를 함유한 배지에 상기 바이러스에 감염된 정상감자잎, ADA 유전자가 도입된 형질전환 감자잎을 절단하여 배지에 치상하여 생존을 조사 및 바이러스감염율을 조사
 - (2) 동일한 방법으로 Ribavirin이 함유되지 않은 배지에서 상기 바이러스에 감염된 형질전환감자잎을 조직배양하여 바이러스 감염율을 조사한다.

나. 인체유용 표지유전자를 이용한 바이러스 무병감자의 대량증식 및 포장
검정

1) 형질전환 유식물체의 포장재배 및 수량성 조사

- 가) 감자 형질전환체 기내 뿌리의 유도 및 순화처리
- 나) 토양활착정도의 증대방법 구명
- 다) 감자 형질전환체의 바이러스 내성 포장조사
- 라) RT-PCR에 의한 바이러스 감염정도 조사

2) Tank배양의 기술확립과 실용화 및 유묘의 대량생산 공정개발

- 가) 유식물체의 tank 내에서의 생육최적조건 확립
- 나) 유묘의 경삼방법 및 발근 조건확립
- 다) 유묘를 이용한 pot재배 및 괴경생산 방법확립

3) 형질전환체의 포장적응 시험

- 가) 바이러스 내성시험
- 나) 생육조사

제 3 절 연구수행 결과

가. 인체유용 표지유전자를 이용한 바이러스 무병감자의 개발

1) 효율적인 감자의 형질전환을 위한 재분화 조건

가) 감자의 재분화에 미치는 식물호르몬의 영향

감자에서 인체유용 표지유전자를 이용하여 형질전환을 유도하기 위해서는 우선 완벽한 재분화 시스템이 구축되고, 선발표지유전자로 사용하고자 하는 agent에 대한 내성정도, 그리고 효율적인 형질전환시스템이 개발되어야 한다. 따라서 우선 완벽한 재분화 system 구축을 위해서 IBA 0.1 mg/L가 첨가된 MS 기본배지에 각각 cytokinin류인 BA, Kinetin, Zeatin를 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L 첨가하여 감자 아틀란틱의 잎과 줄기를 절편으로 치상하여 40일간 배양한 후 shoot의 형성율을 조사하였다. 대부분의 조직에서 callus가 유도된 후에 shoot가 형성되었으며 형성율은 Table 1과 같다. Callus의 형성율은 잎보다 줄기에서 더 왕성히 형성되었으며 잎의 경우에는 Kinetin과 Zeatin에서 30%미만이었으나, BA의 경우 0.5mg/l에서 66%의 callus형성율을 보였다. 그러나 줄기의 경우에는 대부분의 식물호르몬에서 70% 이상 형성되었다. 또한 shoot의 형성율은 BA첨가구에서 최고 26%까지 증가 시킬 수 있었으며 잎과 줄기가 비슷한 경향을 보였다. 식물호르몬별로는 Kinetin첨가에 비해 Zeatin이 더 양호한 경향을 보였으며 Zeatin보다는 오히려 BA가 더 양호한 경향을 보였다. 농도별로는 BA 1 mg/L이상 첨가시에는 shoot 형성율이 오히려 감소되었으며, BA 0.5 mg/L에서 26% 로 가장 높은 경향을 보였다. 따라서 BA가 가격이 Zeatin에 비해 싼점을 감안한다면 감자의 형질전환을 위한 재분화 배지에는 Zeatin보다 BA를 첨가하여 사용하는 것이 더 효율적일것으로 생각된다.

Table 1. The effects of phytohormone on the shoot regeneration from Atlantic leaf and stem of *Solanum tuberosum* L. in the MS medium with IBA 0.1mg/L

Pytohormone(mg/L)		Callus formation(%)		Shoot Regeneration(%)	
		Leaf	stem	Leaf	stem
BA	0.25	14	76	12	17
	0.50	66	78	26	26
	1.00	26	100	14	16
	2.00	10	92	16	14
Kinetin	0.25	14	82	4	18
	0.50	24	84	10	18
	1.00	18	88	8	12
	2.00	12	88	6	6
Zeatin	0.25	28	90	4	6
	0.50	20	80	8	10
	1.00	10	90	14	16
	2.00	14	86	18	20

나) 감자품종별 재분화에 미치는 AgNO₃ 및 PVP의 영향

상기 실험결과 IBA 0.1 mg/L에 BA 0.5 mg/L첨가시 감자의 shoot형성에 양호하였으므로, 본 배지에 추가로 AgNO₃ 및 PVP (polyvinylpyrrolidone)를 농도별로 첨가하여 재분화율을 높이기 위해서 아틀란틱, 수미, 대지 및 대지리의 잎과 줄기를 절단하여 치상한후 50일간 배양하였던 바 그 결과는 Table 2와 같다. AgNO₃를 첨가하지 않고 IBA 0.1 mg/L에 BA 0.5 mg/L을 첨가한 배지에서 아틀란틱과 대지리가 잎과 줄

기에서 26-28%정도의 재분화능을 가지고 있었지만 AgNO₃의 첨가시에는 재분화능이 증가되어 특히 10 μM에서는 38-48%로 약 50%정도가 더 증가하는 경향을 보였다. 그러나 수미와 대지의 경우에는 AgNO₃첨가에 의해서 재분화율이 아틀란틱과 대지리만큼 증가하지 못하였다. 한편 PVP의 경우에는 추가 첨가시 재분화율 증가에 많은 영향을 미치지 못하였다. 특히 재분화시에도 AgNO₃의 첨가경우에는 배양 20일이 지나면 많은 shoot가 형성되었지만 PVP 첨가배지에서는 30일이 경과하여야 shoot가 형성되는 경향을 보였다.

Table 2. The effects of AgNO₃ and PVP on the shoot regeneration from leaves and stems of various *Solanum tuberosum* L. in the MS medium with IBA 0.1mg/L and BA 0.5 mg/L

Chemical	Conc	Shoot Regeneration(%)							
		Atlantic		Superior		Daeji		Desiree	
		Leaf	Stem	Leaf	Stem	Leaf	Stem	Leaf	Stem
Control	0	26	26	16	18	12	16	27	28
AgNO ₃ (μM)	5	25	24	15	16	13	16	30	32
	10	48	39	17	19	15	17	42	38
	20	21	24	16	14	14	15	23	25
PVP (mg/L)	1	27	29	15	19	11	13	29	28
	2	29	31	19	21	16	19	29	31

다) 감자절편의 증식에 미치는 배지의 농도, 식물호르몬 및 ascorbic acid의 영향

재분화에 의해서 유도된 식물체(형질전환체)는 줄기배양을 통해서 대량으로 생산이 가능하다. 따라서 기존에 MS배지만 사용하였으나 본 실험에서는 MS의 배지, sucrose의 농도와 식물호르몬(IBA)의 영향 및 항산화제로 사용되는 ascorbic acid의 영향을 조사하였다.

최초 줄기절편을 배지 및 sucrose가 달리 처리된 배지에 4개씩(Fig. 1-1) 현탁배지에 넣고 30일간 배양하여 성장정도를 육안으로 조사하였다. MS배지의 농도(1/2X, 1X, 2X)와 sucrose 농도(30g/L, 60g/L)에 따라 조사한 결과 역시 1X MS배지가 가장 양호하였다(Fig. 1-2). 또한 sucrose의 농도는 60g/L의 농도보다 30g/L의 농도가 더 양호한 경향을 보였다(Fig. 1-2).

Ascorbic의 첨가배지에서 생장이 양호하였으며(Fig. 2-1), 추가첨가시에도 역시 sucrose 30g/L가 양호하였으나(Fig. 2-2), IBA(Fig. 2-3)의 경우에는 효과가 없었으며 오히려 IBA 첨가에 의해서 shoot의 생장이 억제되고 callus의 형성이 유기되는 경향을 보였다.

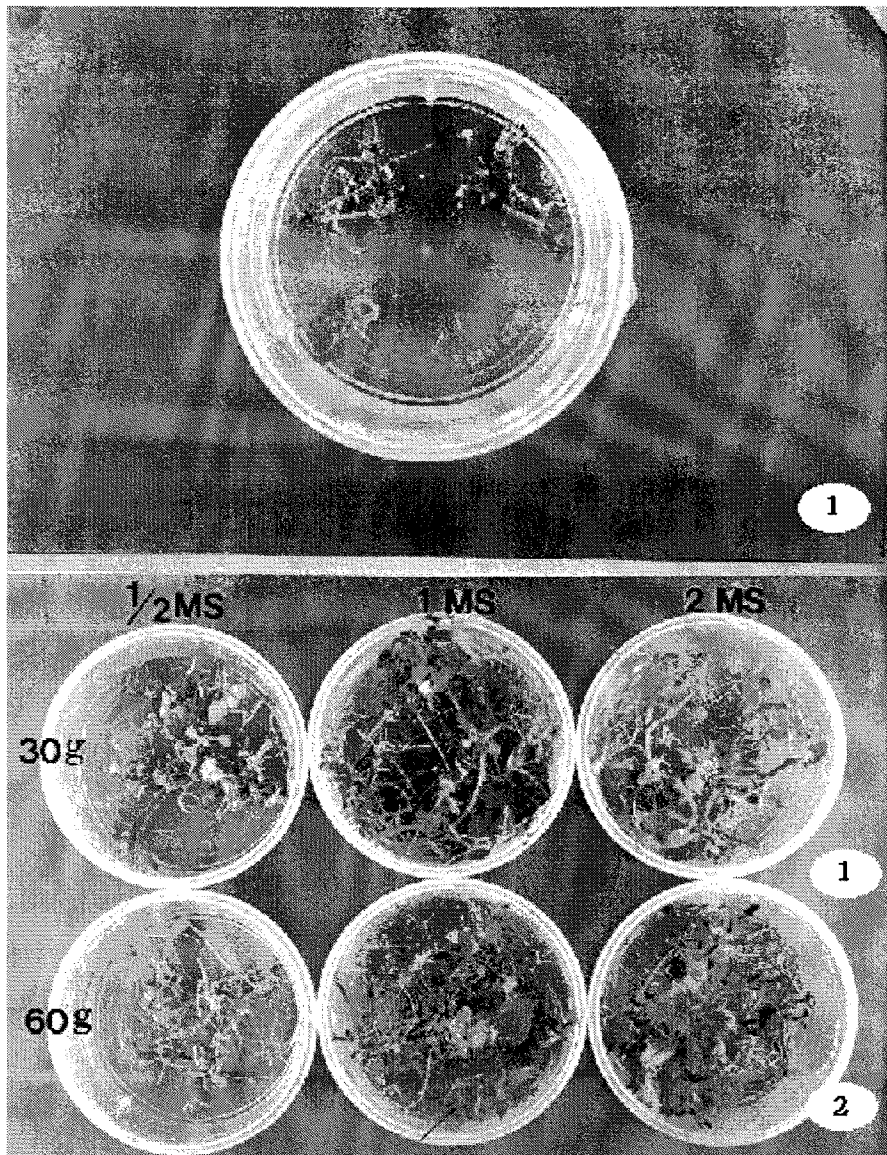


Fig. 1. The effects of concentration of MS media and sucrose on the growth of stem explants(*Solanum tuberosum* L.) on the suspension media.

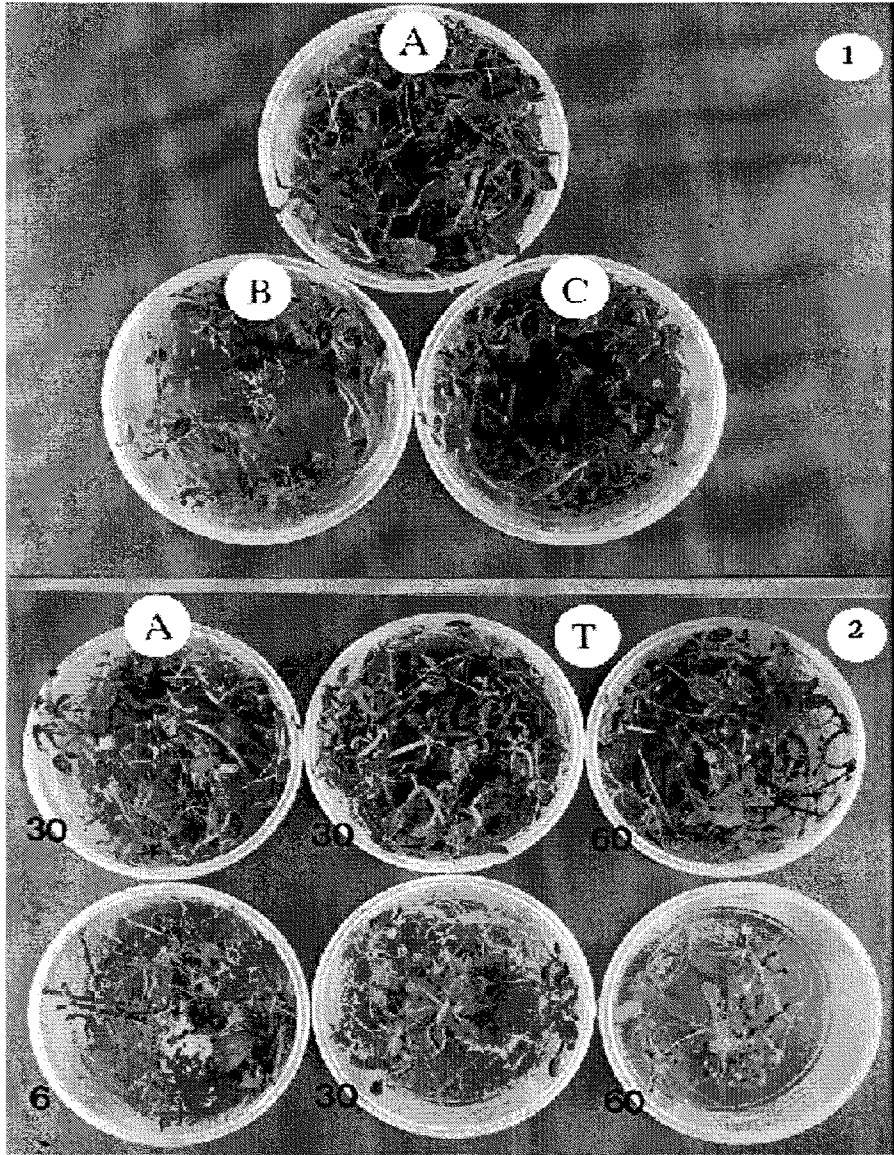


Fig. 2. The effects of concentration of ascorbic acid and sucrose on the growth of stem explants(*Solanum tuberosum* L.) on the suspension media.

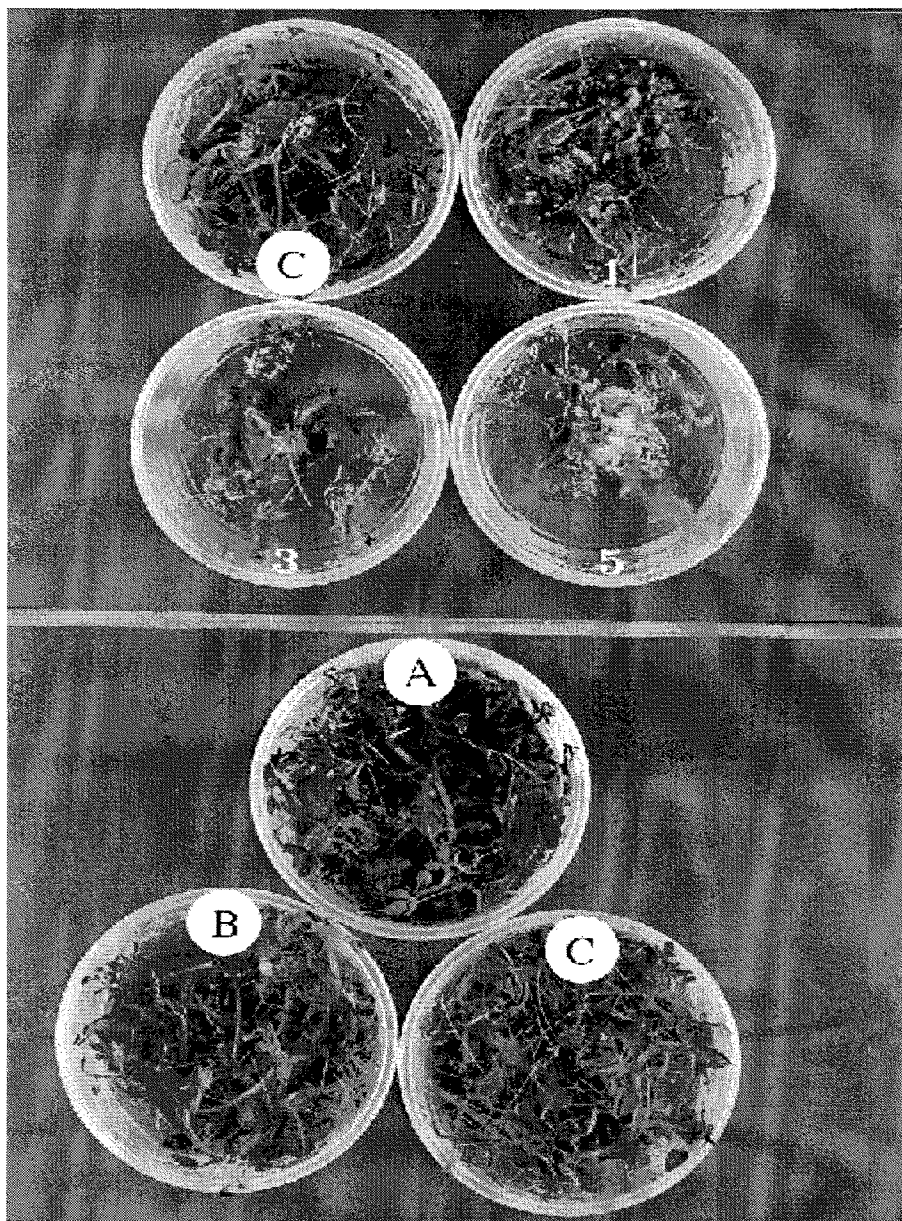


Fig. 3. The effects of concentration of IBA on the growth of stem explants(*Solanum tuberosum* L.) on the suspension media.

2) 항바이러스 물질(purin계열)이 감자의 생장에 미치는 영향조사

본 실험에 표지유전자로 사용하고자 하는 Adenosine deaminase는 purine 대사에 관여한 효소로서 mammalian organism의 어느 부위에나 존재하지만 세포의 생장에는 직접 관여하지 않는 것으로 알려져 있으며, 동물세포에서 ADA의 부족은 면역결핍증(immunodeficiency)을 유발하는 것으로 보고 되어있다. 동물세포내에서 ADA효소는 adenosine을 inosine으로 변환시키며 adenosine 대신 toxic adenosine analogues을 첨가하면 ADA가 부족 할 경우 adenosine kinase의 작용으로 adenosine monophosphate (AMP)가 되며, 계속 ADP 및 ATP를 생성하는 과정을 걸쳐 DNA polymerase 및 cAMP 와 RNA합성과정에서 cytotoxicity를 갖게된다. 따라서 본실험에서는 독성 adenosine의 유도체인 xylofuranosyl adenine (Xyl-A), 9-β-D-arabinofuranosyl adenine(Ara-A) 및 Cordycepin을 50 - 200μM의 농도로 처리하여 수미와 대지리 품종의 줄기를 각각 치상하여 30일간 배양한 후 성장정도를 조사하였던 바, 그 결과는 Table 3, 4와 같다. 수미의 경우에는, Ara-A에서 매우 둔감한 반응을 보였으며 그 다음에 Xyl-A, 그리고 cordycepin에서 가장 민감하게 반응하는 경향을 보였다. Cordycepin의 농도는 50 μM에서부터 분화가 되지 않았으며 100 μM 이상에서는 줄기의 끝이 하얗게 변해가는 것을 관찰할 수 있었다(Table 3).

