최 종
연구보고서

Sink-Source 관련 조절유전자 발현분석 및 형질전환 벼 개발

명지대학교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Sink-Source 관련 조절유전자 발현분석 및 형질전환 벼 개발” 과제 (세부과제 “수량 생산성 특성 검정 및 재료육성”)의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 7 월 일

주관연구기관명 : 명지대학교
총괄연구책임자 : 남 백 희
세부연구책임자 : 남 백 희
협동연구기관명 : 작물시험장
협동연구책임자 : 최 해 춘

요 약 문

Ⅰ. 제 목

Sink-Source 관련 조절유전자 발현분석 및 형질전환 벼 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 우리 나라는 벼 재배면적의 감소(3만 ha감소/년)로 인한 쌀 생산량의 감소로 주곡인 쌀의 자급률도 감소(1994년 87.8% 하락)하는 추세에 있으며, 더욱이 WTO 출범이후 농업 생산 기반이 약화되고 있다. 또한 농촌의 노동인력의 감소와 노령화도 농업 생산 능력 감소의 원인이 되고 있다. 벼는 전 세계 인구의 반 이상이 주식으로 이용하는 중요한 작물이며, 다가오는 21세기에는 식량증산이 인구증가를 충족하지 못하여 세계 식량위기가 예측되고 있다. 국내 총 생산량 3조원에 이르는 우리나라에서는 벼의 생산성 증대에 관한 연구가 전통적인 교배육종에 의존 하여온 바, 기술적 한계에 도달하여 1970년대 후반 이후 헥타르 당 생산량이 6 ton 수준으로 증가되었으나 지난 10여 년 동안 벼의 수량의 증가는 정체를 보여 주고 있다. 이러한 수량성의 정체는 전세계적인 현상으로 국제 미작연구소는 연차 보고서에서 1965년에 육성된 IR8과 1995년에 육성된 IR72의 수량성이 동일한 수준이라고 보고하고 있다. 최근 재래육종법과 유전공학적인 방법의 접목에 의한 신품종 개발 연구가 활발히 이루워지고 있으며 이러한 기술을 이용하여 다수확 품종의 개발로 현재 생산량의 2배 수준으로 생산량을 증가 시킬 수 있다. 영농인력의 감소, 경작지의 감소 등에 의한 최근 벼 생산량의 감소와 통일을 대비하여 최근 북한의 식량 위기 등을 해결할 수 있는 다수확 품종의 개발 연구가 시급한 실정이다.

이에 본 연구에서는 벼를 대상으로 Sink-Source 상호작용 기작을 규명하기 위하여 Sink-Source 관련 주요대사조절효소의 조절기작이 효소와 유전자 수준에서 연구를 하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. Sink-Source 관련 조절 유전자 발현분석 및 벼 형질전환

기능적 게놈 연구에 의해 특히 energy source기관인 잎과 energy sink 기관인 낱알, 뿌리 사이에서의 물질 수송과 저장에 관련된 유전자들을 탐색하고 기능을 분석하는 것은 궁극적으로 벼의 생산성 증대를 위한 결정적인 열쇠를 쥐고 있다.
전분 저장량이 증가하려면 'Source' 즉 잎과 'Sink' 즉 배유에서의 생화학적인 대사의 조절이 1차적인 대상이 된다. 'Source'인 잎의 엽록체에서 광합성에 의해 생성된 fructose-6-phopshate(F-6-P)는 glucose-1-phosphate(G-1-P)로 변환되며 이것이 ADP(adenine diphosphate)-glucose pyrophosphorylase (ADGP)에의해 ADP-glucose(ADPG)가 되어 전분으로 일시 저장된다. 이것이 glucose로 되어 세포질에서 UDP(uridine diphosphate) glucose pyrophosphorylase(UDGP)에 의해 UDP glucose(UDPG)가 되며 F-6-P와 반응하여 sucrose가 된다. 이 sucrose는 'Sink'인 배유의 세포질에서 UDGP에 의해 UDPG가 되고 G-1-P와 G-6-P로 변환되어 amyloplast에서 ADGP에 의해 ADPG가 되어 최종적으로 전분으로 저장된다.
Sucrose는 고등식물에서 광합성 산물인 탄수화물이 source에서 sink로 체관을 통해 이동하는 주요 이동형태이기 때문에 체관 내 sucrose 농도는 sink기관의 성장과 발달에 결정적인 영향을 미친다. 광합성은 빛이 존재할 때만 진행되지만 식물은 빛이 없을 때에도 성장을 계속하기 위하여 빛이 있을 때 합성된 탄수화물을 starch 형태로(transitory starch) 엽육세포 엽록체 내에 일시적으로 저장하였다가 빛이 없을 때 이용함으로서 체관내의 sucrose 농도를 조절하고 있다. 따라서 엽육세포(leaf mesophyll cell)내 엽록체에서 합성된 탄수화물이 Sucrose 형태로 변해서 Sink(종자)내에 starch형태로 축적되기까지 같이 많은 효소 및 transporter들이 관여하고 있다.
본 연구는 벼를 대상으로 Sink-Source 상호작용기작을 규명하기 위하여 Sink-Source 관련 주요대사조절효소의 조절 기작을 효소와 유전자 수준에서 연구하고 이를 생산성 증대로 연결시킬 수 있는 조절 기작 등을 변형시킨 돌연변이체를 만들어 형질전환시킴으로써 최종적으로는 생산성이 획기적으로 증가된 벼를 개발하고자 한다. 이에 Sink-Source 기관에 *E. coli* UDP-glucose pyrophosphatase 유전자를 벼에 형질전환하여 벼 생산성 증대시킴을 최종목표로 한다.