Table 3. The effect of Ara-A(A), Cordycepin(B) and Xyl-A(C) on the growth of stem derived from *Solanum tuberosum* L. Desiree

Anti-virus component	Concentration(μM)				
	0	50	100	150	200
Ara-A	++++	+	-	-	-
Cordycepin	++++	-	-	-	-
Xyl-A	++++	+	-	-	-

또한 대지리의 경우에도 cordycepin에서 가장 민감하게 반응하여 50 μ M 이상에서는 조직이 고사하는 경향을 보였다(Table 4). 따라서 감자의 형질전환을 위해서는 cordycepin 100 μ M에서 선발하는 것이 가장 효율적일 것으로 생각된다.

Table 4. The effect of Ara-A(A), Cordycepin(B) and Xyl-A(C) on the growth of stem derived from *solanum tuberosum* L. Superior.

Anti-virus component	Concentration(μ M)				
	0	50	100	150	200
Ara-A	++++	++	++	+	-
Cordycepin	++++	+	-	-	-
Xyl-A	++++	+	-	-	-

특히 식물조직배양시 항바이러스제로 많이 사용되고 있는 Ribavirin의 경우에는 고농도에서는 수미 및 대지리 공히 생장이 억제 되었으나 Ara-A, cordycepin 및 Xyl-A보다는 더 고농도에서 감자의 조직이 고사하는 경향을 보였다(Table 5). 따라서 감자의 형질전환을 위해서 Ribavirin를 사용할 경우 150 μ M에서 선발하는 것이 가장 효율적일 것으로 생각된다.

Table 5. The effect of Ribavirin on the growth of stem derived from *solanum tuberosum* L. Superior and Desiree.

Cultivar	Concentration(μ M) of Ribavirin				
	0	50	100	150	200
Superior	++++	++	+	-	-
Desiree	++++	+	-	-	-

3) RT-PCR에 의한 감자 바이러스 진단방법의 확립

가) 감자바이러스 진단을 위한 primer의 제작

감자에서 가장 심각하게 나타나는 PVY의 감염여부를 신속히 RT-PCR에 의해서 확인하기 위해 PVY의 염기서열을 인터넷상의 NCBI에서 모두 찾아 가장 homology가 높은 부분을 이용하여 primer를 제작하였다. 많은 종류의 PVY를 진단하기 위해서 염기서열이 일부분 다른 경우에는 동시에 합성될 수 있도록 2-3종류의 염기를 넣었다. 이때 Sense primer는 5'-TYA-CGT-CCA-AAA-TGA-GAA-TGC-C-3'이며 Anti-sense primer는 5'-CAA-CRA-CAA-CCC-GGC-ACT-TT-3' 이었다. 상기 primer에 의해서 확인될수 있는 PVY의 종류는 아래와 같으며 PVY primer에 의하여 확인된 바이러스는 총 50여종이었다.

ref NC_001616.1	Potato virus Y strain N	37	0.048
gb AF275951.1 AF275951	Potato virus Y coat protein gene, pa..	37	0.048
gb AF264151.1 AF264151	Potato virus Y coat protein gene, pa..	37	0.048
gb AF139839.1 AF139839	Potato virus Y from potato, 3'UTR s..	37	0.048
gb AF139838.1 AF139838	Potato virus Y from potato, 3'UTR se..	37	0.048
gb AF118153.1 AF118153	Potato virus Y polyprotein gene, par..	37	0.048
dbj D12570.1 PVYCP	Potato virus Y (PVY-T) coat protein gene	37	0.048
dbj D12539.1 PVYOCRNA	Potato virus Y genome, 3' half sequence	37	0.048
gb M95491.1 PVYPOLYP	Potato virus Y polyprotein gene, compl..	37	0.048
gb U09509.1 PVU09509	Potato virus Y common strain, complete..	37	0.048
gb U09508.1 PVU09508	Potato virus Y necrotic strain polypro..	37	0.048
dbj D00441.1 PVYAAA	Potato virus Y (N strain) genomic RNA, ..	37	0.048
emb X12456.1 PVYNXX	Potatovirus Y strain N genomic RNA	37	0.048
emb X97895.1 PVYGEN	Potato virus Y genes encoding viral pol..	37	0.048
emb Z70238.1 PVYCPWILG	Potato virus Y mRNA for coat protein	37	0.048
emb Z70237.1 PVYCPNYS	A Potato virus Y mRNA for coat protein	37	0.048
emb Z70239.1 PVYCPLIPI	Potato virus Y mRNA for coat protein	37	0.048
emb X92078.1 PVYCPGENE	Potato virus Y mRNA for coat protein	37	0.048

emb X54636.1 PVYCAPSI	Potato virus RNA for capsid protein a..37	0.048
emb AJ223595.1 PVY223595	Potato virus Y coat protein gene a..37	0.048
emb AJ223594.1 PVY223594	Potato virus Y coat protein gene a..37	0.048
emb AJ223593.1 PVY223593	Potato virus Y coat protein gene a..37	0.048
emb AJ223592.1 PVY223592	Potato virus Y coat protein gene a..37	0.048
gb M81435.1 PVYPOLYPR	Potato virus Y polyprotein RNA, 3' end	37 0.048
gb M22470.1 PVYCPA	Potato virus Y coat protein gene, 3' end	37 0.048
gb U10378.1 PVU10378	Potato virus Y capsid protein mRNA, pa..37	0.048
gb U06789.1 PVU06789	Potato virus Y-VN genome, 3' untransla..37	0.048
emb AJ005639.1 PVY5639	Potato virus Y cp gene, partial	33 0.83

또한 PLRV primer의 경우에는 Sense primer의 구성은 :
5'-TAC-AAC-AAC-CAA-GAA-GGC-GAA-GAA-GG-3'이며
Anti-sense primer의 구성은 5'-CGG-AGT-CTA-CCT-ATT-TGG-
GGT-TTT-GC-3'으로 제작하였다 PLRV primer에 의하여 확인된 바
이러스는 총 18종이었다.

ref NC_001747.1	Potato leaf roll virus, complete genome	52	4e-06
gb U73777.1 PLU73777	Potato leaf roll virus coat protein an.	52	4e-06
gb U74377.1 PLU74377	Potato leaf roll virus coat protein an.	52	4e-06
dbj D00530.1 PLVGR	Potato leafroll luteovirus genes for 28K.	52	4e-06
dbj D13954.1 PLVRC	Potato leaf roll virus (Canadian isolate.	52	4e-06
dbj D13953.1 PLVRA	Potato leaf roll virus (Australian isola.	52	4e-06
dbj D13753.1 PLVCP	Potato leaf roll virus 23K ORF (putative.	52	4e-06
emb X74789.1 PLVSQRN	Potato leaf roll virus RNA sequence	52	4e-06
emb Y07496.1 PLRVXX	Potato leaf roll virus genomic RNA	52	4e-06
emb X77326.1 PLLVCPG6	Potato leafroll luteovirus (PLRV-V31).	52	4e-06
emb X77325.1 PLLVCPG5	Potato leafroll luteovirus (PLRV-V4) .	52	4e-06
emb X77323.1 PLLVCPG4	Potato leafroll luteovirus (PLRV-15) .	52	4e-06
emb X77324.1 PLLVCPG3	Potato leafroll luteovirus (PLRV-30) .	52	4e-06
emb X77322.1 PLLVCPG2	Potato leafroll virus (PLRV-11) gene .	52	4e-06
emb X77321.1 PLLVCPG1	Potato leafroll luteovirus (V) gene f.	52	4e-06
emb X14600.1 PLLVGRNA	Potato leafroll luteovirus genomic RNA	52	4e-06
gb M89926.1 PLVCOAPRO	Potato leaf roll virus coat protein a.	52	4e-06
gb S77421.1 S77421	coat protein [potato leaf roll virus PLR.	32	3.9

나) RT-PCR 조건

RT-PCR에서 가장 중요한 요인인 Reverse transcriptase의 농도는 50unit가 적당하였으며 RNasin의 경우에는 8 unit, 그리고 Taq polymerase 1 unit, primer의 농도 20pM이 양호하였다. RT-PCR은 우선 토탈 바이러스 RNA추출 후에 55 °C에서 5분간 처리후 냉장고에 보관하여 사용하였으며, cDNA의 합성은 45분간 하였다. PCR 은 denaturation 1 min, annealing 1 min, extension 1 min을, 그리고 36 cycles이 양호하였다. 상기방법에 의해서 PCR 결과 바이러스를 성공적으로 진단할 수 있었으며(Fig. 4), 조직배양묘에서는 전혀 바이러스를 확인할 수 없었다(Fig. 5)

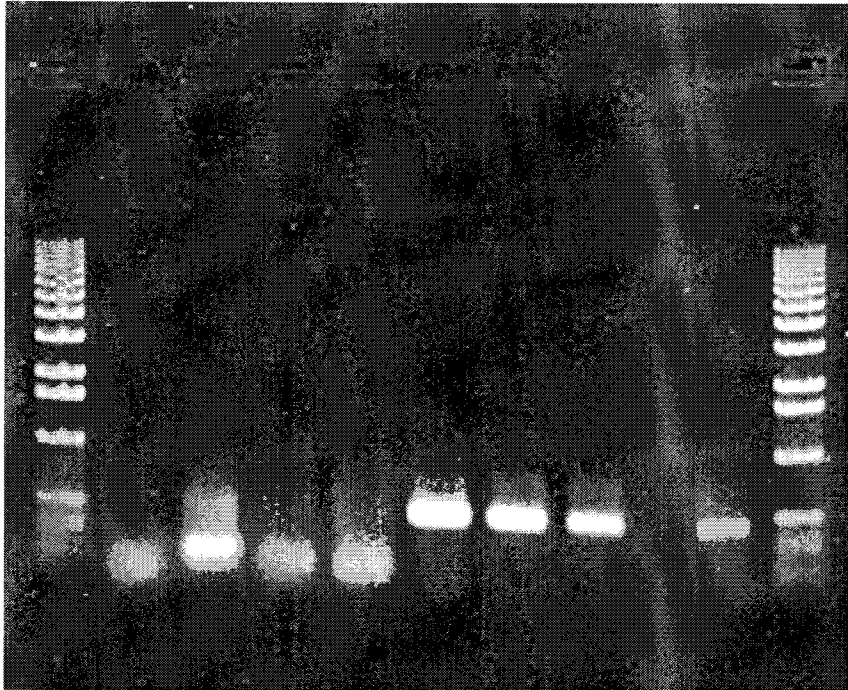


Fig. 4. PCR products of PLRV coat protein gene using RT-PCR technology.

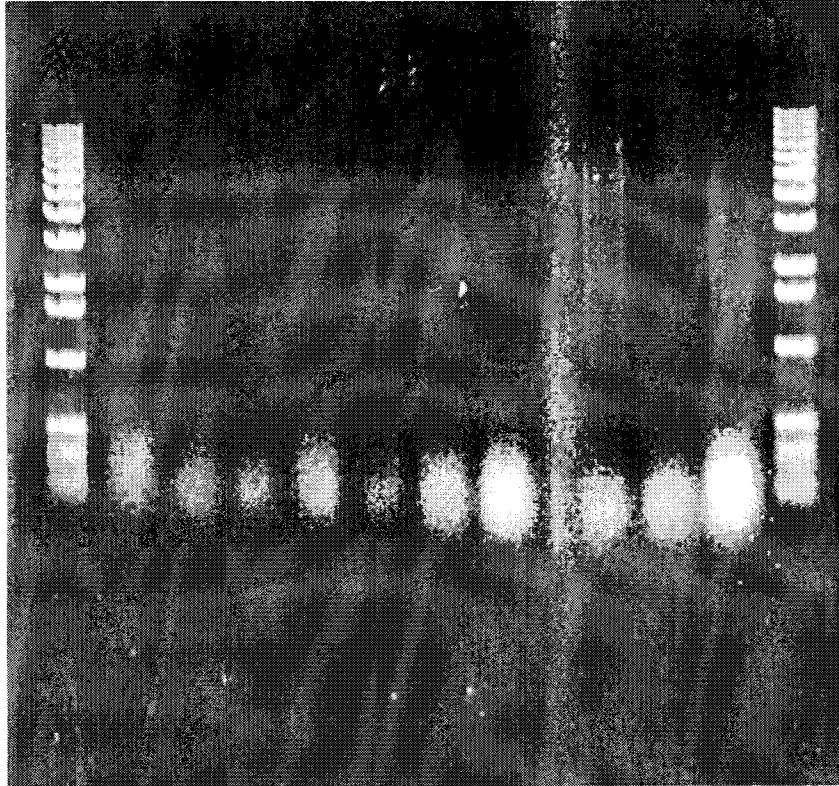


Fig. 5. Check of PLRV in the leaf derived from tissue culture using RT-PCR technology. Any band is not detected in the tissue extract.

4) 인체유용표지유전자와 감자 PLRV coat protein의 재조합 및 형질전환

가) ADA 유전자의 식물세포 발현용 vector에 재조합

동물에서만 존재하는 ADA 유전자를 표지유전자로 사용하기 위해서 우선 재조합을 수행하였다. ADA 유전자가 함유된 식물발현용 cassette vector pADA5-29을 NcoI 과 EcoRV로 절단하여 1.3k 절편을 유도하여(Fig. 6-A), 35S-35S-AMV promoter가 함유된 524-Xba(Fig. 6-B)에 상기 절편을 이용한 재조합 cassette vector(Fig. 6-C)를 만들었다.

나) 감자 PLRV coat protein의 cloning 및 식물 expression vector에 재조합

감자에서 PLRV가 감염되어 있는 조직에서 PLRV coat protein gene를 cloning 할 수 있는 primer를 제작하여 유전자를 isolation 하였다(Fig. 7). Cloning된 PLRV CP gene를 상기 ADA와 동일한 방법으로 식물발현용 expression vector에 재조합하였다(Fig. 8-A).

다) Tuber-specific promoter에 ADA유전자의 재조합

ADA유전자를 tuber-specific promoter를 이용하여 감자에서 발현시키기 위해서 감자 patatin promoter에 ADA 유전자를 도입하여 재조합하였다. 우선 ADA 유전자가 도입되어 있는 DY18/ADA vector에서 35S-35S-AMV promoter를 제거하고 대신 patatin promoter를 도입하였다(Fig. 8-B).

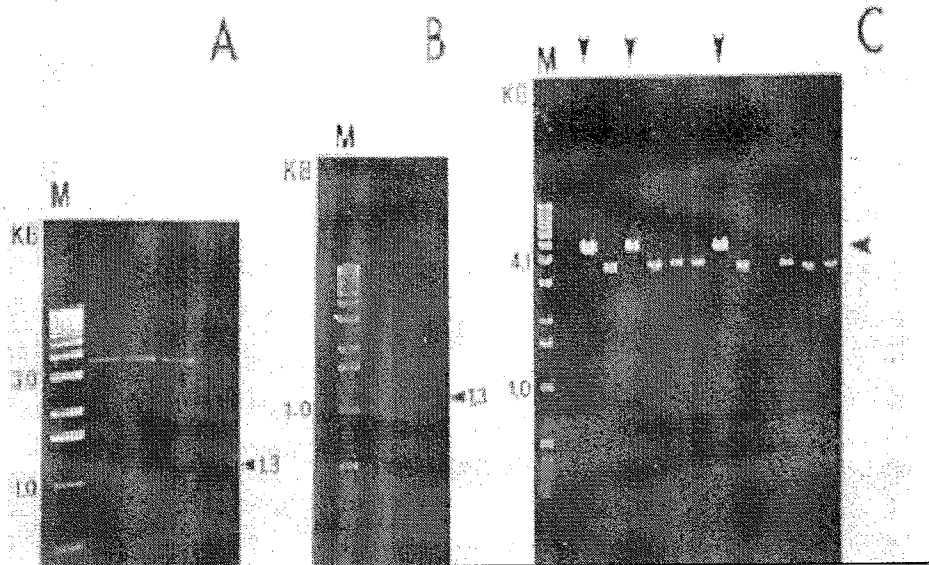
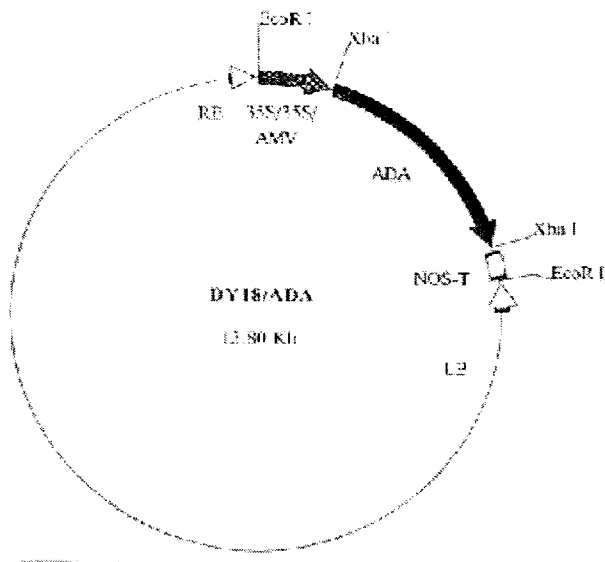


Fig. 6. Recombination of ADA for expression into potato. Digestion of pADA5-29(upper) with NcoI and EcoRV(A), and isolation of 1.3kb fragment with ADA gene(B), and selection of ligate (5 kb, arrow) with cassette vector (3.7kb) inserted ADA gene (C).

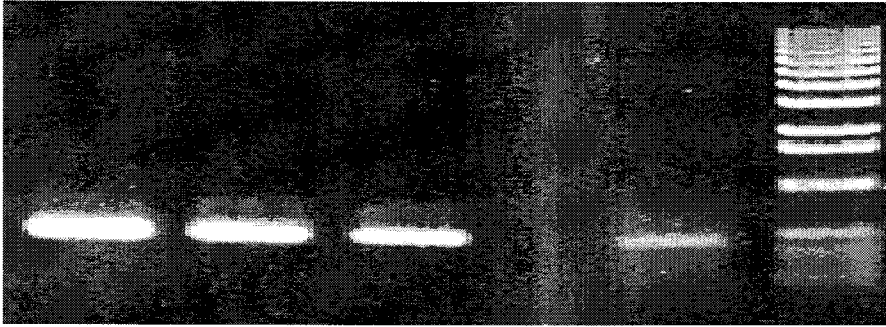


Fig. 7. Isolation of PLRV coat protein gene from infected potato.

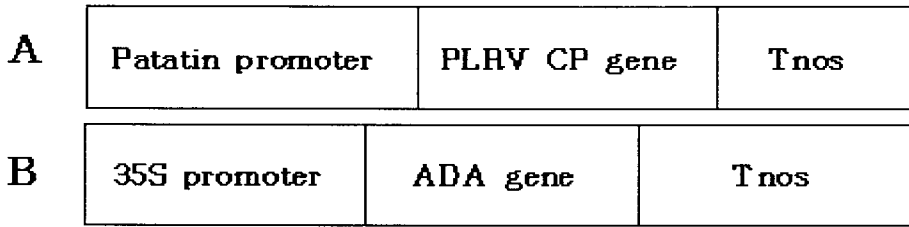


Fig. 8. Recombination of patatin promoter and ADA and PLRV CP gene for expression into potato.

라) 재조합 coat protein gene의 binary vector에 재조합

ADA 유전자를 35S promoter에 재조합하고, 다시 tuber-specific promoter를 PLRV coat protein gene에 재조합하여 감자에서 발현시키기 위해서 감자 patatin promoter에 ADA 유전자를 도입하여 재조합하여 형질전환용 binary vector를 만들었다(Fig 9).

LB	Patatin promoter	PLRV CP gene	ADA gene	RB
----	------------------	--------------	----------	----

Fig. 9. Recombination of binary vector(pCP-ADA) using patatin promoter and ADA and PLRV CP genes for transformation into potato.

마) Binary vector의 triparental mating에 의한 *Agrobacterium* 에 도입

ADA유전자를 표지유전자로 하고 PLRV CP gene 앞에 patatin promoter가 재조합된 pCP-ADA binary vector를 *Agrobacterium*에 도입하고자 triparental mating 방법에 의하여 수행하였다(Table 6). 본 실험결과에 의해서 conjugant인 *Agrobacterium tumefaciens* MP90/pCP-ADA을 획득할 수 있었다.

Table 6. Tri-parental mating for conjugants of *Agrobacterium* with CP and ADA genes

Strains (plasmid)	Selective media containing antibiotics(μg/ml)			
	2YT	2YT(Km50)	2YT(Gm50)	ABkmGm50
Acceptor(<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) MP90(disarmed Ti)	+	-	+	-
Donor(<i>E. coli</i> DH5a) pCP-ADA	+	+	-	-
Helper(<i>E. coli</i> DH5a) pRK2013	+	+	-	-
Transconjugant(<i>Agrobacterium</i>) MP90/pCP-ADA	+	+	+	+

5) 감자의 효율적인 형질전환방법 및 형질전환율의 증대

가) 각종 *Agrobacterium*에 의한 효율적인 형질전환 방법의 증대

Agrobacterium rhizogenes.에 의하여 감자조직을 형질전환시키기 위하여 잎절편과 배양된 균주를 동시배양법으로 형질전환 하였다. Cell density가 10^7 /mL로 조정된 세균배양액에 잎절편을 10분간 침지시킨 후 멸균된 filter paper위에서 배양액을 dry blot 한후 2,4-D가 첨가된 동시배양배지에서 2일간 배양하여 형질전환을 유도하였다. 동시배양후 조직절편을 carbenicillin 500 µg/mL이 첨가된 식물호르몬 무첨가 MS 선발배지로 옮겨 배양하면서 형질전환율을 조사하였다. 형질전환율은 hairy root의 형성여부를 조사하였으며 치상한 절편당 hairy root 형성 절편의 수를 세어 백분율로 나타내었다. 형성된 hairy root의 특성을 조사하기 위해서는 explant당 형성된 root의 수와 root의 길이를 측정하여 평균치를 내었으며 standard error를 구하였다. Table 6은 아틀란틱, 대지리 및 수미를 대상으로 하여 *Agrobacterium rhizogenes*를 접종하여 형질전환율을 조사한 결과이다. Disarmed 된 Ti-plasmid를 함유하고 있는 MP90의 경우에는 전혀 hairy root가 형성되지 않았지만 wild type *A. rhizogenes*에서는 모두 형성되었다. 그러나 균주와 감자의 품종간에는 차이가 있었는데, 13257에 비해 43257과 A₄에서 형성율이 양호하였으며 품종간에는 수미가 가장 양호하였고 그 다음으로 아틀란틱, 대지리 순이었다. 형질전환체 hairy root의 특성은 수미에 A₄ 균주를 접종했을 때 형성된 수가 많았으며 hairy root의 길이도 수미가 가장 긴 경향을 보였다(Table 7). 동시배양시 형질전환에 미치는 2, 4-D 의 효과를 조사하기 위하여 품종별로 2,4-D 농도를 2mg/L 로 처리한 배지와 무처리 배지로 구분하여 2일간 동시배양 한 후 형질전환율을 조사하였다(Table 8). 전반적으로 2,4-D를 첨가한 배지에서 첨가하지 않은 배지보다 형질전환율이 증가하였으며 품종과 균주에 따라 다소 차이를 보였다. *A. rhizogenes* 43057 을 처리한 결과 Atlantic 품종은 2,4-D 2mg/l 처리시 형질전환율이 71.4%로서 무처리시 0 % 에 비하여 2,4-D 가 형질전환에 확실히 효과적임을 보여주었고 A₄ 균주도 형질전환률이 높아졌다. 수미의 경우에는 *A. rhizogenes* 43057 균주처리시에는 2,4-D 처리가 형질전환

률을 증가시켰고 Desiree 품종 역시 *A. rhizogenes* 43057 처리시 2, 4-D 가 효과적이었다(Table 9).

Table 7. Comparison of susceptibility with wild type strains of *Agrobacterium spp.* of the different potato varieties.

Strains	Ratio of transformation(%)		
	Atlantic	Desiree	Superior
<i>A. tumefaciens</i>			
disarmed MP90	-	-	-
<i>A. rhizogenes</i>			
13257	-	-	7.1
43057	35.7	28.6	64.3
A4	42.9	21.5	35.8

Table 8. Characteristics of hairy roots derived from *Solanum tuberosum*

<i>S. tuberosum</i> cultivars	No. of hairy roots per explant		Length of hairy roots(cm)	
	43057	A4	43057	A4
Atlantic	1.6	1.5	3.60 ± 0.43 ^z	5.38 ± 0.42
Desiree	2.0	1.0	4.17 ± 0.98	3.00 ± 0.58
Superior	1.3	2.6	6.07 ± 0.54	5.91 ± 0.37

Table 9. Effect of 2, 4-D treatment on the formation of hairy root from various *S. tuberosum* according to infection of *Agrobacterium* spp.

<i>S. tuberosum</i> cultivars	Ratio of transformation (%)			
	Phytohormone free		2, 4 - D 2 mg/L	
	43057	A4	43057	A4
Atlantic	0.0	14.3	71.4	71.4
Superior	42.9	42.9	85.7	28.6
Desiree	0.0	28.6	57.1	14.3

나) ADA유전자를 이용한 감자의 형질전환을 위한 최적조건 구명

ADA 표지유전자를 이용한 형질전환체의 선발을 위한 조건을 구명하기 위해서 우선 기존에 사용한 항생제 선발유전자를 이용하여 감자의 형질전환체계를 확립하고자 Desiree감자 절편체를 pre-culture기간별, 액체 및 고체 상태에서의 co-culture 방법에 따라 균과 공동배양한 후 선발배지에서 살아남는 절편체를 조사하였다. 감자의 형질전환시 pre-culture 기간에 따른 형질전환율은 3일 정도가 가장 좋았으며, 5일이 지나면 절편체가 비대해지고 callus가 생성되는 양상을 보였다(Table 10). 이러한 절편체는 공동배양후 선발시 균의 생장이 빠르고 제거가 용이하지 않았으며, 형질전환을 또한 좋지 않았다.

Table 10. Effect of pre-culture period on the putative transgenic shoot formation of *Solanum tuberosum*

Pre-culture	co-culture	frequency	
		Leaf	Stem
1 day	3 day	++	++
3 day	3 day	+++	++
5 day	3 day	+	+

+: 0-5%, ++: 5-10%, +++: 10-20%.

감자 절편체와 균을 공동 배양할 때 액체 재분화 배지에 균을 접종하고 절편체를 같이 넣어 공동 배양하는 액체 공동 배양방법은 형질전환 효과가 적었으며, 액체 공동 배양 후 고체배지에서 2-3일간 공동배양한 것과 균접종 후 고체배지에서 공동 배양한 것이 각각 형질전환율이 좋았다(Table 11).

Table 11. Effect of co-culture methods on the putative transgenic shoot formation of *Solanum tuberosum*

Liquid co-culture	Solid co-culture	frequency
-	O	+++
O	-	+
O	O	+++

+: 0-5%, ++: 5-10%, +++: 10-20%.

따라서 상기 조건에 따라 감자의 형질전환을 시도하였는데, 그 흐름도는 다음과 같다(Fig. 10).

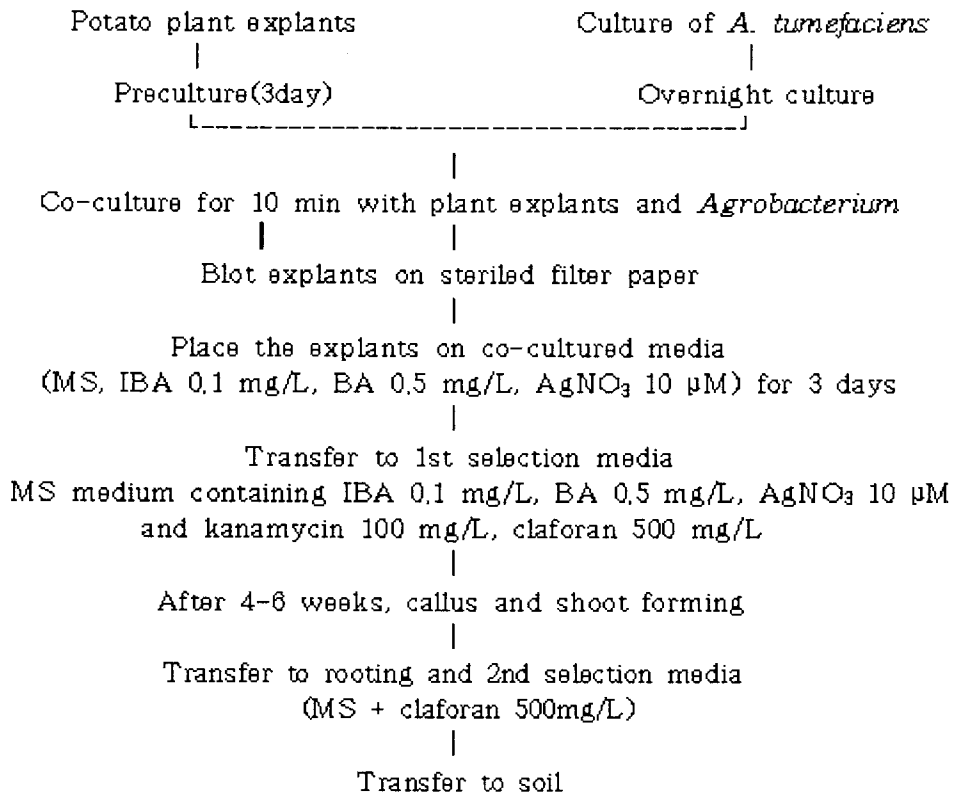


Fig. 10. Co-culture of *Agrobacterium* with potato leaf discs and stems.

감자의 형질전환율을 더욱 높이고자 전술한 형질전환체계에서 공동배양 시에 100µM의 acetosyringone을 첨가하여 형질전환율을 조사하였다. 모두 80개씩의 잎과 줄기절편체를 가지고 공동배양을 실시한 결과 acetosyringone 무첨가 배지에서는 각각 5%, 2.5%의 형질전환율을 나타낸 반면 acetosyringone 처리에서는 19%와 10%의 형질전환율을 나타내 acetosyringone 무처리보다 처리구가 약 3-4배 정도의 높은 형질전환율을 나타내었다(Fig. 11).

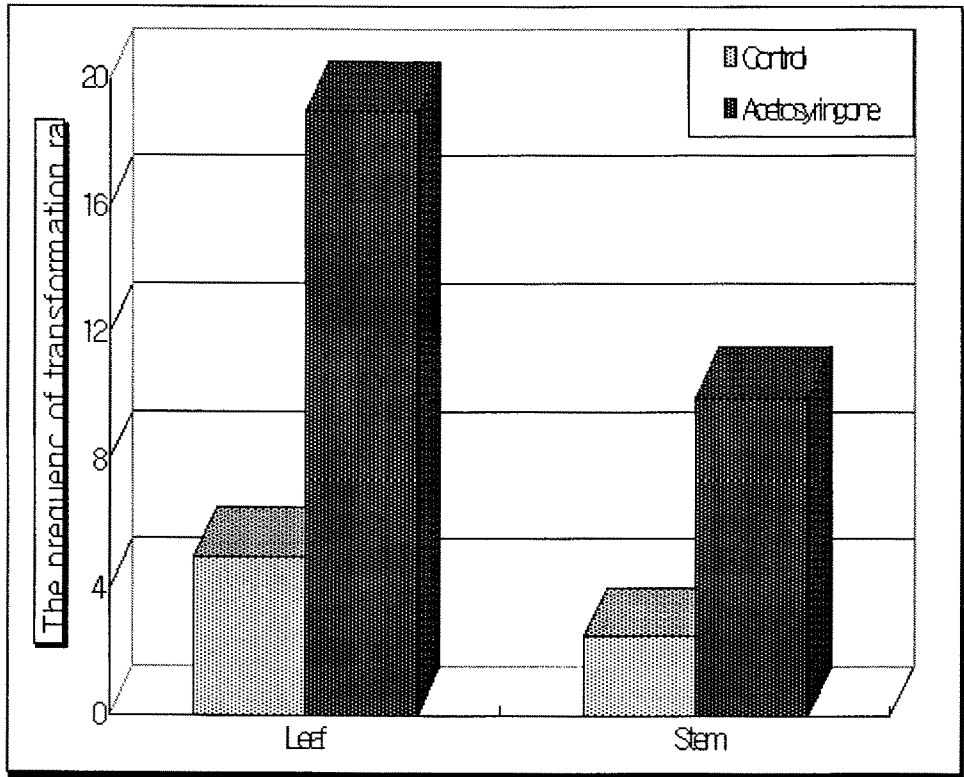


Fig. 11. Effect of acetosyringone(100 μ M) on the frequency of *Agrobacterium* -mediated transformation in potato.

다) 항생제를 이용한 효율적인 형질전환방법 개발

ADA 선발유전자를 이용한 담배의 형질전환에 있어 선발된 식물체의 실제 형질전환율이 kanamycin에 의한 선발보다 낮았는데, 이는 첫째로 ADA gene이 식물에는 존재하지 않으나 미생물인 *Agrobacterium*의 핵염색체 안에 존재할 가능성과 둘째, adenosine analoge가 항생제나 기타 다른 선발 물질보다 *Agrobacterium* 존재시 급속히 분해되어 형질전환되지 않은 절편체도 선발배지에서 생존하게 하기 때문으로 사료되며 그 원인은 앞으로 계속 조사하여야 할 것이다. 따라서 ADA 유전자

를 선발유전자로 사용한 새로운 선발체계는 형질전환시 효과적인 균의 제거는 형질전환 효율에 영향을 끼치게 되므로 다양한 항생제를 농도별로 처리한 고체배지에 균을 접종하여 생존여부를 조사하였다(Table 12). 사용한 항생제의 농도는 각 항생제에 따라 식물체에 영향을 주지 않는 범위내에서 정하였다. Steptomycin과 ampicilline은 실험 농도에서 균의 억제 효과를 나타내지 못하였으나 tetracycline은 5mg/L 만으로도 효과적으로 균을 억제할 수 있었으며, 형질전환시 균 제거에 효과적이며 널리 사용되는 claforan 역시 100mg/L의 농도에서 효과적으로 균을 억제하였다.

Table 12. Effect of antibiotics on the inhibition of growth in *Agrobacterium tumefaciens* MP90

Antibiotics	Conc. (mg/L)	Inhibition	Conc. (mg/L)	Inhibition	Conc. (mg/L)	Inhibition
Streptomycin	10	-	20	-	30	-
Tetracycline	5	+++	10	+++	15	+++
Ampicilline	10	-	30	-	50	-
Claforan	100	+++	250	+++	500	+++

-: no inhibition, +++: inhibition.

선발된 항생제 조건에 의해 선발 하는 과정 중 식물세포간극 사이에 존재하는 균의 수를 시기별로 조사하여 균이 증식되기 전에 계대하고자 직경 6 mm의 cork borer를 이용하여 일정 크기의 감자 잎절편을 무균적으로 취한 후 균과 공동배양한 후 전 실험에서 선발된 항생제 배지에 치상하여 시기별로 취한 뒤 희석평판법을 이용하여 계수하였다. 잎과 줄기 모두 초기의 균수는 10^8 정도 이었으나 3일에는 급격히 감소하였으며, 14일이 경과하면서 다시 상승하였다(Table 13). 따라서 7일 정도에 새로운 선발배지로 절편체를 계대하는 것이 균제거에 효과적일 것으로 사료되었다.

Table 13. Growth of *Agrobacterium* co-cultured with leaf and stem explant according to cultural day.

Explant	0 day	3 day	7 day	14 day
Leaf	27×10^8	15×10^2	27×10^3	74×10^4
Stem	85×10^8	17×10^2	25×10^3	95×10^4

따라서 ADA gene을 선발유전자로 이용하여 형질전환체를 선발하는 새로운 선발체계에서는 형질전환체의 선발시 효과적으로 균을 제거하기 위해 항생제 claforan 500mg/L 와 tetracycline 5mg/L를 혼합하여 선발 배지에 첨가하며 7일 간격으로 계대하는 것이 효율적일 것으로 사료된다. Cordycepin 100 μ M이 첨가된 선발배지에 감자 절편체를 치상한 뒤 7일 간격으로 계대하여 4주정도가 지나면서 multiple 과 direct shoot가 형성되었으며, 6주 정도에는 왕성한 생육을 보이며 선발배지에서 자라났다. 그러나 균과 공동배양하지 않은 대조식물체는 전부 고사하였다. 선발된 식물체들은 정단부위를 1cm정도 잘라 cordycepin 50, 100 μ M이 첨가된 배지에 각각 치상하였다. 대조식물체는 모두 고사하였지만 형질전환체는 왕성한 생육을 보여 cordycepin에 의해 생육이 저해 받지 않았다.