2. DNA 칩을 이용한 생산성(grain yield) 관련 변이유전자 규명 및 분리

고밀도 DNA array의 사용에 따른 유전체 수준에서의 유전자 발현 연구는 다양한 생물학 현상 규명에 사용되고 있다. DNA microarray 연구는 유리판이나 chip에 다양한 유전자를 찍고 특정한 시기에 추출한 mRNA를 역전사 효소를 이용하여 제작한 probe을 hybridization 하여 특정한 시기의 유전자 발현 양상을 유전체 수준으로 관찰하는 것이다.

E.coli upgase를 과량 발현시킨 형질전환체(rbc::upg)에서의 유전자 발현 변화를 비교하기 위하여 60K 벼 유전체 chip (GGbio. Korea)을 이용하여 분석한 결과 비형질전환체에 비해 406 종의 유전자의 발현이 증가하였으며, 1184 종의 유전체가 감소하였다. 한편, 수량 증대성 관련 유전체 분리를 위해 수량 증대성 벼 중 하나인 다산벼와 일반벼인 일품벼에서의 유전자 발현 차이를 60K 벼 유전체 chip을 이용하여 비교한 결과 다산벼에서 2082 유전자가 일품벼보다 높은 발현을 하고 있음을 확인하였으면 반면에 1184 유전자가 일품에 비해 발현이 낮음을 확인하였다.

2. 수량 생산성 특성 검정 및 재료육성

식물의 에너지 저장체인 전분은 인류의 주요 에너지원으로서 벼, 밀, 옥수수처럼 씨앗에 저장되거나 감자 등에서는 괴경에 저장된다. 이러한 전분의 저장량을 증가시키는 것이 식량 증산과 직결되기 때문에 농업과학자들은 전통적인 육종방법을 이용하여 다수확 품종을 개발하여 왔다. 우리나라의 주식인 벼의 경우는 1970년대부터 주식자급을 위한 정부의 지속적인 지원에 의해 다양한 다수확 품종을 개발하여 왔다. 하지만 미질, 내병성, 내충성을 동시에 갖는 다수확 품종을 개발하는 것은 항상 성공적이지는 않았다. 주곡작물에서 Source-Sink의 용량은 표현형으로 볼 때 잎(source), panicle, kernel(sink)등의 크기, 모양과 밀접한 관계가 있고 이것들을 생산성 구성요소(yield components)라 부르며 교배육종의 선발지표로 사용하였다. 그러나 보다 높은 생산성을 갖는 벼를 만들기 위한 교배육종에서 빈번히 생산성 형질이 유전되지 않는 결과를 가져왔고 이것은 생산성 구성 요소들이 서로 반비례적으로 연관성을 갖는 데 기인한 것으로 생각하고 이 현상을 “yield component compensation” 이라 부르고 있다.

우리 나라의 벼 육종기술은 세계적 수준이며 벼에 대한 많은 유전재료를 보유하고 있으나 농업적으로 주요한 유전특성(생산성, 환경내성, 내병성 등)의 분자 유전자 분리개

발 및 이를 이용한 품종 육성은 미흡한 실정이므로 재래육종법과 유전 공학기법의 접목에 의한 신품종 육성기술개발이 시급한 과제이다. 국내에서 수 십 년 동안 육종에 의해 지금까지 확보된 다양한 수량성 관련 변이 품종으로는 수원428호(찰), 수원461호(dull), 수원461호(opaque), 수원464호(고식이섬유), 일품벼 MNU 87-5-GII-1-2, 수원392 MNU-20-4-GHI-5-1등 25 계통이 있다. 이들 변이 품종들은 배유에 화학적 처리를 하여 모본과 비교했을시 수량이 감소하는 변이품종들로, 수량관련 유전자에 변이가 원인이 되는 것으로 변이에 관여하는 유전자를 분리하여 모본과 비교하면 수량성에 관여하는 유전자를 규명할 수 있는 연구를 수행할 수 있다. 이들 변이 품종을 대상으로 특히 수량성 증대와 관련된 변이종을 1차적 대상으로 분석함으로써 이들 변이종들의 특정형질에 기여하는 유전자를 분리하여 규명하고 궁극적으로 생산성에 관련된 다양한 유전자들을 효율적으로 탐색한다. 또한 변이에 관여하는 유전자를 probe DNA로 사용하여 DNA 칩에 의한 분석 재료로 이용하여 기능적 게놈 연구를 수행함으로써 유용 유전자 탐색 및 그 응용면에서 매우 효율적인 연구를 수행할 수 있다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. Sink-Source 관련 조절 유전자 발현분석 및 벼 형질전환