6) ADA 유전자의 감자에서 발현 및 새로운 detection 방법의 개발

가) Visible marker 에 의한 형질전환체 선별방법

본 실험에 사용한 형질전환체는 ADA 유전자가 도입된 감자로써 잎 절편을 재분화배지(MS/B5배지에 30g의 sucrose, 0.5 mg/L BA, 0.1 mg/L IBA, AgNO₃ 10 μ M, kanamycin 100 mg/L, claforan 500 mg/L)에 치상하여 형성된 지상부를 형질전환체로 사용하였다. Adenosine deaminase는 bovine spleen type V (Sigma)를 사용하였으며,

9-D-arabinofuranosyl adenine(Ara-A), cordycepin, 2'-deoxyadenosine, adenosine, nitroprusside, phenol등은 Sigma 제품을 사용하였고, xylofuranosyl adenine(Xyl-A)은 캐나다 식물유전공학연구소(PBI, NRC)에서 공여 받았다. 형질전환된 감자조직에서 ADA gene의 존재여부를 확인하기 위해서 PCR (Perkin Elmer Cetus, Fotodyne Incorporated)에 의한 확인방법을 사용하였다. PCR 분석을 위한 빠르고 간편한 DNA 추출방법은 Edwards 등(1991)의 방법에 준하여 수행하였으며, PCR 조건은 96°C에서 2분간 pre-denaturation한 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 2분으로 하여 36 cycle을 수행하였으며, 이어서 72°C에서 15분간 post-extension 시켜 확인하였다. ADA 유전자의 검출을 위한 primer는 sense 5'-ACT-TTG-GCA-AGA-AGA-GAG-GCA-TCG-3'와 antisense 5'-TAG-GGT-GGA-CTT-GAA-GAT-GAG-GGG-3'를 사용하였다. 본 실험에 사용된 감자 형질전환체는 ADA 유전자가 발현되는지를 확인하기 위해서 강력한 독성 adenosine유도체인 Xyl-A에 대한 반응을 조사하고자 감자의 잎을 \varnothing 6mm cork borer을 이용해서 절편을 만들어 사용하였다. ADA효소의 활성분석을 위한 제반요인의 구명하기 위해서 감자 형질전환체로부터 ADA 효소의 활성여부를 색깔변화로 확인하기 위해서 Hopkinson (1969) 방법을 약간 변형해서 plate위에서 색깔반응을 조사하였다. 우선 형질전환절편의 크기에 따른 ADA의 활성을 조사하기 위해서 1X, 1/2X, 1/4X 1/8X로 절편을 절단하여 adenosine이 함유된 plate의 well에 넣고 30분 및 60분간 배양한 후 색깔의 변화를 관찰하였다. 특히 모든 색깔의 변화가 ADA 효소에 의한것인지 아니면 다른 요인 때문에 일어나는 현상인지를 조사하기 위해서 ADA 효소의 inhibitor인 deoxycoformycin을 처리하여 발색여부를 조사하였다. Substrate로 사용되는 adenosine 용액의 pH별(pH 5.5에서 9.5), adenosine의 농도별(1mM에서 20mM), adenosine의 substrate의 종류별(adenosine, 2'-deoxyadenosine, cordycepin, Ara-A, Xyl-A)로 처리하여 색깔의 변화여부를 조사하였다. 색깔의 반응은 50 μ L phenol nitroprusside reagent (5.04 g phenol, 40 mg sodium nitroprusside/100 mL H₂O)를 넣고 현탁한 후 바로 50 μ L의 alkaline-hypochlorite reagent (0.6M NaOH에 0.125%의 sodium hypochlorite첨가)를 넣고 잘 혼합하여 30분간 37°C에서 배양하여 발색시켰다(Fig. 12).

나) ADA activity에 의한 선별방법

Adenosine deaminase(E.C.3.5.4.4, ADA)효소는 adenosine을 inosine과 암모니아로 변환시키는 효소로서 적혈구나 조직내에서는 서로 다른 isoenzyme을 가지고 있고, 동물세포에는 어느 부위에나 존재하지만 장내 점액질부위와 비장에서 활성도가 가장 높다(Weyden and Kelley, 1977; Giusti, 1974). 특히 사람의 경우에는 ADA 효소의 부족시 심한 면역결핍증(immunodeficiency)을 유발하지만(Kellems et al., 1985; Yeung et al., 1983) 식물세포에는 전혀 존재하지 않는다(Fox and Kelley, 1978; Yeung et al., 1985). 그러나 최근 Yang(1995)등은 식물유전공학기법을 이용하여 mouse ADA cDNA를 연초조직에 형질전환시켜 동물세포유래 유전자가 연초식물체에서도 훌륭히 발현되었음을 확인한 바 있다. 또한 ADA 유전자를 연초조직의 형질전환시 표지유전자로 사용할 수 있음을 보고함으로써(Yang et al., 1995), 앞으로 많은 식물체에서 ADA 유전자가 표지유전자로 사용가능함을 제시하였다. 현재 사용되고 있는 식물형질전환용 표지유전자는 대부분 그 활성도를 측정하기 위해서 방사성동위원소를 사용해야 하며 측정방법도 매우 까다로워(Herrera-Estrella and Simpson, 1988) 시스템이 완전히 갖추어져 있지 않은 실험실에서는 표지유전자의 활성도를 측정하기가 쉽지 않은 형편이다. 따라서 많은 식물체의 형질전환과 형질전환체의 조기선발을 위해서 사용했던 표지유전자의 간편하고 신속한 활성도의 측정방법이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 식물체내에서 ADA 효소의 활성도 측정방법은 사람조직에서는 여러가지 방법으로 조사하였으나(Klenow, 1952; Koerber et al., 1975; Martinek, 1963; Seegmiller et al., 1980), 식물조직에서는 전술한 바와 같이 ADA 효소가 존재하지 않으므로 현재까지 측정된 바가 전혀 없다. 따라서 본 실험은 ADA 유전자에 의하여 형질전환된 감자조직을 이용하여 ADA 효소의 측정을 위한 간편한 추출방법과 측정방법을 확립하고자 이에 미치는 제반요인을 조사하였다. Adenosine 유도체를 녹일 때에는 모두 물로 녹였으며 농도는 20 mM로 stock solution을 만든 다음 희석하여 사용하였고 잘 녹지 않은 유도체의 경우에는 약간 열을 가하여 녹였다. 감자형질전환체로 부터 ADA 효소의 활성도를 측정하기 위해서 Hopkinson (1969) 방법을 약간 변형해서

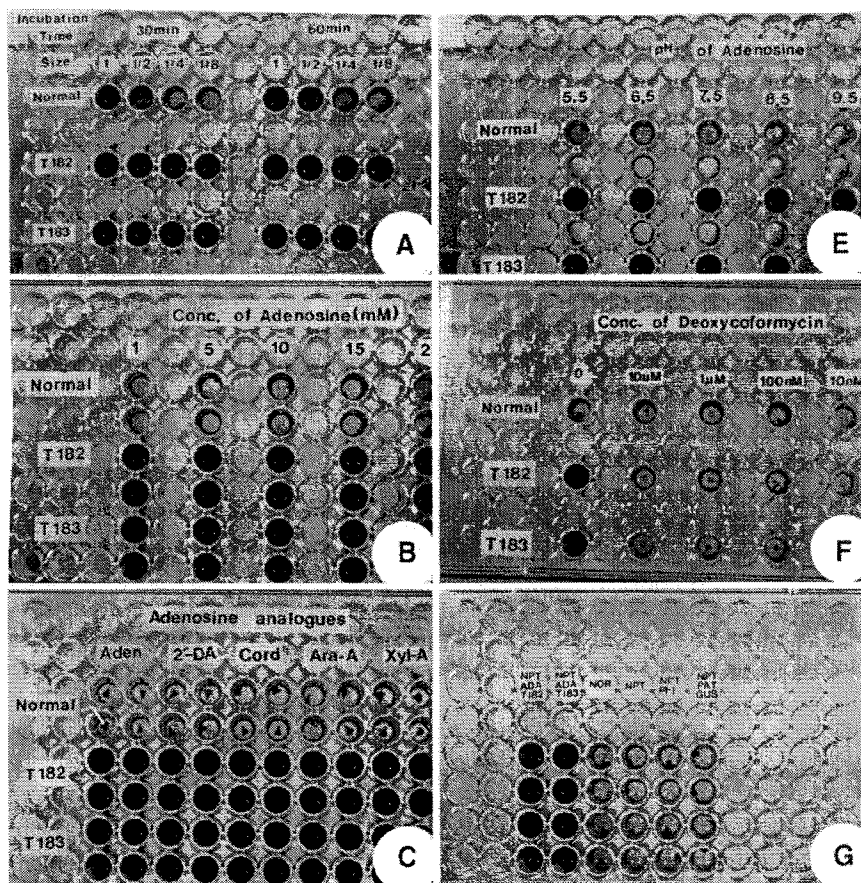


Figure 12. Color change according to various condition of potato transformant on the plate : A, explant size and incubation time; B, concentration of adenosine solution; C, various adenosine analogues(Aden, adenosine; 2'-DA, 2'-deoxyadenosine; Cord, cordycepine; Ara-A, arabinofuranosyl adenine; Xyl-A, xylo- furanosyl adenine); E, pH of adenosine solution as substrate; F, effect of 2'-deoxycytosine on the inhibition of adenosine deaminase activity on the plate; G, transgenic plants with various foreign DNA.

Berthelot 반응을 이용하여 형질전환된 감자조직과 그리고 정상조직의 잎을 이용하여 수행하였다. 효소의 추출은 직경 6 mm의 cork borer를 이용하여 잎절편 2개를 채취한 후 1.5 mL eppendorf tube에 넣고 우선 50 μ L의 추출용액을 가한 후 플라스틱봉 (Pellet pestle disp w/tube, Kontes, Scientific glassware/ instruments)을 드릴에 장착하여 4°C 하에서 10초 간격으로 30초간 미세하게 갈았으며, 다시 1,450 μ L 추출용액을 첨가하고 vortexing 한 후 12,000 g에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액 1,400 μ L를 취하여 효소측정에 사용하였다. 추출용액은 50 mM phosphate buffer (4.73 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5.62 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ in 1 L boiled water)를 사용하였으며 추출용액의 최적조건을 조사하기 위해 pH 6.5와 7.5로 나누어 사용하였다. 효소의 측정은 기질로써 우선 adenosine 용액을 사용하였으며 300 μ L의 용액을 eppendorf tube에 넣고 이어 100 μ L의 추출한 효소용액을 가한 후 반응시켰다. 반응온도는 25°C와 37°C로 조절하였으며 반응시간은 각각 30분과 60분으로 하였다. 또한 효소활성도에 미치는 기질로써 adenosine 유도체의 영향을 조사하기 위해서 adenosine, 2'-deoxyadenosine, cordycepin, Ara-A, Xyl-A를 20 mM처리하여 사용하였다. 또한 효소활성도에 미치는 adenosine의 농도 및 pH의 영향을 조사하기 위해서 adenosine의 농도를 1, 5, 10, 15, 20 mM로 낮게 조절하였고 pH는 5.5에서 1.0간격으로 pH 9.5까지 조절하여 처리하였다. 반응의 정지는 ice box에서 400 μ L phenol nitroprusside reagent (5.04 g phenol, 40 mg sodium nitroprusside/100 mL H_2O)를 넣고 현탁한 후 바로 400 μ L의 alkaline-hypochlorite reagent (0.6 M NaOH에 0.125%의 sodium hypochlorite첨가)를 넣고 잘 혼합하여 30분간 37°C에서 배양하여 색깔을 발색시켜 spectrophotometer의 635 nm에서 흡광도를 측정하여 감자형질 전환체 잎의 단위면적 (cm^2) 당 활성도로 환산하였다. 형질전환된 감자 잎조직과 정상잎조직을 이용하여 ADA 효소활성도의 측정을 위한 제반 요인을 구명하기 위해서 우선 조직에서 효소추출을 위한 용액의 적정 pH, 그리고 adenosine를 inosine과 암모니아로 변환시킬 때의 반응시간과 반응온도를 조사한 결과는 Table 14와 같다. 정상조직의 경우에는 ADA의 활성도가 합계 2 E635/ cm^2 이상을 넘지 못하였지만 형질전환체의 경우에는 모두 100 E635/ cm^2 이상을 넘어 매우 높은 활성도를 나타

내었다(Table 14). 조건별로는 다소 차이가 있었는데 효소추출용액의 산도는 pH 6.5와 pH 7.5사이에는 커다란 차이가 없었으나 합계에서 보느냐와 같이 pH 7.5가 다소 양호한 경향을 보였다. 반응온도별로는 buffer pH 6.5일때 반응시간 30분 및 60분에서 25°C일 때 각각 97.8 E635/cm², 199.3 E635/cm²보다 37°C일 때 121.1 E635/cm², 239.1 E635/cm²로 2배 가량 높은 효소활성도를 나타내었고, buffer pH 7.5에서는 반응시간 30분 및 60분에서 25°C일 때 각각 111.3 E635/cm², 214.9 E635/cm²이었고, 37°C에서는 123.5 E635/cm², 251.8 E635/cm²로 더 높은 효소활성도를 나타내었다(Table 14). 또한 반응시간별로도 30분에 비해 60분에서는 약 2배 가량 높은 효소활성도를 나타내어(Table 14) 반응시간을 5분에서 60분까지의 흡광도와와의 상호 상관관계를 조사하였던 바(Figure 13), 상관함수는 $Y=0.9639X - 0.7439$ 이었으며, $r=0.9983$ 으로 고도의 정의 상관을 나타내었다.

Table 14. Adenosine deaminase activity of wild type and transgenic potato plant according to extraction buffer pH, reaction time and reaction temperature by spectrophotometer.

(Unit: E635/cm²)

Reaction		Buffer pH			
Time (hr)	Temperature (C)	6.5		7.5	
		Normal	Transgenic	Normal	Transgenic
30	25	0.47	97.8	0.50	111.3
	37	0.51	121.1	0.51	123.5
60	25	0.49	199.3	0.54	214.9
	37	0.53	239.1	0.53	251.8

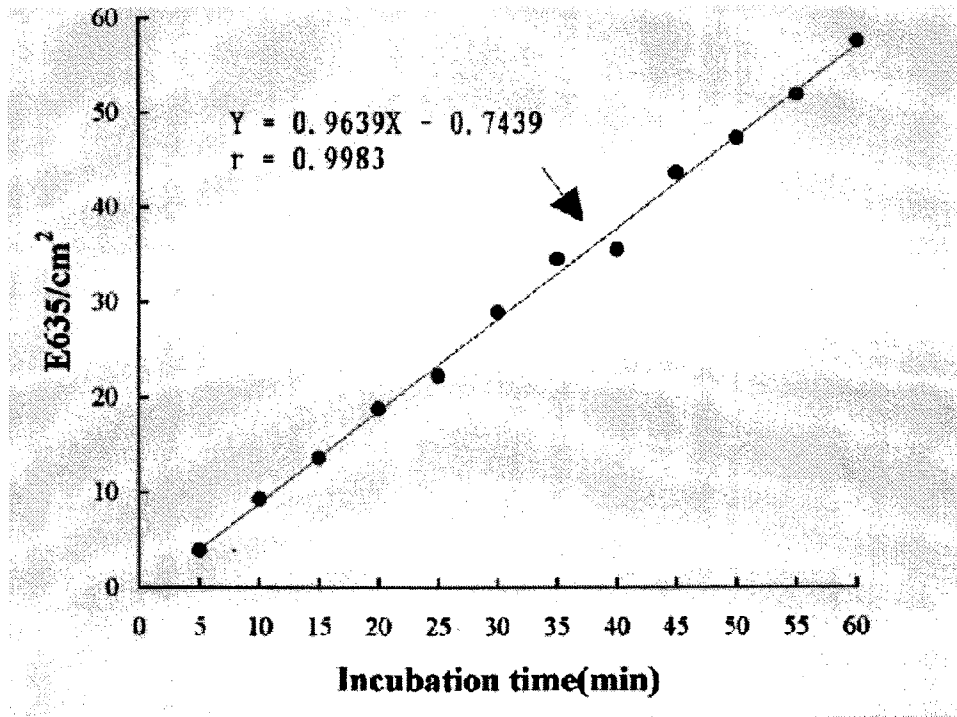


Figure 13. Typical calibration curve of the incubation time on activity of adenosine deaminase of transgenic potato plant.

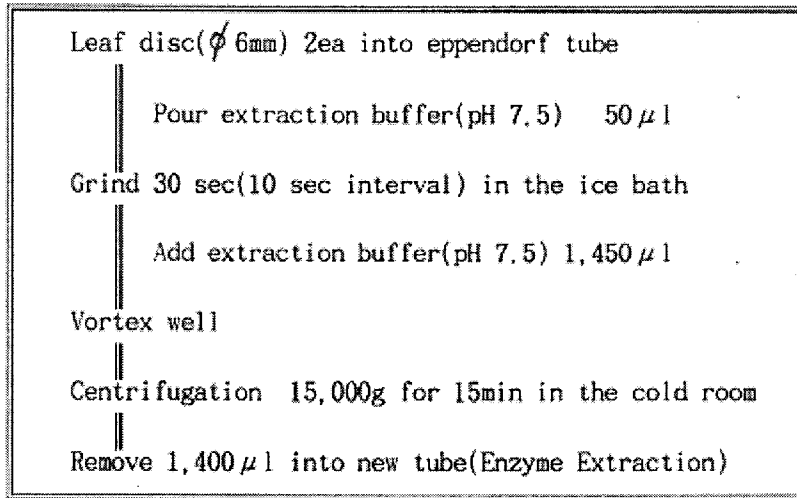
자연 상태에서는 ADA 효소가 식물세포에는 존재하지 않지만(Fox and Kelley, 1978; Yeung et al., 1985), Yang(1995)등에 의하여 개발된 vector system로 ADA 유전자가 식물세포의 형질전환용 표지유전자로 사용된다면 많은 형질전환체에서 ADA 효소활성도를 신속하고 간단한 방법에 의하여 측정할 수 있는 방법이 필요할 것으로 생각된다. 그러나 선천적으로 ADA 효소를 가지고 있는 동물조직의 경우 ADA 효소측정을 위해서 가장 일반적으로 사용해 온 방법이 adenosine을 기질로 하여 생성된 inosine의 함량을 265 nm에서 조사하는 방법인데 이 방법은 inosine의 순수분리를 잘해야 좋은 결과를 얻을 수 있어 간단한 추출방법에 의해서는 spectrophotometer에 나타나는 수치가 매우 차이가 심한

편이다(Koorber, 1975; Martinek, 1963). 또한 NAD(P)H-coupling 방법(Ellis and Goldberg, 1970; Heinz et al., 1980)과 방사선으로 표지된 기질을 이용하여 radiometric assay 방법(Meier and Conscience, 1980)등이 이용되고 있으나, 방법이 복잡하고 방사선동위원소를 사용해야 하므로 간편하게 사용하기에는 다소 문제점이 있을 것으로 사료되는 바, ADA가 adenosine을 inosine으로 변환시킬 때 암모니아가 방출되므로 암모니아의 함량을 조사하여 ADA의 활성도를 조사하는 것이 비교적 간편하며 신속하고(Hjemdahl-Monsen et al., 1977; Giusti, 1974) 방사선동위원소를 사용하지 않아도 가능하므로 이 방법을 사용하는 것이 매우 효과적일 것으로 생각된다. 특히 암모니아는 phenol를 알칼리성 용액과 sodium hypochlorite가 함유된 용액내에서 매우 진한 청색의 indophenol로 변화시킴으로 쉽게 spectrophotometer 635 nm에서 측정할 수 있어(Hopkinson et al., 1969), 일반실험실에서도 누구나 쉽게 ADA 활성도를 조사할 수 있는 방법으로 생각된다. 그래서 본 실험은 Hopkinson(1969) 방법을 약간 변형하여 ADA의 활성도를 조사하였던 바, 형질전환된 감자 잎에서 훌륭히 ADA 활성도를 측정할 수 있었으며 이런 결과는 최초로 식물에서 spectrophotometer에 의한 ADA 효소의 활성도를 조사한 결과라고 생각된다. 특히 본 실험결과 ADA의 활성도측정을 위한 최적조건은 추출용액의 산도가 pH 7.5에서, 효소 반응시간과 반응온도는 각각 30분 및 37°C에서 하는 것이 가장 좋을 것으로 사료되었다.