벼의 생산성 증가를 위한 전분 저장량이 증가하려면 'Source' 즉 잎과 'Sink' 즉 배유에서의 생화학적인 대사의 조절이 1차적인 대상이 된다. 전분 대사과정에서 주요 대사 조절 효소 중의 하나인 UGPase는 UTP와 glucose-1-phosphate로부터 UDP-glucose를 합성하는 효소로써 가역적 반응을 한다. 벼에서의 sink-source 조절 기작을 규명하고 벼의 광합성 산물을 수확량 증대 쪽으로 분배하여 벼의 수확량을 높이기 위해, *E.coli ugp*를 벼의 genome에 도입했다. *E.coli* genomic DNA를 주형으로 사용하여 PCR을 통해 *ugp*를 coding하는 0.9kb DNA 단편을 증폭했고, 그것을 3개의 형질전환용 운반체에 삽입시켰다. sbe promoter와 globulin promoter를 *ugp*와 각각 연결시켜서 sink에서 특이적으로 발현되도록 유도했으며 (*Glb::ugp, Sbe::ugp*), rbcS promoter와 *ugp*를 연결시켜서 source에서 특이적으로 발현되도록 유도 *(Rbc::ugp)* 했다. 각 운반체를 *Agrobactium*을 이용하여 벼에 형질 전환시켜서 *Glb::ugp, Sbe::ugp*, 그리고 *Rbc::ugp*e 각각 21 개체, 6개체, 그리고 6개체를 얻었다. Genomic Southern blot 분석

을 통해 형질전환 벼 식물체 내에 *ugp* 유전자의 도입 확인하였고, 도입된 유전자 수(copy number)는 line에 따라 1에서 3까지 다양하게 도입되었음을 확인했다. Source 기관으로의 발현을 위한 Rbc::ugp 형질전환에서의 Northern blot 분석 결과 잎조직에서의 높은 발현이 확인되었으며 sink 기관에서의 발현을 위한 *Sbe::ugp, Glb::ugp* 형질전환체에서는 *Sbe::ugp* 에서는 낮은 수준의 발현이 확인되었으며 *Glb::ugp*에서는 발현 되지 않음을 확인하였다.

2. DNA chip을 이용한 생산성 (grain yield) 관련 변이 유전자 규명 및 분리

고밀도 microarray의 사용에 따른 유전체 수준에서의 유전자 발현 연구는 다양한 생물학 현상 규명에 사용되고 있다. DNA microarray 연구는 유리판이나 chip에 다양한 유전자를 찍고 특정한 시기에 추출한 mRNA를 역전사 효소를 이용하여 제작한 probe을 hybridization 하여 특정한 시기의 유전자 발현 양상을 유전체 수준으로 관찰하는 것이다. E.coli ugpase를 과량 발현시킨 형질전환체 (rbc::ugp)에서의 유전자 발현 변화를 비교하기 위하여 60K 벼 유전체 microarray (GGBio, Korea)를 이용하여 분석한 결과 비형질전환체에 비해 406 종의 유전자의 발현이 증가하였으며, 1184 종의 유전자가 감소하였다. 한편, 수량 증대성 관련 유전자 발현 차이를 microarray를 이용하여 비교한 결과 다산벼에서 2082 종의 유전자가 일품벼보다 높은 발현을 하고 있음을 확인하였으며 반면에 1184 종의 유전자가 일품에 비해 발현이 낮음을 확인하였다. 하지만, 이 두 시험에서 sink-source 관련 유전자의 변화를 확인하였으나 23종의 유전자 중에 1-2 종의 유전자만이 발현이 감소하였을 뿐 큰 차이를 보이지 않았다.

2. 수량생산성 특성검정 및 재료 육성

본 연구는 수량생산성 재료를 육성하고 특성검정을 위하여 시험재료의 주요 생육 및 출수 특성, 수량구성 요소, 수량성 및 주요 이화학적 특성을 분석하였다.

1) 시험재료의 출수기는 8월 3일~8월 27일, 8월 12일~8월 26일, 8월 10일~8월 14일, 간장은 65~87cm, 76~95cm, 75~79cm, 수장은 18~24cm, 18~22cm, 22~25cm의 분포를 일품벼, 수원391, 수원392호 돌연변이 계통에서 각각 나타났으며, 수장의 변이 폭이 출수기, 간장보다 적었다.
2) 현미입형을 조사하기 위하여 길이, 너비 두께, 장폭비를 실측한 결과, 각 처리계

통 모두 길이의 변이 폭이 너비, 두께, 장폭비보다 크게 나타났다.

3) 수량구성요소에서 수수, 수당립수, 천립중 변이 폭은 수원391호 돌연변이 계통이 일품벼, 수원392호 돌연변이 계통보다 큰 편이었으나, 등숙율 변이 폭은 일품벼 돌연변이 계통에서 가장 컸으며 평균 등숙률은 수원392호 돌연변이 계통이 가장 낮았다.

4) 정조수량의 분포는 일품벼 돌연변이 계통에서 236~848kg/10a 범위에 평균 621kg/10a, 수원391호 돌연변이 계통에서 312~844kg/10a 범위에 평균 607kg/10a, 수원392호 돌연변이 계통에서 668~984kg/10a 범위에 평균 765kg/10a의 분포를 보였으며 수원392호 돌연변이 계통들의 정조수량의 변이 폭이 가장 작았다.

5) 돌연변이 계통들의 배유형태는 메(non-waxy), 중간찰(dull), 뽀얀메(opaque), 분상질(floury), 당질(sugary) 및 거대배(giant embryo) 등으로 다양하게 나타났으며, 일품벼, 수원391호 돌연변이 계통들은 아밀오스 함량이 저아밀로스에서 고아밀로스까지 다양한 분포를 보였으나, 수원391호 돌연변이 계통은 모두 중간찰성이었고, 단백질 함량은 수원391호 돌연변이 계통이 일품벼, 수원392호 돌연변이 계통보다 변이 폭이 컸다.

6) 비스코그램 특성은 호화개시온도, 최고점도, 최저점도, 최종점도, 강하점도, 치반점도를 조사하였으며, 배유의 형태가 모두 중간찰인 수원392호 돌연변이 계통 보다 일품벼, 수원392호 돌연변이 계통의 비스코그램 특성의 변이 폭이 더 크게 나타났다.

SUMMARY
(영문요약문)

Expression of sink-source related gene in transgenic rice plants

Starch is synthesized through a series of reactions in the source (leaf) and sink (seed) metabolism. UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPase) catalyzes synthesis of UDP-glucose from UTP and glucose-1-P, also its reverse reaction. In order to investigate the source-sink metabolism and to understand in the effects of transgenes, we introduced an *E.coli* gene encoding UDP-glucose pyrophosphorylase gene (*ugp)* into rice. We amplified a 0.9 kb DNA fragment containing the *ugp* by PCR using *E.coli* DNA as a template, and inserted it into a transformation vectors, generating *RbcS::ugp* for a source expression, *Glb::ugp* and *Sbe::ugp* for a endosperm-specific expression as sink organ. A total of 34 transformants (22 lines for *Glb::ugp*, 6 lines for *Sbe::ugp*, and 6 lines for *RbcS::ugp*) were produced by the *Agrobateium*-mediated transformation method. We have determined transgene copy numbers of the plants by genomic Southern-blot experiments, revealing copy numbers ranged from one to three depending on lines. UGPase expression of trnasgenic rice was detected by Northern blot analysis in leaf tissue of *Sbe::ugp and Rbc::ugp*-trnasformed plants.

Transcriptome profiling in E.Coli UGPase Overexpression Rice and high grain yield rice.

Gene expression profiling on a genomic scale using high-density arrays of DNA has emerged as a leading technology in the analysis of various biological phenomena. With DNA microarray analysis, differential and temporal changes in gene expression can be monitored under specified conditions by hybridizing labeled reverse transcripts to prefabricated DNA spots on chips or glass.

Therefore, to understand the effects of transgene of the expression of other gene under the control of UGPase(rbc::ugp), we adopted microarray analysis using 60K

rice oligo nucleotide whole genome chip (GGBio. Korea). The results showed that transcription levels of 406 genes were increased in UGPase transformed rice than untransformed rice, but transcription levels of 1184 gene were decreased in significant level. Also, to identify genes related grain yield of rice cultivars Ilpum and Dasan with the microarray. Dasan is a high grain yield rice. the results showed the transcripts of 2082 genes were increased in Dasan rice than in Ilpum, but transcripts of 1184 genes were decreased in Dasan than in Ilpum.

The transcription of the 23 genes titely related to sink-source were analyzed in transgenic rice and high grain yield rice cultivars. The expression of 22 genes were not significantly changed in untransformed rice and tranasgenic rice with UGPase. Also, the expression of 22 genes were not significantly changed in rice cultivars Ilpum and Dasan. However, the expression was significantly decreased in Dasan.