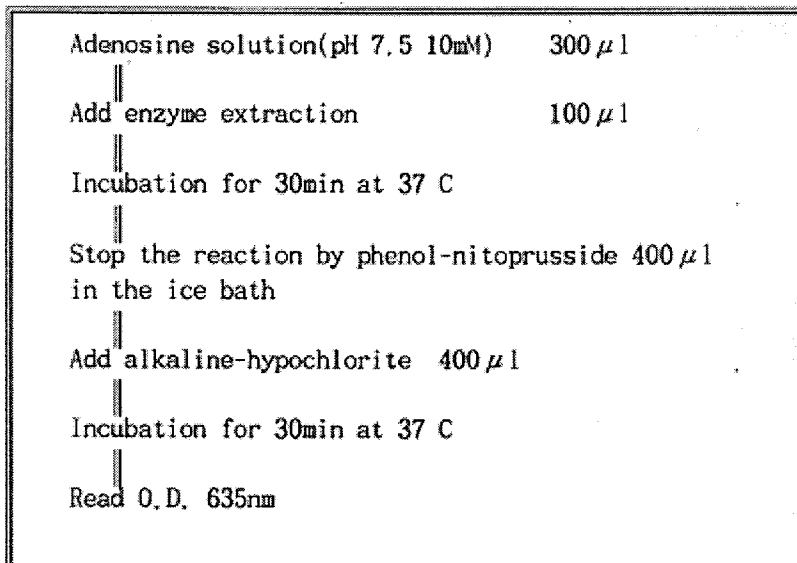
상기 결과를 종합하면 형질전환된 감자조직으로 부터 ADA 효소의 활성도를 측정하기 위한 가장 적절한 효소의 추출방법과 활성도측정방법은 Figure 14와 같다. 즉 간편하게 eppendorf tube를 이용하여 활성도를 측정할 수 있도록 형질전환조직의 잎을 직경 6 mm의 cork borer를 사용하여 2개의 절편으로 만든 다음 50 μ L의 추출용액 (phosphate buffer pH 7.5) 이 들어 있는 eppendorf tube에 넣고 얼음이 담겨져 있는 작은 상자 안에서 10초 간격으로 30초간 플라스틱봉으로 분쇄한다. 이어 1,450 μ L의 추출용액을 추가로 넣으면서 플라스틱봉을 깨끗이 세척

하고 바로 10초간 vortex mixer를 사용하여 잘 현탁한다. 그러나 추출용액을 첨가할 때에는 식물에 따라 차이가 있을 수 있으므로 사전에 예비 실험을 수행한 후 최종적으로 추출용액의 함량을 결정해야 한다. 이어서 현탁된 용액을 4°C의 microcentrifuge에서 12,000 g로 15분간 원심분리한 후 상등액을 효소용액으로 사용한다. 효소의 활성도측정은 기질로 adenosine을 사용하며 농도는 5 mM, pH는 7.5로 조절하여 만든 용액 300 μ L를 eppendorf tube에 넣고 상기 방법에 의하여 추출한 효소용액 100 μ L를 가한 다음 37°C의 수조에서 30분간 반응시킨다. 반응의 정지는 ice box에서 반응액에 400 μ L의 phenol-nitroprusside 용액을 넣고 현탁한 후 바로 alkaline- hypochlorite 용액을 동량 첨가하여 잘 혼합한 후에 30분간 37°C의 수조에서 배양하여 색깔을 발색시킨다. 효소활성 정도는 spectrophotometer의 635 nm에서 흡광도를 측정하여 감자 형질전환체 잎의 단위면적 (cm^2) 당 1시간 반응으로 활성도를 환산한다 (E635/hr/cm^2). 혹은 추출한 효소액의 일정량을 취하여 단백질의 함량을 측정하여 mg 당 단백질의 함량으로 활성도를 환산할 수 있다 ($\text{E635/hr/mg protein}$).

Extraction of Enzyme



Assay of ADA from Enzyme solution



Figur 14. Optimum condition for extraction (A) and assay (B) for determination of adenosine deaminase activity by spectrophotometer from transgenic and normal plants in *Solanum tuberosum*

감자 형질전환체와 정상식물체의 총단백질은 각각의 잎 50 g를 0.1%의 2-mercaptoethanol (V/V) 과 5 mM EDTA을 함유하고 있는 0.2 M HEPES (pH 7.5) 용액 100 mL로 Waring blender에서 추출하였다. 다시 추출액을 18,000 g에서 20분간 원심분리하여 70% 포화 ammonium sulfate를 이용하여 침전시킨 후 30%의 glycerol (W/V)과 0.1%의 mercaptoethanol을 함유하고 있는 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 용액에 최소량으로 녹인 후에 같은 용액으로 4°C 냉장고에서 하룻밤동안 dialysis 하였다. Dialysis된 효소를 다시 anion-exchange fast performance liquid chromatography (Mono Q HR16/10, Pharmacia) 방법에 의해서 정제하였다(Yang et al., 1995). 형질전환체와 정상감자에서 정제된 효소와 bovine spleen 에서 추출한 Sigma 제품인 ADA 효소를 함께 15% Native PAGE - 즉 15%의 mini slab gel에 100 µg의 단백질을 loading 한 후 overnight running - 에서 각각 2개씩 전개하였다. 전개된 gel 한 개는 Coomassie Blue R-250으로 염색하고 나머지 한 개는 1 mm간격으로 절단한 후 절편을 eppendorf tube에 넣어 상기 실험에서 확립된 조건으로 ADA 활성도를 측정하였다. 형질전환된 감자잎에서 ADA 효소를 분리하기 위해서 70% ammonium sulfate 침전법 및 anion-exchange fast performance liquid chromatography (Mono Q HR16/10, Pharmacia) 방법에 의해서 정제한 후 bovine spleen 에서 추출한 Sigma 제품 ADA 효소와 함께 15% Native-PAGE에서 각각 2개씩 전개하여 한 개씩을 Coomassie로 염색하고, 또 한 개는 1 mm 간격으로 절단한 후 상기 실험에서 확립된 조건으로 ADA 활성도를 측정하였다(Figure 15). Sigma 제품인 bovine ADA isoenzyme에서는 약 35 kD, 32 kD, 31 kD, 30 kD위치에 4개의 band를 관찰할 수 있었으며, 3번째의 band (약 31 kD) 에서 ADA 활성도가 가장 높게 나타났다(Figure 15-A). 반면에 정상식물에서는 어느 위치에서나 전혀 ADA 활성도를 나타내는 band를 관찰할 수 없었지만(Figure 15-B), 감자 형질전환체에서는 bovine spleen의 경우 2번째 band에서 나타난 약 32kD 위치에 한 개의 매우 높은 ADA 효소활성도를 나타내는 band를 관찰할 수 있었다(Figure 15-C). Fox and Kelley(1978)의 보고처럼 식물체에서는 ADA 효소가 전혀 존재하지 않음을 재확인할 수 있었다. 또한 형질전환체에서 ADA 효소의 추출 및 정제는 70% ammonium sulfate 침전과

dialysis, 그리고 Mono Q anion-exchange chromatography를 이용한 것이 매우 양호함을 알 수 있었다. 특히 본 실험에서 ADA 활성도의 측정은 감자 형질전환체에서 획득한 틀림없는 ADA 효소를 추출하여 활성도를 측정하였음을 의미한다. 결국 본 실험 결과로 Yang등(1995)에 의하여 개발된 ADA 유전자를 식물세포의 형질전환용 표지유전자로 사용할 경우 형질전환체에서 spectrophotometer를 이용하여 매우 간편, 간단하고 신속하며 값싼 가격으로 편리하게 ADA 효소활성도를 측정할 수 있을 것이다.

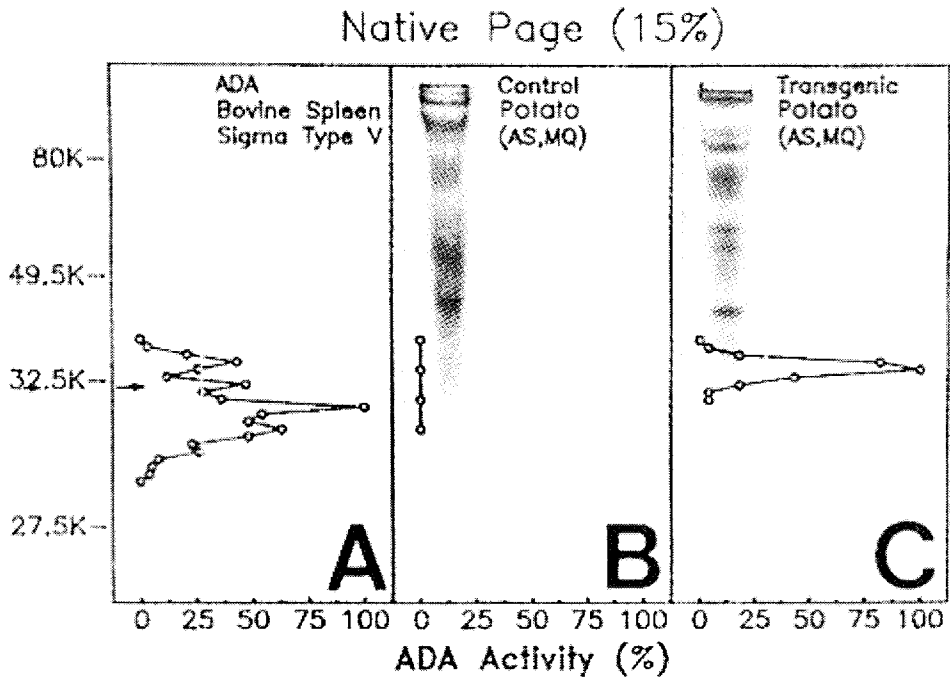


Figure 15. Native-PAGE (15%) separation, and activity determination of mouse ADA expressed in potato. Lanes were loaded with samples from isoenzyme (Sigma type V) of bovine spleen (A), wild type (B) and transgenic potato (C) that had been preprocessed by ammonium sulfate (AS) precipitation and Mono Q (MQ) chromatography.

7) Adenosine deaminase를 대량생산하는 감자의 특성 검정

가) 형질전환체의 특성검정

형질전환된 감자조직에서 ADA 유전자의 존재여부의 확인은 ADA 유전자가 식물체에서 발현되면 adenosine을 기질로 하였을 때 형성되는 암모니아와 inosine중에서 암모니아를 phenol로 plate 위에서 바로 채집하여 색깔의 변화를 Yang의(1994) 방법을 사용하였다. Adenosine solution을 50 μ L 취하여 plate에 담고 형질전환체의 잎을 6 mm punch로 자른 후 1/8등분한 조각을 adenosine solution에 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응을 중지시키기 위하여 phenolnitroprusside 50 μ L 와 alkaline-hypochlorite 50 μ L를 첨가하고 37°C에서 30분간 incubation 시켰을 때 나타난 blue 색을 대조구와 비교하여 형질전환체로 선발하였다. 발색반응시 나타난 색이 ADA 유전자의 발현에 의한 것이 아니고, 정상 식물체의 암모니아에 의하여 나타난 것인지 확인하기 위하여 ADA 효소의 억제제인 deoxycoformycin을 농도별로 첨가하여 조사하였다. 또한 각각 발색정도를 다르게 나타낸 반응액을 635 nm에서 흡광도를 측정하여 형질전환체의 ADA 활성도를 조사하였다. 발색반응에 의하여 선발된 형질전환체를 PCR (Perkin Elmer Cetus, Fotodyne Incorporated) 방법을 사용하여 형질전환체로 추정되는 식물의 genomic DNA 내의 ADA 유전자의 존재여부를 확인하였다. Edwards 등(1991)의 방법에 따라 식물체로부터 DNA 를 추출하였고 PCR 조건은 96°C에서 2분간 pre-denaturation한 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 2분으로 하여 36 cycle을 돌렸으며, 이어서 72°C에서 15분간 post-extension 시켰다.

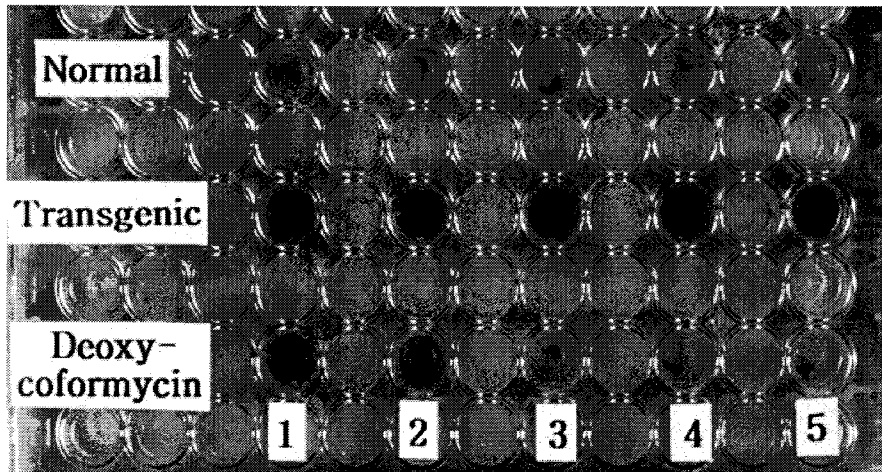


Fig. 16. The effect of deoxycoformycin for inhibition of ADA gene in transgenic and control potato calli(1, 2pM; 2, 20 pM; 3, 200 pM; 4, 2nM; 5, 20 nM).

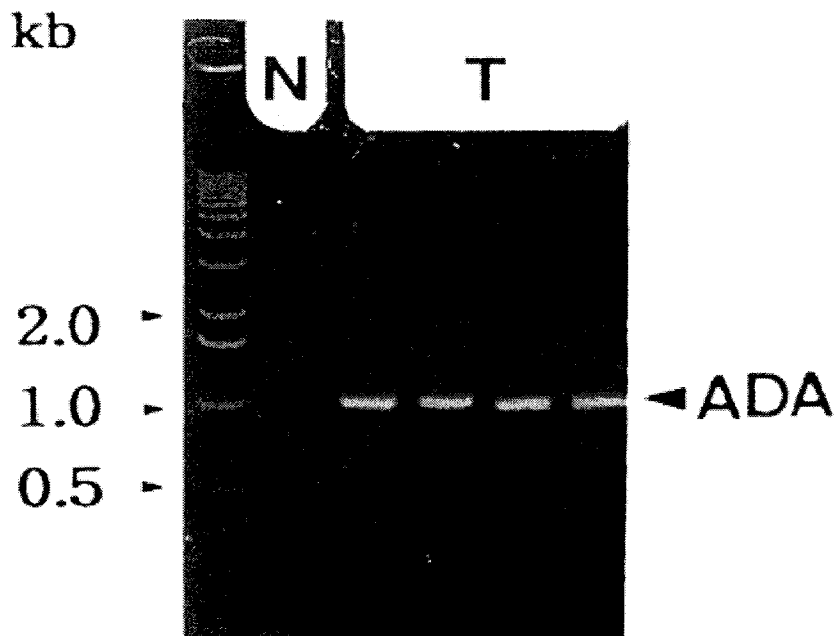


Figure. 17. Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products of the adenosine deaminase gene in transgenic (T) and nontransgenic (N) potato plants.

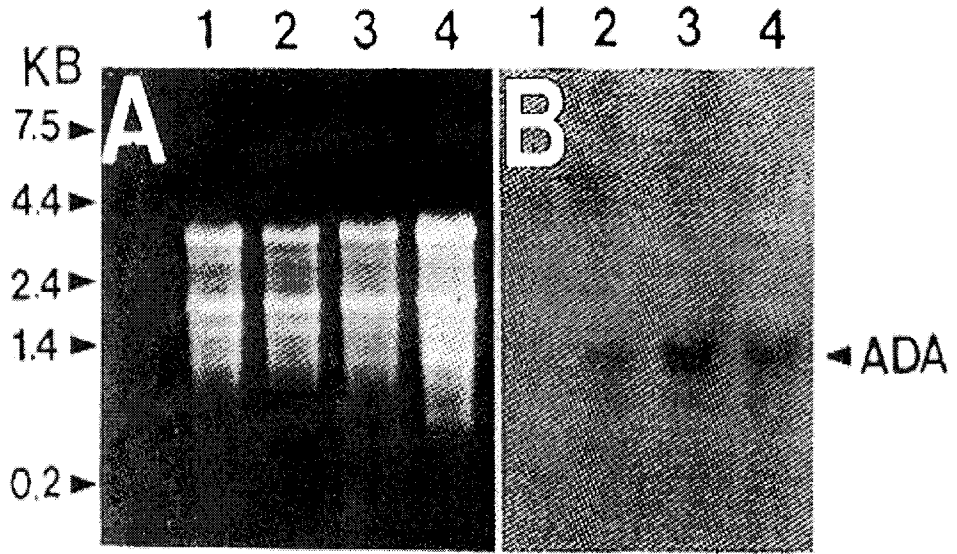


Fig. 18. Northern hybridization(B) of total RNA(A) isolated from transgenic and normal potato plant. 10 μ g total RNA was electrophoresed, blotted and then hybridized with the ADA cDNA as a probe.

나) Somaclonal variation에 의한 ADA고함유 세포주의 선발

ADA 표지유전자를 함유한 *Agrobacterium tumefaciens*에 의하여 감자조직을 형질전환시키기 위해서 leaf disc를 이용한 공동배양 방법을 사용하였다. 2,4-D가 첨가된 동시배양 배지에서 2일간 배양한 후 정상조직은 모두 고사하는 조건인 Xyl-A 50 μ g/mL 과 공동배양 후 살아 있는 *Agrobacterium*를 제거하는 조건인 carbenicillin 500 μ g/mL이 함유되어 있는 배지에서 1차적으로 callus를 분화시켰다. 다시 callus를 잘게 조각낸 후, 상기 동일고체배지에서 형질전환체를 성장상태에 따라서 성장속도가 빠른 50개의 세포주를 재선발하였다. 형질전환된 감자세포주에서 DA 유전자의 도입여부를 확인하기 위해서 ADA 유전자가 식물체에서 발현되면 adenosine을 inosine로 변환시키면서 방출되는 암모니아를 바로 채집하여 색깔로 변화시키는 방법을 이용하였다. 본 실험결과 50개의 세포주중에서 다만 20개의 세포주만이 형질전환체로 나타났다. 그러나 대조식물체 자체로 지니고 있는 내재 암모니아가 있으므로 검정시 나타난 blue색이 ADA 유전자의 발현에 의한 것이 아니고 대조식물

체의 암모니아에 의하여 나타나는 경우가 있기 때문에 형질전환체 20종과 대조식물체를 대상으로 ADA 효소의 억제제인 deoxycoformycin을 첨가하여 조사한 결과 대조식물체의 조직에서는 모두 색깔변화가 일어나지 않았고, deoxy-coformycin을 첨가하지 않은 형질전환체는 모두 색깔변화가 일어났다. 그러나 deoxycoformycin을 20pM 이상 첨가한 형질전환체에서는 색깔이 변화되지 않아 색깔의 변화가 ADA에 의하여 나타남을 확실히 확인시켜 주었다. 따라서 상기 확인된 고체배지에서 생장한 callus를 다시 Xyl-A현탁배지에 계대배양하여 다시 고체배지에 배양하여 단일 세포군을 선발한 후 세포주로 활용하였으며 상기 동일방법에 따라 형질전환체를 재확인하였다. 총 20개의 형질전환체중에서 ADA activity를 조사하였던 바 ADA-5세포주에서 가장 높은 ADA 활성도를 가지고 있었다(Table 15)

Table 15. Spectrophotometric measurement of ADA activity in transgenic potato plants

(K units/hr.mg protein)

Plant	ADA Activity ^a	Plant	ADA Activity
3	19.52	28	19.88
5	34.86	31	19.52
11	19.85	41	9.54
19	26.78	47	19.18

^a Enzyme assay and definition of unit activity are described in materials and methods.

다) 선발된 세포주의 재분화

상기 단일세포군으로 나타난 감자 callus조직을 재분화배지에서 계대하면 4-6주 후에는 shoot를 형성하였으며, 형성된 shoot를 절단하여 발근배지에 옮겨 뿌리를 유도한 후에 토양에 이식하여 순화시켰다(Fig. 19).

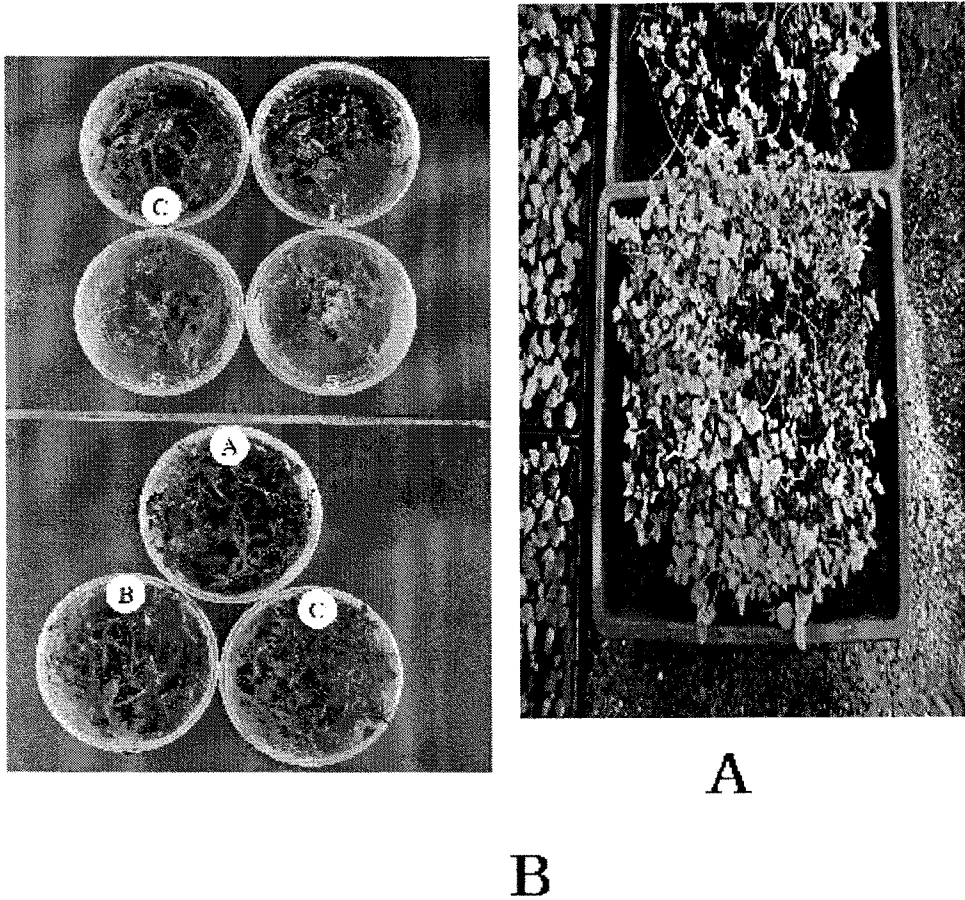


Figure 19. Transgenic potato shoot with ADA gene introduced grown on the regenerative media(A), Mature transgenic potato plants grown in soil (B).

다) 항바이러스물질인 Ribavirin에서 형질전환체의 내성 조사

식물조직배양시 사용되고 있는 항바이러스제인 Ribavirin에 대한 감자형질전환체의 내성 여부를 조사하였던 바, Ribavirin이 100 μ M 과 200 μ M이 함유된 배지에서도 형질전환체의 경우에는 생장이 왕성하였으나 정상 감자 유식물체의 경우에는 100 μ M에서도 모두 고사하였다. 이런 결과는 ADA유전자가 감자에 정상적으로 도입되어 발현이 되고 있음을 의미하며 항바이러스제로 사용된 Ribavirin이 함유된 배지에서 3-4회 계대배양함으로 성장점 채취시 감염되었을지도 모르는 바이러스가 거의 증식되지 못하고 결국은 왕성하게 성장하는 성장점부위를 다시 절단함으로써 진정 바이러스무병 감자를 생산할 수 있었다. 따라서 상기 유도된 바이러스무병 감자로 생각된 유식물체에서 작년에 개발한 RT-PCR에 의한 바이러스 감염조사를 하였다. 결과 control로 사용된 식물체에서는 PLRV가 검출되었으나 기내에서 개발된 감자에서는 전혀 바이러스가 검출되지 않았다(Fig. 20)

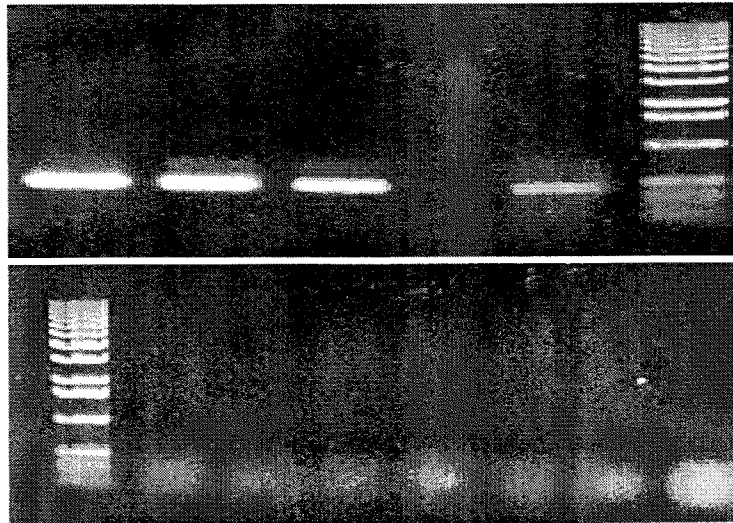


Fig. 20. Confirm of PLRV virus(upper) and check of PLRV from potato transgenic plant cultured on the ribavirin contained media(bellow)

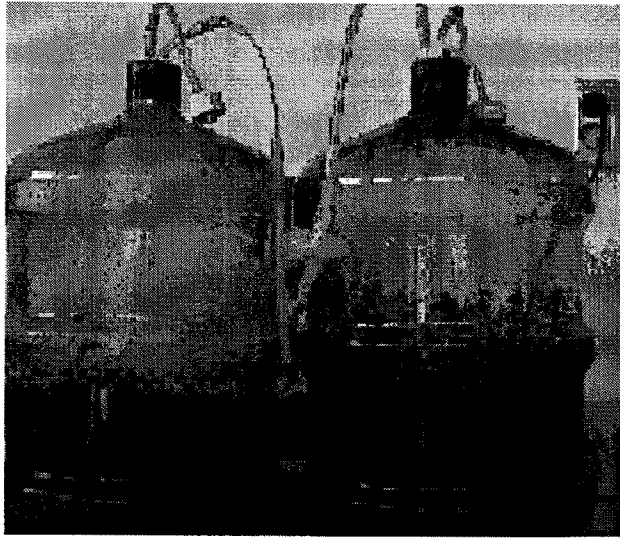
나. Tank 배양 기술의 확립과 실용화 및 유묘의 대량생산 공정개발

1) 유식물체의 tank내에서의 생육최적조건 확립

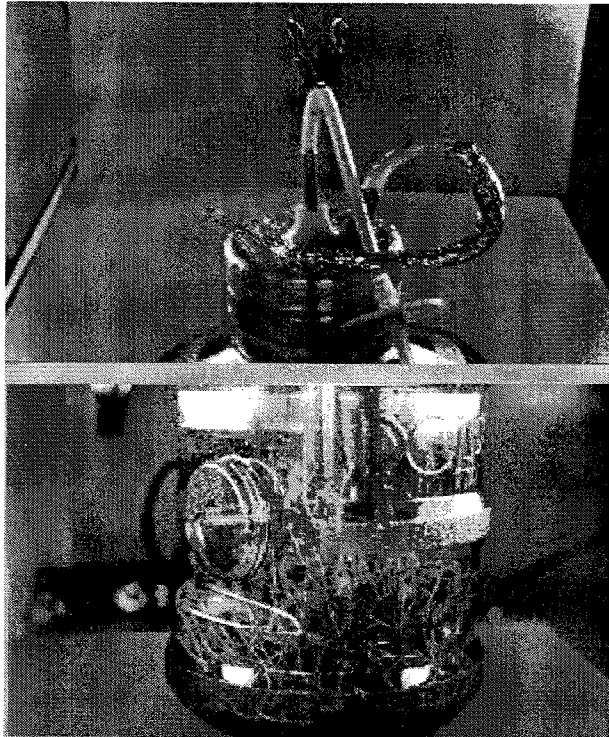
가) 대량배양기를 이용한 감자의 배양

ADA 유전자에 의하여 형질전환된 감자의 대량배양을 위해서 탱크 배양을 통한 대량생산이 요구되는 바, 기존의 소규모의 플라스크수준을 지양하고 대량의 리액터를 이용한 감자의 유식물체의 생산을 위해서 사용될 용기는 일반 생수통을 변형하여 사용하였다. 본 실험결과 20리터 리액터를 이용하여 매우 많은량을 감자유식물체를 대량으로 생산할 수 있는 가능성을 확인하였다. 따라서 ADA유전자가 도입된 감자 형질전환체를 본 20리터 리액터를 이용하여 배양한 후 수확도 용이하게 할수 있었다. 그러나 바이오리액터의 가격이 너무 비싸 싼가격에 의해서 기내 대량배양을 위해 15리터 생수통을 이용하여 배양할 수 있는 배양시스템을 개발하였다. 감자의 탱크배양에 사용될 용기는 일반 생수통을 변형하여 사용하였던 바, 매우 많은량을 대량으로 생산할 수 있었다. 그러나 기존의 생수통의 경우에는 입구가 너무 작아서 배양후 회수가 매우 어려웠다. 따라서 입구가 커다란 통을 이용하여 배양한 결과 배양도 양호하였지만 배양 후 수확도 용이 하였다(Fig. 21).

본 용기는 우선 일반 생수통보다 입구의 크기가 크며 뚜껑부위에 공기주입기와 밴트시스템을 동시에 부착하여 매우 간편하게 작업을 할 수 있도록 조작하였다(Fig. 21). 스파자 부분은 스테인레스를 이용하여 공기미세분출을 위해 매우 작은 구멍을 뚫고 원형으로 조립하여 바로 공기가 유입될수 있도록 만들었다. 또한 뚜껑의 단힘부위가 확실하지 않아 오염율이 높았으나 O-ring type를 변경하여 오염이 되지 않은 새로운 시스템을 개발하였다. 배양방법은 공기 주입시 3중으로 필터 시스템을 달고 마지막으로 membrane filter를 달아 오염율이 거의 없게 하였다.



A



B

Fig. 21. Bioreactor for potato shoot culture. Old system(A) is difficult for harvest of cultured shoots, however new system(B) is good for harvest.

나) 기내배양묘의 토양 활착가능성

본 방법에 의해서 수확된 바이러스 무병감자를 유묘의 경삼방법에 의해서 발근을 유도하여 괴경의 형성등을 관찰하고자 하였다(Fig. 22).

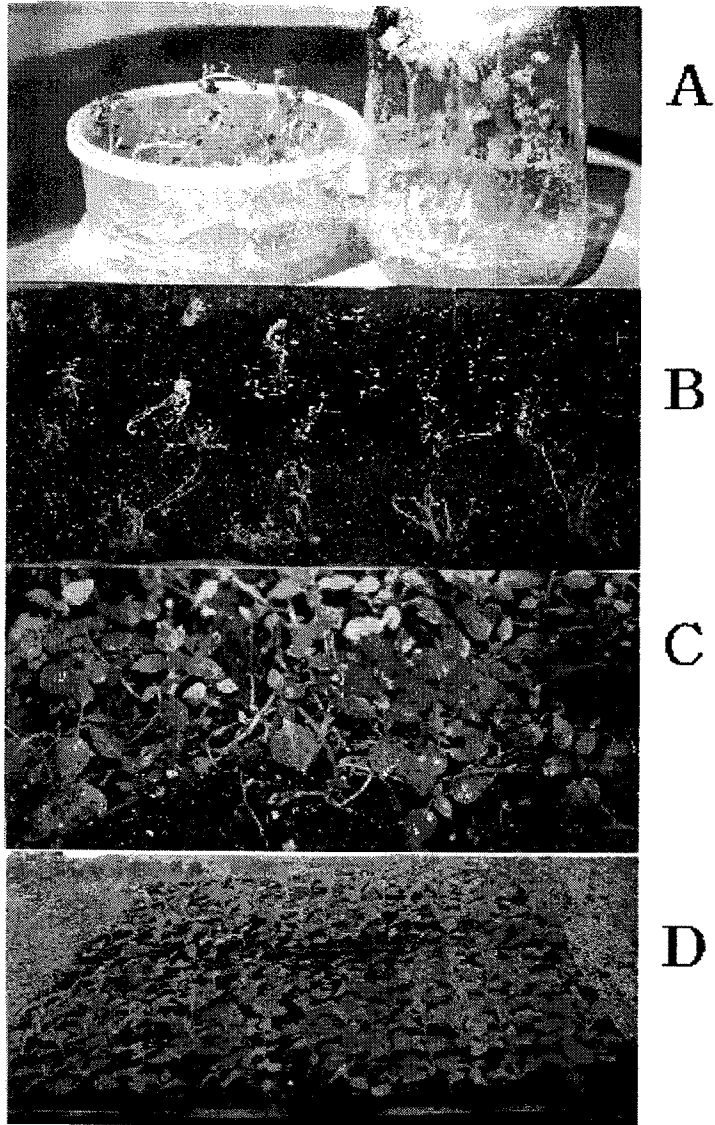


Fig. 22. From *in vitro*(A) to the soil(B-D) of transgenic potatoes. Transgenic potato plantlet cultured in the container *in vitro*(A) and transfer to the soil(B), after 15days planting(C) and stem cutting in the pots(D).

기내에서 배양된 감자의 유식물체(Fig. 22-A)에 부착되어 있는 agar를 깨끗이 닦아내고 토양에 재식하였으며(Fig. 22-B), 이식 30일 후에는 많은 지2상부가 형성되었으며(Fig. 22-C), 여기에서 형성된 많은 shoots를 다시 cutting하여 이식상에 옮긴결과 성공적으로 생장이 가능함을 확인할수 있었으며(Fig. 22-D), 이식의 편리상 고체배양보다 현탁배양이 훨씬 양호할것으로 판단되었으며, 대량 배양기를 사용하여 지상부를 많이 생산할 경우 기내묘의 삽목을 이용한 유식물체의 생산이 경제성을 맞출 수 있을것으로 생각되었다.

2) 유묘의 경삼방법 및 발근 조건 확립

가) 기내묘의 경삼에 미치는 제조조건 조사

본 실험에서 사용한 감자의 품종은 1차 예비실험에서 추작재배로 가장 많이 사용하고 있는 대지마(*Solanum tuberosum* L.)를 공시재료로서 조직배양중인 기내 유식물체를 인공토양에 순화후 모식물로 활용하여 경삼을 시도하였다. 경삼묘의 성공률 증대를 목적으로 경삼시 부패방지 및 생육촉진을 위하여 살균제(다이센M-45)와 회토등을 각각 조합처리하여 인공토양에 혼합 후 이를 128공의 삽목판에 투입후 처리구별 초장과 근장을 조사하였고, 완전한 경삼묘를 인공토양에 이식하여 처리구별 생산량을 이식 후 80일에 조사하였다. 바이러스의 검사는 수확 일주일 전에 감자의 잎을 1.5ml Tube의 크기 정도의 감자 잎을 두 개정도 채취하여 드릴로 재료를 파쇄 후 80 μ l RT- buffer를 혼합후 다시 80 μ l RT-buffer를 혼합하여 파쇄후 Vortex 한 다음 P : C : I, 25 : 24 : 1로 혼용된 용액을 160 μ l 분주 후 하층을 사용하여 Vortex로 10초정도 혼합하였다. 원심분리기로 12,000rpm에서 10분 정도 침전시킨 후 상등액을 100 μ l 채취하여 RT- PCR법으로 감자의 바이러스 중 PVY와 PLRV를 조사하였다. 경삼의 가장 중요한 조건은 경삼시 경삼부위의 부패방지와 발근의 능력을 갖는 것이다. 본 실험에서 Table 16과 같이 배양토별 발근율과 유묘의 토양활착율을 조사한 결과 많은 차이가 없기 때문에 이후 본 연구는 peat-moss가 주원료인 인공토양을 사용하였다.

Table 16. Effects of culture media on the rooting during induction of rooted cutting of *Solanum tuberosum*

Culture soil	Rooting (%)	Rooting ability in soil (%)
Peat-moss	98.2	82.1
Cocopeat	193	78.2

유묘의 절단부위가 발근에 영향을 조사하였던 바 마디와 줄기 모두 큰 영향이 나타나지 않았으나 대지마의 경우 마디에서가 줄기 부위보다 많은 괴경의 생산에 차이를 보였다(Table 17). 이러한 이유는 마디의 액아에서 괴경을 생산할 수 있는 복지가 발생하여 괴경형성에 효과적인 것으로 사료되며, 품종간의 차이는 기내소괴경이나 수기경제배에서도 보고된 바 있다.

Table 17. Effects of cutting parts on the rooting and yield at artificial soil.

Cutting part	Cultivar	Ratio of rooting	Yields	
			No. of tuberization	Weight of tuber(g)
node	Dajima	99.7	28	15.6
	Superior	97.2	17	10.7
stem	Dajima	98.3	15	14.7
	Superior	96.4	13	9.8

※ peat-moss가 주원료인 상토에 부위별로 경삽한 묘를 재배한 결과임.

※ 배양상토에는 별도의 비료나 유기물을 첨가하지 않았음.