Characterization of grain yield components and and development of several rice materials by mutation breeding

The experiments were carried out to analyze the gene releated to sink-source in several rice materials with large variation in source, sink and quality characteristics with same genetic background by mutation using N-*methyl*-N-*nitrosourea*(MNU), especially. The variation of tested rice material in panicle length, heading date and culm length in all three rice families, that is, mutant lines originated from Ilpumbyeo, Suweon 391, and Suweon 392. The mutants originated from Suweon 391 possessing tall plant height and large rice kernel revealed the higher variation in culm length, panicle number per hill, spikelet number per panicle and rice kernel size compared with those originated from Ilpumbyeo and Suweon 392. The range of rough rice yield in advanced mutant lines originated from Ilpumbyeo, Suweon 391, and Suweon 392 were 236~848, 312~844, and 668~984kg/10a, respectively. There were also several embryo and endosperm mutants such as dull, opaque, giant embryo, floury and sugary. Suweon 392 mutants showed the larger variation in gelatinization and viscosity of rice flour compared with Ilpumbyeo or Suweon 391 mutants.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction

1. Purpose of research
2. Major goal and scope of research

Chapter 2. Survey of related work

1. Survey of related work

Chapter 3. Method and results

1. Analysis of Sink-Source metabolism related gene expression and development of transgenic rice plants for high grain yield.
   1) Isolation of UDP-glucose pyrophosphosrylase from *E. coli*
   2) Construction of rice transformation vectors for over-expression of *E. coli* UDP-glucose pyrophosphosrylase in sink or source organism.
   3) *Agrobacterium*-mediated rice transformation
   4) Genomic Southern blot and Northern blot analysis of transgenic rice plants
2. DNA chip analysis for characterization of grain yield related gene
   1) Quality test of rice 60K micrarray
   2) Comparison of transcript levels between untransformed rice and transgenic plants (rbc::ugp) with rice 60K microarray.
   3) Comparison of transcript levels between Ilpom rice(normal grain yield rice) and Dasan rice(high grain yield rice) with rice 60K micrarray
3. Characterization of grain yield and development of several rice materials by mutation breeding
   1) Material and methods
   2) Results and discussion

Chapter 4 Accomplishment and contribution of research

Chapter 5 Reference

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요
제 1 절 연구개발의 필요성
제 2 절 연구개발 목표와 내용

제 2 장 국내외 기술개발 현황
제 1 절 국내외 기술 개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
제 1 절 Sink-Source 관련 조절 유전자 발현분석 및 벼 형질전환
1) *E. coli*의 UDP-glucose pyrophosphosrylase 유전자 분리
2) *E. coli*의 UDP-glucose pyrophosphosrylase 가 도입된 형질전환용 운반체 제작
3) *Agrobacterium* 을 이용한 벼의 형질 전환
4) 형질전환 벼 식물체 내 유전자 도입 확인 및 발현 분석
제 2 절 DNA 칩을 이용한 생산성(grain yield) 관련 변이유전자 규명 및 분리
1) 60K Rice Oligonucleotide Microarray의 유용성 검증
2) rice oligonucleotide 60K chip을 이용한 Rbc::ugp 형질전환 벼에서의 유전자 발현 분석
3) rice oligonucleotide 60K chip을 이용한 다수확 품종(다산) 과 일반벼(일품)의 유전자 발현 비교 분석
제 3 절 수량 생산성 특성 검정 및 재료육성
1) 재료 및 방법
2) 결과 및 고찰

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 참고 문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 필요성

벼 재배면적의 감소(3만 ha감소/년)로 인한 쌀 생산량의 감소로 주곡인 쌀의 자급률도 감소(1994년 87.8% 하락)하는 추세에 있으며, 더욱이 WTO 출범이후 농업 생산 기반이 약화되고 있다. 또한 농촌의 노동인력의 감소와 노령화도 농업 생산 능력 감소의 원인이 되고 있다. 벼는 전 세계 인구의 반 이상이 주식으로 이용하는 중요한 작물이며, 다가오는 21세기에는 식량증산이 인구증가를 충족하지 못하여 세계 식량위기가 예측되고 있다. 국내 총 생산량 3조원에 이르는 우리나라에서는 벼의 생산성 증대에 관한 연구가 전통적인 교배육종에 의존 하여온 바, 기술적 한계에 도달하여 1970년대 후반 이후 헥타르 당 생산량이 6 ton 수준으로 증가되었으나 지난 10여 년 동안 벼의 수량의 증가는 정체를 보여 주고 있다. 이러한 수량성의 정체는 전 세계적인 현상으로 국제 미작연구소는 연차 보고서에서 1965년에 육성된 IR8과 1995년에 육성된 IR72의 수량성이 동일한 수준이라고 보고하고 있다. 최근 재래육종법과 유전공학적인 방법의 접목에 의한 신품종 개발 연구가 활발히 이루워지고 있으며 이러한 기술을 이용하여 다수확 품종의 개발로 현재 생산량의 2배 수준으로 생산량을 증가 시킬 수 있다. 영농인력의 감소, 경작지의 감소 등에 의한 최근 벼 생산량의 감소와 통일을 대비하여 최근 북한의 식량 위기 등을 해결할 수 있는 다수확 품종의 개발 연구가 시급한 실정이다.

1) 기술적 측면

다수성은 수량 관련 Source 및 Sink 형질을 지배하고 있는 다수의 유전자들을 축적하는 것이 효과적이다. 이를 위해서 전 세계적으로 다수성 유전자원의 탐색 및 평가를 실시하여 수량성 인자의 유전 양상을 파악하여야함. 특히, Sink 면에서는 단위면적 당 수수, 및 수당 영화수(panicles per plant) 및 potential kernel size의 증대로 단위면적 당 Sink 용량을 극대화시킴과 동시에 능력개선에 힘을 기울여야 함.

분자유전자 지도 및 DNA marker는 QTL 분석을 통해 수량 등 여러 개의 유전자들

이 관여하는 양적형질(병해 저항성, 출수기, 침수해 저항성, 내염성, 수량 및 수량 구성 요소 등)의 유전 분석에 이용되고 있고 특히 육종에서 간접 선발의 수단으로 활용되고 있음.

수량의 극대화를 위해서는 원 연간의 교잡 후대에서 유망 개체의 선발이 중요한 데, DNA marker를 이용하여 원 연간의 교잡 후대에서 발생되는 잡종 불임 및 유용한 형질과 열악한 형질의 연관(linkage drag)을 깨뜨리는 육종 체계가 필요함.

수량에 결정적 역할을 하는 수당 영화수와 입중(grain weight)은 수량 구성요소 중에서 가장 유전력이 높고 특히 입중은 거의 대부분의 경우 부분 우성으로 주로 상가적 유전변이가 관여하여 선발의 효과가 크다고 보고하고 있음.

벼 수량 생산성의 생화학적 배경

벼의 생산성(grain yield)은 Sink(종자)-Source(잎) 상호작용에 의해 결정된다. 벼의 경우 낱알 내에 축적되는 80% 이상의 탄수화물이 위쪽 2개의 잎(flag와 flag-1 leaf)에서 생산된다. 벼의 생산성 증대를 위한 방법으로는

1) 벼의 광합성 효율을 증대시켜 잎의 탄수화물 공급능력(source capacity)을 증대시키는 방안
2) 합성된 탄수화물의 이동능력(transport capacity)을 증대시키는 방안
3) 벼의 알곡으로의 저장능력(sink capacity)을 증대시키는 방안 등이 있다.

저장 능력을 향상시키려면 'Source' 즉 잎과 'Sink' 즉 배유에서의 생화학적인 대사의 조절이 1차적인 대상이 된다. Sucrose는 고등식물에서 광합성 산물인 탄수화물이 source에서 sink로 체관을 통해 이동하는 주요이동형태이기 때문에 체관내 sucrose 농도는 sink기관의 성장과 발달에 결정적인 영향을 미친다. 광합성은 빛이 존재할 때만 진행되지만 식물은 빛이 없을 때에도 성장을 계속하기 위하여 빛이 있을 때 합성된 탄수화물을 starch 형태로(transitory starch) 엽육세포 엽록체내에 일시적으로 저장하였다가 빛이 없을 때 이용함으로서 체관내의 sucrose 농도를 조절하고 있다.

엽육세포(leaf mesophyll cell)내 엽록체에서 합성된 탄수화물이 sucrose 형태로 변해서 sink(종자)내에 starch형태로 축적되기까지 많은 효소 및 transporter들이 관여하고 있으며 이것들의 효소활성과 유전자발현이 대사산물 혹은 빛에 의해 정교하게 조절된다.

벼를 대상으로 Sink-Source 상호작용 기작을 규명하기 위하여 Sink-Source 관련 주요대사조절효소의 조절기작이 효소와 유전자 수준에서 연구되어야한다. 또한 이를 생산성 증대로 연결시킬 수 있는 조절기작 등을 변형시킨 돌연변이체를 만들어 형질전환시킴으로서 최종적으로는 생산성이 획기적으로 증가된 벼를 개발하는 유전공학적 접근방법이 가장 조직적인 방법으로 대두되어 시도 되고 있다.