순화중인 유묘를 정단으로 부터 2-3마디 절단 후 다이센 M-45와 희토를 혼용처리한 인공토양에 경삽후 30일 경과 후, 초장과 근장을 조사하였던 바, Fig. 22와 같이 천연광물원소중 란단계 17원소인 희토를 삼목상토에 첨가함으로써 초기생육과 토양이식후 생리활성 물질의 작용을 조장하기 위하여 처리한 결과, 희토가 0.2mg/l 처리구에서 초장이 가장 양호하였으며 고농도(0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.0 mg/l)에서는 반응의 차이가 없었다(Fig. 23). 현재까지는 토양이식 후 일정기간동안 육묘가 토양에 순화 적응의 단계를 고려하지 않고 토양에 이식하였으므로 이식후 관리가 소홀할 경우 묘의 토양적응 기간이 길어서 초기 생육에 영향을 주는 경우가 있다. 이러한 이유는 육묘된 어린묘의 근권형성이 중요하게 작용하므로 근권형성에 대한 많은 연구가 이루어 졌는데 이는 주로

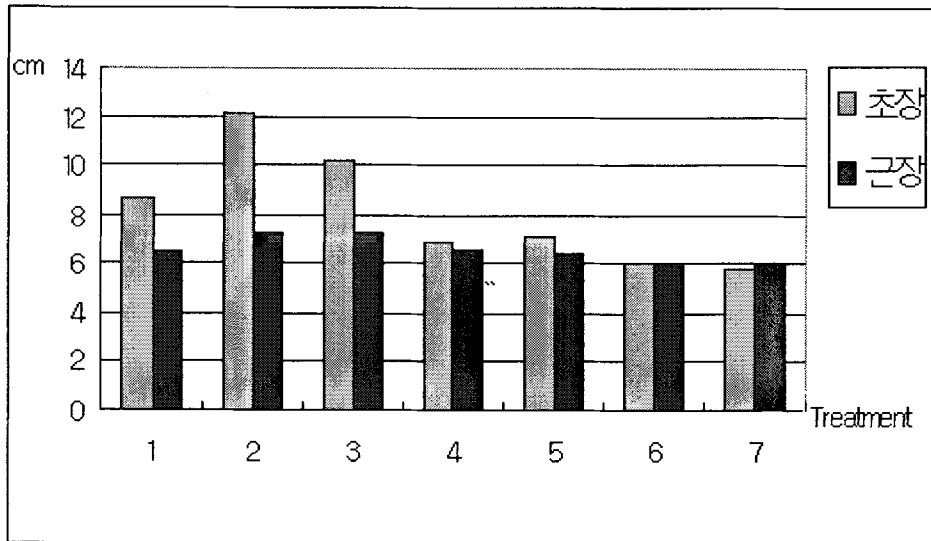


Fig. 23. Effects of mixed treatment of Disen M-45 and rare earth on the plant height and rooting of Daejima of *Solanum tuberosum*.

Treatment : 1. Disen M-45 0.2mg/l

2. Disen M-45 0.2mg/l + Rare earth 0.2mg/l

3. Disen M-45 0.2mg/l + Rare earth 0.6mg/l

4. Disen M-45 0.2mg/l + Rare earth 1.0mg/l

5. Disen M-45 0.2mg/l + Rare earth 1.4mg/l

6. Disen M-45 0.2mg/l + Rare earth 1.8mg/l

7. Disen M-45 0.2mg/l + Rare earth 2.0mg/l

어린묘에 영양소를 분무하는 형식을 취하거나, 배양토의 양분조성에 변화를 주는 것이 주였으나, 최근에는 삼목용기에 화학물질을 처리하는 연구가 이루어지고 있다. 이러한 연구들은 용기에 생육중인 어린묘에는 영향을 미치나 이식의 단계에서 용기 밖으로 나온 즉 토양에 이식된 묘에는 영향을 주지 못하므로 그 효과가 감소된다. 이러한 원인을 이유로 토양이식후에도 근권형성에 영향을 줄 수 있도록 발근조장과 일정기간 영양분을 공급할 수 있도록 각종 미네랄과 미량원소가 함유된 정제를 개발하여 이를 육묘상에 투입후 육묘의 과정을 거치는 동안 뿌리에 의하여 쌓여 있는 정제는 자연스럽게 토양이식후에도 일정기간은 유묘에 양분을 공급하게 되어 초기생육의 저해요인을 극복할 수 있을 것으로 사료되며 본 실험을 토대로 더 많은 연구를 진행하고 있다. 초장의 생육상태에 따라서 수량에 미치는 영향은 Table 18.에서 보는 바와 같이 경삼묘의 초장이 8 - 10 cm 자랐을 때 인공토양에 이식하는 것이 토양 활착과 수량에 가장 효과적이었으며 특히 일반적으로 종서로써 인정 될 수 있는 괴경이 10개가 생산되어 가장 효과적인 육묘의 상태를 결정할 수 있었다.

Table 18. Effects of seedling heights on the tuber production of *Solanum tuberosum*.

Plant length (cm)	Yield(EA)					Total
	-10g	10~20g	20~30g	30~40g	40~50g	
4~6	6	4	3	3		16
6~8	5	4	3	2	3	17
8~10	5	4	3	3	4	19
10~12	5	4	2	3	3	17
upper12cm	6	3	3	2	2	16

한편 감자의 괴경형성에는 C/N율과 식물생장조절제 중 GA, cytokinin 등, 그리고 저온 등 환경적 조건이 있는데 본 실험에서는 삼목묘의 초기 생육을 활성화 시키기 위하여 식물생장조절제 중 NAA는 발근에 효과적이고 BAP는 초장의 생육에 효과적이라는 보고가 있어서 NAA와 BAP를 단용 및 혼용 처리한 결과, NAA처리구, 특히 2 mg/l NAA 처리구에서 소괴경이 다른 처리구에 비하여 많이 형성되었고, 무처리 구에서는 20 - 30 g의 괴경이 많이 형성되어 NAA처리구에서는 발근이 조장되어 한정된 포트 안에서의 양분 결핍으로 괴경의 비대가 원활하지 않은 것으로 사료된다. 그러나 전(1992) 등은 기내소괴경 생산시 2mg/l BA 처리구가 가장 우수하였으며 괴경형성 개시 14일에 85%의 괴경형성이 진행되었다는 보고가 있는데, 본 실험에서는 삼목토양에 처리하여 이식한 결과 NAA단용처리 보다 낮은 괴경형성의 양상을 보였다(Fig. 24).

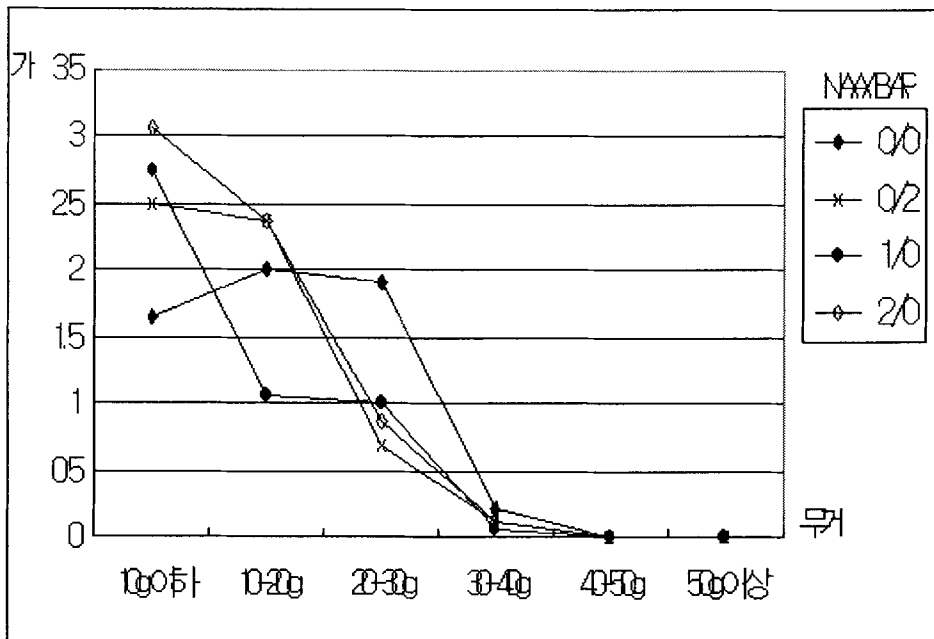


Fig. 24. Effects of mixed treatment of NAA and BAP on the formation and enlargement of tuber.

Table 19. Results of geophonics of rooted cutting of of *Solanum tuberosum*.

cv.	No. of tuber/plant		No. of tuber/weight							
			field				green house			
	field	green house	-50g	50-100	100-200	+200	-50g	50-100	100-200	+200
Dajima	16	20	8	3	3	2	9	6	3	2
Namseo	14	18	5	4	5		4	4	7	3
Chopoong	15	18	4	4	5	2	4	5	5	4
Superior	12	20	10	2			12	7	1	
Atelantic	12	17	12				15	2		

이상의 결과를 토대로 삼목묘의 토양이식을 시도한 후 토양에서의 삼목묘를 이용한 우량종서의 생산을 보면 품종간의 차이는 현저하지 않지만, 노지재배와 하우스재배시에는 차이가 많이 나는데 이는 생육조건이 차이가 있는 것으로 사료되며 특히 품종간의 차이가 있는 것은 품종의 특성에 기인하는 것으로 사료되며, 특히 하우스재배농가에서 대지마와 조풍, 남서의 선호도가 높은 것은 이러한 이유때문으로 사료된다.

2) 형질전환체유묘의 경삽에 의한 증식

가) 경삽에 의한 ADA 도입 형질전환체의 증식

본 실험은 탱크배양에 의한 ADA 유전자 도입 무병건전묘의 대량생산의 기술로서 기존의 배양과는 전혀 다른 배양법으로서 더욱 상세하게는 감자조직배양시 배양의 용기를 기존의 밀폐 혹은 숨으로 일부 통기를 처리하는 방법과는 전혀 다르게 공기 펌프를 이용하여 신선한 공기를 정화할 수 있는 필터를 통과시키고, 다른 배기구를 설치하여 대형의 탱크(배양용기)에 감자의 무병건전묘를 대량증식하는 기술이다. 또한 기존의 배양의 기술로는 일정한 기간이 지나면(식물이 크거나 혹은 배양액이 배양병에서 소진되었을 경우) 새로운 배지가 들어 있는 다른 용기에 일부씩 옮겨 주어야 하는데(일명 계대배양이라고 함) 본 배양방법으로는 이러한 단계를 절약할 수 있도록 배지 주입구가 별도로 설치되어 이의 편리성을 더하였다.

현재까지 인공씨감자를 생산하는 기술은 수기경재배와 배양용기에서의 인공씨감자생산이 주로 이용되고 있다. 그러나 수기경 재배에 의한 종서 생산은 재배작물의 품종에 따라서 다양한 반응을 보이고, 생산시 수분을 많이 함유하고 있기 때문에 저장력이 떨어지는 경우가 있으며, 배양용기내에서 인공씨감자의 생산은 공정이 복잡하고 생산된 종서의 크기가 너무 작기 때문에 농가에서 활용하는데 문제가 발생된다. 이러한 문제들을 극복하기 위하여 본 발명은 기존의 배양방법인 배양병의 방법을 탈피하여 대량으로 배양할 수 있는 탱크배양을 개발하였고 이에 따라서 생산된 무균묘의 대량번식을 위한 삽목의 기술과 접목하여 우량씨감자의 대량생산에 획기적인 방법을 개발하여 농가소득을 위한 종서 갱신율을 향상시키고자 하였다. 본실험의 감자 우량종서의 대량생산을 위한 삽목묘 이용과 탱크배양에 의한 무병건전묘의 대량생산법을 상세히 설명하면, 기존의 200ml 이나 500ml 등 1,000ml의 용량을 가진 배양병이나 샤프레등으로 배양하는 방법을 탈피하여 20,000ml의 대형 배양용기(탱크)를 최적의 배양조건을 구비할 수 있도록 신선한 공기를 순환 시킬수 있는 공기주입구와 배기구를 두고, 생육과정에 소진될 배지(영양액)를 주입할 수 있도록 또 하나의 배지 주입구를 만들었다. 이러한 공기 주입

구와, 배기구, 배지주입구는 모두 곰팡이나 박테리아등 배양에 악영향을 미치는 미생물등을 통과 하지 못하도록 여과장치를 설치하였다. 이와같이 기본적인 장치가 끝난 대형배양용기에 감자가 자랄수 있는 영양액을 첨가하여 기본적인 배지의 멸균방법으로 멸균후 무균실에서 무병건전한 감자의 싹을 일정량(7 - 8마디) 투입하여 배양하는데 이러한 작업이 완료되면 공기투입구에 공기펌프를 연결하여 두면 배양용기내의 식물이 유동하여 식물체의 질식을 방지하고 공기의 순환으로 식물체의 생육을 촉진하며 대형용기로 제작되었고, 배지의 량이 충분하여 장기간(4개월이상)배양이 가능하므로 기존의 방법에서와 같이 30일 기준으로 하는 계대배양의 어려움을 극복할 수 있다. 이러한 방법으로 배양된 무병건전한 감자의 싹을 상토에 이식하면서 줄기를 경삽하는 삼목의 방법을 응용하여 기본식물을 대량으로 생산하고 생산되어진 삼목묘를 토양에 이식하여 일반 감자의 종서를 파종한 것과 동일한 재배법을 거쳐 무병건전한 기본종을 생산할 수 있는 기술이다. 상기와 같이 발명된 배양용기(탱크)는 감자의 유식물을 기내에서 무병건전하게 대량생산하는데 효과적이며, 이러한 기술은 무병건전한 감자의 유식물체를 대량으로 생산하는데 효과적이다. 이와같이 유식물체가 대량으로 생산되면 이러한 유식물체를 활용하여 인공토양에 직접 파종하여 무병건전한 우량종서를 생산할 수 있고, 인공토양에 파종전에 경삽하여 대량으로 무병건전한 기본식물을 확보하여 일반 감자종서를 이용한 재배법과 동일하게 재배하여 대량의 우량종서를 생산하여 현재 우리나라에서는 25%정도에도 미치지 못하는 우량종서의 갱신을 향상시킬수 있을것으로 사료된다.

나) 형질전환체의 경삽에 의한 대량증식

본 연구에서 대량배양방법은 기내 경삽에 의해서 유도된 유식물체를 토양에 활착시켜 유도된 식물체로부터 다시 삼목을 해서 대량으로 포장에 재배할 유묘를 생산하고자 하였다. 따라서 무병건전주의 기내 대량번식이 매우 중요한 관건이다. 본 실험수행방법은 최초 병속에서 자란 무병감자의 줄기를 절단하여 상기 액체배지를 넣은 동양물산의 마늘배양용 용기에 4-5절편을 치상하여 배양 2주후에 계속계대배양을 하거나, 토양에 활착시키는 방법을 사용하였다(Fig. 25).

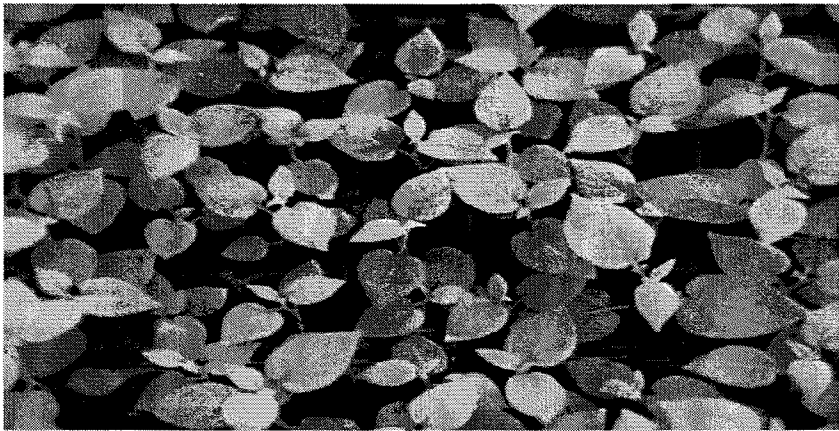


Fig. 25. Transgenic plantlets cultured in flower bed of *in vitro* potatos(upper) and mature potatos using stem cutting method(lower).

일차적으로 토양에서 활착된 감자묘를 다시 트레이에 배양토를 넣고 감자의 발근을 유도한 후, 배양하였던 매우 건강한 형질전환 감자를 생산할수 있었다(Fig. 26).



Fig. 26. Transgenic potatoes into ADA gene.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발 목표의 달성도

가. 항바이러스 물질(**purin계열**)이 감자의 생장에 미치는 영향조사

식물에서 사용가능한 항바이러스제는 purine계 물질인 ribavirin을 위시하여 vidarabine, Ara-A, deoxyadenosine, cordycepin, Xyl-A등이 가능할 것으로 사료된다. 따라서 우선 이런 물질을 항바이러스제 뿐만 아니라 형질전환체 선발물질로 사용가능성을 조사하기 위해서 정상식물체서고사하는 농도를 조사하였던 바, 역시 항바이러스에 따라서 그 농도를 다른 것을 나타내었으며 고농도에서는 정상 식물체를 모두 고사시켰으므로 항바이러스제뿐만 아니라 선발물질로 사용이 가능함을 나타내었다. 목표대비 100%수행함.

나. ADA gene를 표지유전자로 하는 새로운 식물형질전환용 binary vector의 재조합 및 확인

항바이러스제를 형질전환체 선발물질로 사용이 가능하므로 사용될 ADA 유전자를 도입하여 새로운 식물체를 만들기 위해서 ADA gene를 식물형질전환용 binary vector에 재조합하였다. 성공적으로 ADA 유전자가 식물세포 발현용 vector에 재조합, 및 식물형질전환용 binary vector에 재조합됨을 확인하였으며, *Agrobacterium*에 성공적으로 도입되었음을 확인할 수 있었다. 목표대비 100% 수행함.

다. 새로운 표지유전자를 이용한 형질전환체 선발 및 형질전환율의 증대 방법조사

독성 adenosine 유도체(항바이러스제)는 가격이 매우 비싸기 때문에 본 연구에서 개발된 ADA 새로운 표지유전자로 사용하기 위해서는 값싼 deoxyadenosine과 혼합하여 선발 agent로 사용할 필요가 있다. 따라

서 상호혼합하여 값이 약간 저렴한 선발물질을 확인할 수 있었다. Phosphinothricin의 활용가능성과 ADA 효소의 inhibitor인 deoxycoformycin의 역할 조사하여 쉽게 선발체를 확인할 수 있는 방법을 개발하였다. 아직 glutamine synthetase의 역할을 분석하여 효과적인 선발 방법구명에 대해서는 진행중에 있다. 목표대비 100% 수행함.

라. 4. RT-PCR에 의한 감자 바이러스 진단방법의 확립

감자바이러스를 효율적으로 진단하기 위해서 항체를 이용한 바이러스 진단방법보다 약 1000배가량 감도가 높은 RT-PCR를 이용하여 바이러스를 진단하기 위해서 primer를 제작하였으며, 바이러스간에 변이주가 많아 거의 대부분 진단할수 있는 방법을 개발하였으며 감자바이러스 RT-PCR를 위한 효소반응액을 구명하였고, 또한 RT-PCR을 위한 PCR 최적조건을 구명하여 성공적으로 한국 토양내에 있는 바이러스를 RT-PCR에 의해서 확인할 수 있었다. 목표대비 100% 수행함.