따라서 이러한 복합적인 대사조절 기작의 규명과 생산성관련 유전자 및 미생물과의 상호작용에 관여하는 유전자의 발현 분석은 본 연구 그룹이 지난 5년간 제조 분석한 5,000여 개의 종자 발현유전자와 잎 발현 유전자를 이용한 DNA 칩을 이용한 체계적인 발현 분석은 벼 생산성 증대 관련 유전자 탐색은 물론 이들의 조절기작 분석에 매우 효율적이다

2) 경제・산업적 측면

국내외 식량수급

벼는 전 세계 인구의 반 이상이 주식으로 이용하는 중요한 작물이며 다가오는 21세기에는 식량증산이 인구증가를 충족하지 못하여 세계 식량위기가 예측되고 있다. 국내 총 생산량 3조원에 이르는 우리 나라에서는 벼의 생산성 증대에 관한 연구가 전통적인 교배육종에 의존 하여온 바 기술적 한계에 도달하여 헥타르 당 생산량이 1970년대 후반 이후 6 ton 수준으로 정체되고 있다

우리 나라 벼 품종의 수량성은 1960년대 약 4 ton/ha 수준에서 1980년대에는 5~6 ton/ha로 괄목할 만한 증가를 보였는데, 이에는 단간화에 따른 내도복성의 증대, 초형의 개선에 의한 광합성 능력 향상 그리고 병해충 및 재해저항성 향상 등의 요인

이 크게 관여하였음.

그러나 지난 10여 년 동안 벼의 수량의 증가는 정체를 보여 주고 있는데 이러한 수량성의 정체는 전세계적인 현상으로 국제 미작연구소는 연차 보고서에서 1965년에 육성된 IR8과 1995년에 육성된 IR72의 수량성이 동일한 수준이라고 보고하고 있음.

향후 10년 이내에 쌀 생산량을 두 배로 증대(6 ton/ha에서 12 ton/ha)시킴으로서 현재 87% 정도 되는 남한의 쌀 자급률은 물론 남북한 통일시대에 대비 완전한 쌀 자급을 달성하는 계기를 마련할 수 있다.

3) 사회·문화적 측면

영농인력의 감소, 경작지의 감소 등에 의한 최근 벼 생산량의 감소와 함께 식생활 패턴의 변화에 의한 식량 수입 의존도 증가 및 최근 북한의 식량 위기 등을 감안할 때 국내 식량 생산을 현재 수준의 2배 수준으로 향상되어야 하므로 다른 어느 국가보다도 더욱 심각해 질 것으로 전망됨
현재 우리 나라의 쌀 시장규모가 3조원에 이르기 때문에 생산량이 두 배 증가했을 때 적어도 2조원 이상의 매출이 늘어날 것으로 예상된다.

생산성 증대는 또한 우리 나라의 벼 재배면적의 감소 (3만 ha 감소/년)에 따른 쌀 수요량 충족에 크게 공헌할 수 있다.

WTO체제의 출범과 농촌의 노동인력 감소 및 노령화로 우리의 쌀 생산기반이 크게 약화되고 있는 시점에서 다수확 품종의 개발과 환경 친화적 농업의 창출로 우리민족의 혼이라 할 수 있는 쌀 안정적 생산기반을 구축할 수 있다.

제 2절 연구개발 목표와 내용

1. Sink-Source 관련 조절 유전자 발현분석 및 벼 형질전환

기능적 게놈 연구에 의해 특히 energy source기관인 잎과 energy sink 기관인 낱

알, 뿌리 사이에서의 물질 수송과 저장에 관련된 유전자들을 탐색하고 기능을 분석하는 것은 궁극적으로 벼의 생산성 증대를 위한 결정적인 열쇠를 쥐고 있다.

전분 저장량이 증가하려면 'Source' 즉 잎과 'Sink' 즉 배유에서의 생화학적인 대사의 조절이 1차적인 대상이 된다. 'Source'인 잎의 엽록체에서 광합성에 의해 생성된 fructose-6-phopshate(F-6-P)는 glucose-1-phosphate(G-1-P)로 변환되며 이것이 ADP(adenine diphosphate)-glucose pyrophosphorylase (ADGP)에의해 ADP-glucose(ADPG)가 되어 전분으로 일시 저장된다. 이것이 glucose로 되어 세포질에서 UDP(uridine diphosphate) glucose pyrophosphorylase(UDGP)에 의해 UDP glucose(UDPG)가 되며 F-6-P와 반응하여 sucrose가 된다. 이 sucrose는 'Sink'인 배유의 세포질에서 UDGP에 의해 UDPG가 되고 G-1-P와 G-6-P로 변환되어 amyloplast에서 ADGP에 의해 ADPG가 되어 최종적으로 전분으로 저장된다.

Sucrose는 고등식물에서 광합성 산물인 탄수화물이 source에서 sink로 체관을 통해 이동하는 주요 이동형태이기 때문에 체관 내 sucrose 농도는 sink기관의 성장과 발달에 결정적인 영향을 미친다. 광합성은 빛이 존재할 때만 진행되지만 식물은 빛이 없을 때에도 성장을 계속하기 위하여 빛이 있을 때 합성된 탄수화물을 starch 형태로(transitory starch) 엽육세포 엽록체 내에 일시적으로 저장하였다가 빛이 없을 때 이용함으로서 체관내의 sucrose 농도를 조절하고 있다. 따라서 엽육세포(leaf mesophyll cell)내 엽록체에서 합성된 탄수화물이 Sucrose 형태로 변해서 Sink(종자)내에 starch형태로 축적되기까지 같이 많은 효소 및 transporter들이 관여하고 있다.