마. ADA 유전자의 감자에서 발현 및 새로운 detection 방법의 개발

ADA유전자가 표지유전자로 활용이 가능하다면 쉽게 확인할 수 있는 방법이 필요하다. 현재 사용되고 있는 kanamycin의 경우에는 선발 marker는 가능하지만 report marker는 아니다. 그러나 GUS의 경우에는 쉽게 눈으로 확인할 수 있는 report marker이지만 형질전환체를 획득 할 수 있는 선발 marker는 아니다. 그러나 ADA 표지유전자는 어찌는 선발(selection marker) 유전자뿐만아니라 reporter로써도 사용이 가능할 것으로 생각된다. 따라서 ADA 표지유전자를 사용할 경우 효과적으로 선발도 가능하지만 쉽게 눈으로 볼 수 있는 방법을 개발하였다. 목표 대비 100% 수행함.

바. 감자 유식물의 기내 대량번식과 생육조건 확립

형질전환체가 개발되면 대량으로 생산하여 농민들에게 공급해야하므로 기내 대량배양시스템을 확립하고자 하였다. 따라서 15리터 탱크배

양시스템을 개발하여 대량으로 줄기를 생산하고 직접 토양에 삽목하여 발근 시킨후 씨감자를 생산할 수 있는 방법을 개발하였다. 목표대비 100% 수행

사. 기내의 무병건전주의 경삽방법 개발

기내배양 감자의 토양에서 효과적인 뿌리의 유도를 위해서 순화처리, 토양활착정도의 증대방법을 구명하였으며 microtuber 생산방법보다 이 방법을 사용할 경우 더 값싸게 종서를 생산할 수 있을것으로 사료된다. 목표대비 100% 수행함.

2. 관련분야에 기여도

가. 기술적 측면

식물유전공학 기술의 급속한 발달로 외부유용유전자를 식물세포의 핵내로 도입하여 새로운 신품종을 육성하는 연구가 매우 쉽게 되었으며 이미 많은 작물에서 실용화되어 판매가 되고 있다. 그러나 이에 반해 일부 환경단체에서 형질전환체에 대한 거부감이 계속적으로 논의되고 있다. 이 원인 중에 하나는 식물세포의 형질전환시 사용되는 표지유전자가 항생제에 내성을 나타내는 유전자이기 때문에 이 유전자에 대한 자연 환경의 오염과 인체에 도입되었을 때 항생제에 대한 내성등이 논의의 초점인 것 같다. 따라서 본 연구에서는 새로운 표지유전자로 사람에게 절대적으로 필요한 유전자인 adenosine deaminase를 식물세포의 형질전환용 표지유전자로 활용가능성을 조사하는 매우 유용한 기술이며, 아울러 본 유전자는 항바이러스물질에 대해서 내성을 나타내기 때문에 영양번식에 의해서 증식되는 식물체의 경우 바이러스에 항상 노출되게 마련이면 또한 생장점배양등 무병주라도 하더라도 확실하게 믿기 어려운 상황에서 본 유전자는 바이러스는 모두 제거할 수 있고 형질전환 식물체는 전혀 생장에 영향이 없어 농가에 직접적으로 영향을 줄 수 있는 기술로 판단된다. 한편 이런 형질전환체를 대량으로 tank 배양에 의해서 증식된다면 단시간에 유용한 감자 형질전환체를 대량으로 증식시킬 수 있어 기초과학으로서의 학문적 관심은 물론 농업 생

산성 향상과 같은 경제적 측면에서도 매우 중요하다. 특히 기존의 씨감자증식 단계인 기본식물-원원종-원종-보급종의 경로를 탈피하여 기본식물에서 보급종(자가증식 이용가능한 괴경)의 공급체계와 기본식물의 유묘 대량생산을 이용한 자가 채종의 기반이 확립되므로 단일 기관에서 기본식물-원원종-원종-보급종의 단계에 이르는 과정에서 야기될 수 있는 제반의 문제를 극복할 수 있으며, 이러한 대량번식의 기틀이 확립되어 감자의 무병 건전한 우량종서를 조기에 농가에서 활용할 수 있는 새로운 기술적 know-how가 확립된다. 또한 Tank배양의 기술적 축적은 타작물에 대한 활용적 가치의 기대효과가 크고 식물조직배양의 새로운 배양기술로 정립되어 생물공학의 system개발에 매우 중요하게 활용될 것으로 기대된다.

나. 경제 · 산업적 측면

영양번식작물에서 바이러스문제는 생산성문제에서 뜨거운 감자와 같은 것이다. 따라서 바이러스를 제거하기 위해서 많은 기술이 도입되고 있으나 아직 효과적인 방법이 개발되고 있지 않다. 많은 작물에서 성장점배양과 열처리 등에 의해서 기본종을 획득하여 대량으로 증식시키고 있으나 자신있게 바이러스 무병주라고 감히 장담하기가 어렵다. 따라서 바이러스 무병주란 용어보다 건강 우량묘 등으로 표현하고 있는 실정이다. 그러나 본 기술에서 획득한 감자는 완벽하게 바이러스가 구제된 것이기 때문에 대량증식에 전혀 문제가 없는 것으로 생각된다. 이로서 바이러스 기내 무병주가 생산되어 계속적으로 공급이 된다면 현재 만연되어 있는 바이러스가 점차 감소될 것으로 생각되어 결국은 모든 농가에 우량한 감자가 생산될 것으로 판단된다. 특히 본 기술에서 사용되는 adenosine deaminase를 표지유전자로 활용한 연구는 당 연구팀에서 특허를 획득한 내용이기 때문에 국가적으로도 경제적 도움이 될 것이다. 또한 UR, GR 등에 따라 생물공학 기술은 최근 차세대 농업 육성 및 의료 복지 등 미래산업의 핵심 기술로 부각되고 있고 물질특허, UR, 등 생물자원의 산업무기화 경향으로 인해 선진각국의 기술개발 노력 및 기술 보호 강화 추세가 지속되고 있으므로 국내 유용 유전자원의 확보 차원에서도 본 연구는 대단히 중요한 가치를 갖는다고 사료된다. 특히 기존의 우량종서의 증식 및 보급의 단계가 복잡하여 이를 활용한 우량종서의 생산공급율이 우리나라 전체 공급율의 20 - 25%에 미치는

실정으로 새로운 대량번식의 방법개발이 절실하다. 본 연구의 생물공정 system의 기초가 되는 tank배양을 이용한 대량번식과 유묘의 대량생산과 무병 건전한 유묘에서의 괴경의 생산 기술은 우량종서의 공급율을 향상 시킬 것으로 사료된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 현재 성장점배양에 의하여 유도된 기내 감자 유식물체에서 바이러스 무병 주로 씨감자를 생산하여 공급하고 있으나 실제로는 기내 배양묘에서 이미 바이러스가 증식되고 있는 경우가 매우 많다. 그러나 본 연구결과 개발된 바이러스 무병감자는 확실하게 바이러스를 제거한 감자이기 때문에 씨감자로 대량생산하여 공급함으로써 생산성을 증대시킬 수 있을 것이다.
2. 새로운 표지유전자로 ADA 유전자로 활용할 수 있어 식물세포의 형질전환 시 사용된 항생제 표지유전자를 대체할 수 있어 형질전환체사용에 대한 거부감을 완화시킬 수 있을 것이다.
3. 본 연구결과 바이러스 무병주를 생산하는 방법을 활용하여 조직배양묘로 판매되고 있는 각종 화훼류(카네이션, 장미, 란?) 등에서도 본 방법을 활용할 수 있을 것이다.
4. 감자의 tank배양 기술과 유묘의 생산공정 기술개발은 우량종서의 생산확대와 우량종서의 자가 채종으로 종서보급율에 많은 영향을 미칠뿐아니라 기내삽목에 의하여 기내번식하는 타작물에도 이용할 수 있는 모델 시스템으로서 본 연구는 매우 유용할 것으로 기대된다.
5. 핵심 기술로 부각되고 있고 물질특허, UR, 등 생물자원의 산업무기화 되고 있으므로 국가 경쟁력 제고에 기여할 자원으로도 활용될 것이다.
6. 현재 RT-PCR에 의하여 바이러스 진단방법은 믹스식으로 진단 kit를 만들어 실제 포장에서 사용하고 있다(방극수 교수 활용함).
7. 현재 GMO에 대한 관심이 고조되고 있어 본 연구결과 새로운 표지유전자가 개발되면 GMO에 대한 인식이 상당히 희석될것으로 생각된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

- Abbott, A.J. and A.R. Belcher. 1986. Potato tuber formation in vitro. p. 113-122. In: Plant tissue culture and its agricultural application. Butterworths.
- An G (1987) Binary Ti vector for plant transformation and promoter analysis. *Methods in Enzymology* 153: 292-305
- An GH, Watson BD, Chiang CC (1986) Transformation of tobacco, tomato, potato and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system. *Plant Physiol* 81: 301-305
- Anzai H, Yoneyama K, Yamaguchi I (1990) Transgenic tobacco resistant to a bacterial disease by the detoxification of a pathogenic toxin. *Mol Gen Genet* 219: 492-494
- Arteca, R.N., B.W. Poovaiah, and O.E. Smith. 1979. Changes in carbon fixation, tuberization, and growth induced by CO₂ applications to the root zone of tobacco plants. *Science* 205:1279-1280.
- Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD (1983) A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304:184-187.
- Catchpole, A.H. and J. Hillman. 1969. Effect of ethylene on tuber initiation in *Solanum tuberosum* L. *Nature* 223:1387.

- Chang JR, Geider K (1995) The use of luciferase as a reporter for response of plant cells to the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. *Plant Cell Rep* 14: 497-500
- Chapman, H.W. 1958. Tuberization in the potato plant. *Physiol. Plant.* 11:215-224.
- Choi KH, Yang DC, Jeon JH, Kim HS, Jung YH, Jung H (1998) A comparison of microtuberization efficiency between normal and adenosine deaminase transgenic potato plantlets cultured *in vitro*. *Korean J Plant Res* 11:252-256.
- Datla RSS, Hammerlindl JK, Panchuk B, Pelcher LE, Keller W (1992) Modified binary plant transformation vectors with the wild type gene encoding NPT 2. *Gene* 211:383-384.
- DeBlock M, Herrera-Estrella L, Montagu MV, Schell J, Zambryski P (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J* 3:1681-1689.
- Deuse, P. 1947. Tuberisation et auxine. *Bul Soc R. Bot. Belg.* 79:79-84.
- Dimalla, G.G. and J. van Staden. 1977. Effect of ethylene on the endogenous cytokinin and gibberellin levels in tuberizing potatoes. *Plant Physiol.* 60:218-221.
- Edwards K, Johnston C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19:1349.
- Ellis G, Goldberg DM (1970) A NADH linked kinetic assay for adenosine deaminase EC 3.5.4.4. activity. *J Lab Clin Med* 76:507-517.
- Fox IH, Kelley WN (1978) The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. *Ann Rev Biochem* 47: 655-686
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL, Woo SC (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci* 80:4803-4806
- Goodwin. P.B. and G. Brown. 1980. Field performance of potato shoot-tips proliferated in culture. *Potato Res.* 23:449-452.

- Gregory, L.E. 1956. Some factors for tuberization in the potato. *amer. Potato J.* 43:281-288.
- Harriso BD, Mayo MA, Baulcombe DC (1987) Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature* 328: 799-802
- Heinz F, Reckel S, Pilz R, Kalden JR (1980) A new spectrophotometric assay for enzymes of purine metabolism: IV Determination of adenosine deaminase. *Enzyme* 25:361-367.
- Hendriksen, J.B. 1963. The mother tuber and the growth of the potato plant. *Proc. 2nd trienn Conf. Eur. Assoc. Potato Res. Pisa, Italy.*
- Herrera-Estrella L, De Block M, Montagu MV, Schell J (1983) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J* 2:987-992.
- Hjemdahl-Monsen OE, Papastathopoulos DS, Rechnitz GA (1977) Automated adenosine deaminase enzyme determination with an ammoniasensing membrane electrode. *Anal Chim Acta* 88:253-259.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303:179-180.
- Hoekema A, Van Haaren MJJ, Fellingner AJ, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1986) Non-oncogenic plant vectors for use in the *Agrobacterium* binary vector system. *Plant Molecular Biology* 5:85-89.
- Hopkinson DAH, Cook PJJ, Harris H (1969) Further data on the adenosine deaminase polymorphism and a report of a new phenotype. *Ann Hum Genet* 32: 361-367.
- Hussey, G. and N.J. Stacey. 1981. In vitro propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann. Bot.* 48:789-796.
- Hussey, G. and N.J. Stacey. 1984. Factors affecting the formation of in vitro tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann. Bot.* 53:565-578.
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5:387-405.
- Jeung, H. 1986. Microtuber production from shoot-tip culture. *Ann. Rep. Natl. Proj. Ministry of Science and Technology.* (N 118[5]-2545-5).

p.89-109.

- Kellems RE, Yeung CY, Ingolia DE (1985) Adenosine deaminase deficiency and severe combined immunodeficiencies. *Trend Genet* 1:278-283.
- Klenow J (1952) The enzymic oxidation and assay of adenine. *Biochem J* 50:404-407.
- Koerber W, Meisterernst EB, Herrmann G (1975) Quantitative measurement of adenosine deaminase from human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 63:323-333.
- Kumada Y, Anzai H, Takano E, Murakami T, Hara O, Itoh R, Imai S, Satoh A, Nagaoka K (1988) The bialaphos resistance gene(*bar*) plays a role in both self-defense and bialaphos production in *Streptomyces hygroscopicus*. *J Antibiot* 41: 1835-1845
- Lerch B. On the inhibition of plant virus multiplication by ribavirin. *Antiviral Res.* 1987 Jun;7(5):257-70.
- Ludwig SR, Bower B, Beach L, Wessler SR (1990) A regulatory gene as a novel visible marker for maize transformation. *Science* 247:449-450.
- Martinek RG (1963) Micromethod for the estimation of serum adenosine deaminase. *Clin Chem* 9:620-625.
- Meier W, Conscience JF (1980) A fast and simple radiometric assay for adenosine deaminase using reversed-phase thin-layer chromatography. *Anal Biochem* 105:334-339.
- Mingo-Castel, A.M., F.B. Negm, and O.E. Smith. 1974. Effect of carbondioxide and ethylene inhibition of isolated potato stolons cultured in vitro. *Plant Physiol.* 53:798-801.
- Mingo-Castel, A.M., R.E. Young, and O.E. smith. 1976. Kinetin-induced tuberization of potato in vitro: on the mode of anxin of kinetin. *Plant Cell physiol.* 17:557-570.
- Moorby, J. 1967. Inter-stem and intertuber competition in potatoes. *Eur. Potato J.* 10:189-205.
- Moorby, J. 1978. The physiology of growth and tuber yield. In:Harris, P. M. (eds), *The potato crop*, Chapman and Hall, London.
- Niedz RP, Sussman MR, Satterlee JS (1995) Green fluorescent protein: an

- in vivo* reporter of plant gene expression. Plant Cell Rep 14: 403-406
- Okazawa, Y. 1970. Physiological significance of endogenous cytokinin occurred in potato tubers during their development period. Poc. Crop Sci. Jpn. 39:171-176.
- Palmer, C.E. and O.E. Smith. 1969. Cytokinins and tuber initiation in the potato *Solanum tuberosum* L. Nature 221:279-280.
- Palmer, C.E. and O.E. Smith. 1970. Effect of kinetin on tuber formation on isolated stolons of *Solanum tuberosum* L. cultured in vitro. Plant Cell Physiol. 11:303-314.
- Palmer, C.E. and W.G. Baker. 1973. Influence of ethylene and kinetin on tuberization and enzyme activity in *Solanum tuberosum* L. stolons cultured in vitro. Ann. Bot. 37:85-93.
- Rathore KS, Chowdhury VK, Hodges TK (1993) Use of bar as a selectable marker gene and for the production of herbicide-resistant rice plants from protoplasts. Plant Mol Biol 21: 871-884
- Schneider M, Ow DW, Howell SH (1990) The *in vivo* pattern of firefly luciferase expression in transgenic plants. Plant Molecular Biology 14:935-947.
- Tavazza R, Tavazza M, Ordas RJ, Ancora G, Benvenuto E (1988) Genetic transformation of potato(*Solanum tuberosum*): An efficient method to obtain transgenic plants. Plant Science 59: 175-181
- Tovar, P., R. Estrada, L. SchildeRentschler, and J. H. Dodds. 1985. Induction and use of in vitro potato tubers. Circular 13:1-7. CIP. Lima, Peru.
- Visser RGF, Jacobsen E, Hesselting-Meinders A, Schans MJ, Witholt B, Feenstra WJ (1989) Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. Plant Mol Biol 12: 329-337
- Wattimena, G., B. McCown, and G. Weis. 1983. Comparative field performance of potatoes from microculture. Amer. Potato J. 60:27-33.

- Weyden MBV, Kelley WM (1977) Adenosine deaminase: characterization of the molecular heterogeneity of the enzyme in human tissue. *Adv Exp Med Biol* 76:236-248.
- Wiersema, S.G., R. Cabello, P. Tovar, and H. Dodds. 1987. Rapid multiplication by planting into beds micretubers and in vitro plants. *Potato Res.* 30:117-120.
- Yang DC, Bang KS, Choi KH (1996a) Extraction and activity assay of mouse adenosine deaminase from transgenic tobacco(*Nicotiana tabacum* L.). *Korean J Plant Tissue Culture* 23:55-60.
- Yang DC, Bang KS, Park JC, Choi KH, Choi KT (1996b) Expression of adenosine deaminase gene in ginseng hairy root by genetic transformation. *Korean Society of Plant tissue Culture* 23:303-309.
- Yang DC, Han SS, Yoon ES (1995) Adenosine deaminase gene: possible selectable marker for tobacco transformation. *Korean J Plant Tissue Culture* 22: 235-240.
- Yang DC, Lee KY, Yoo YS, Choi KH, Lim HT (1997) Plant Regeneration and expression of mouse adenosine deaminase gene in transgenic hot pepper(*Capsicum annuum* L.) plant. 1997. *Korean Society of Plant tissue Culture* 24:37-41.
- Yang DC, Park JC, Choi KT, Lee JM (1995) Expression of mouse adenosine deaminase gene in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Korean J Plant Tissue Culture* 22: 195-200.
- Yeung CY, Ingolia DE, Bobonis C, Dunba BS, Riser ME, Siciliano MJ, Siciliano J, Kellems RE (1983) Selective overproduction of adenosine deaminase in cultured mouse cells. *J Biol Chem* 258:8338-8345
- Yeung CY, Ingolia DE, Roth DB, Shoemaker C, Al-Ubaidi MR, Yen JY, Ching C, Bobomis C, Kaufman RJ, Kellems RE (1985) Identification of function murine adenosine deaminase cDNA clones by complementation in *E. coli*. *J Biol Chem* 260: 10299-10307
- Zhuk IP, et al. Effect of the method of tissue culture and the way of its inoculation as applied to the accumulation of potato virus X and tobacco mosaic virus. *Mikrobiol Zh.* 1975 Nov-Dec;37(6):718-24.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.