본 연구는 벼를 대상으로 Sink-Source 상호작용기작을 규명하기 위하여 Sink-Source 관련 주요대사조절효소의 조절 기작을 효소와 유전자 수준에서 연구하고 이를 생산성 증대로 연결시킬 수 있는 조절 기작 등을 변형시킨 돌연변이체를 만들어 형질전환시킴으로써 최종적으로는 생산성이 획기적으로 증가된 벼를 개발하고자 한다. 이에 Sink-Source 기관에 *E. coli* UDP-glucose pyrophosphatase 유전자를 벼에 형질전환하여 벼 생산성 증대시킴을 최종목표로 한다.

2. 수량 생산성 특성 검정 및 재료육성

식물의 에너지 저장체인 전분은 인류의 주요 에너지원으로서 벼, 밀, 옥수수처럼 씨앗에 저장되거나 감자 등에서는 괴경에 저장된다. 이러한 전분의 저장량을 증가시

키는 것이 식량 증산과 직결되기 때문에 농업과학자들은 전통적인 육종방법을 이용하여 다수확 품종을 개발하여 왔다. 우리나라의 주식인 벼의 경우는 1970년대부터 주식자급을 위한 정부의 지속적인 지원에 의해 다양한 다수확 품종을 개발하여 왔다. 하지만 미질, 내병성, 내충성을 동시에 갖는 다수확 품종을 개발하는 것은 항상 성공적이지는 않았다. 주곡작물에서 Source-Sink의 용량은 표현형으로 볼 때 잎(source), panicle, kernel(sink)등의 크기, 모양과 밀접한 관계가 있고 이것들을 생산성 구성요소(yield components)라 부르며 교배육종의 선발지표로 사용하였다. 그러나 보다 높은 생산성을 갖는 벼를 만들기 위한 교배육종에서 빈번히 생산성 형질이 유전되지 않는 결과를 가져왔고 이것은 생산성 구성 요소들이 서로 반비례적으로 연관성을 갖는 데 기인한 것으로 생각하고 이 현상을 “yield component compensation” 이라 부르고 있다.

우리 나라의 벼 육종기술은 세계적 수준이며 벼에 대한 많은 유전재료를 보유하고 있으나 농업적으로 주요한 유전특성(생산성, 환경내성, 내병성 등)의 분자 유전자 분리개발 및 이를 이용한 품종 육성은 미흡한 실정이므로 재래육종법과 유전 공학기법의 접목에 의한 신품종 육성기술개발이 시급한 과제이다. 국내에서 수 십 년 동안 육종에 의해 지금까지 확보된 다양한 수량성 관련 변이 품종으로는 수원428호(찰), 수원461호(dull), 수원461호(opaque), 수원464호(고식이섬유), 일품벼 MNU 87-5-GII-1-2, 수원392 MNU-20-4-GHI-5-1등 25 계통이 있다. 이들 변이 품종들은 배유에 화학적 처리를 하여 모본과 비교했을시 수량이 감소하는 변이품종들로, 수량관련 유전자에 변이가 원인이 되는 것으로 변이에 관여하는 유전자를 분리하여 모본과 비교하면 수량성에 관여하는 유전자를 규명할 수 있는 연구를 수행할 수 있다. 이들 변이 품종을 대상으로 특히 수량성 증대와 관련된 변이종을 1차적 대상으로 분석함으로써 이들 변이종들의 특정형질에 기여하는 유전자를 분리하여 규명하고 궁극적으로 생산성에 관련된 다양한 유전자들을 효율적으로 탐색한다. 또한 변이에 관여하는 유전자를 probe DNA로 사용하여 DNA 칩에 의한 분석 재료로 이용하여 기능적 게놈 연구를 수행함으로써 유용 유전자 탐색 및 그 응용면에서 매우 효율적인 연구를 수행할 수 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술 개발 현황

1. Sink-Source 관련 조절 유전자 발현분석 및 벼 형질전환

벼의 생산성 증대를 위한 방법으로는 벼의 광합성 효율을 증대시켜 잎의 탄수화물 공급능력(source capacity)을 증대시키는 방안, 합성된 탄수화물의 이동능력(transport capacity)을 증대시키는 방안, 그리고 벼의 종자로 저장능력(sink capacity)을 증대시키는 방안 등이 있다. 전분 저장량이 증가하려면 'Source' 즉 잎과 'Sink' 즉 종자에서의 생화학적인 대사 조절이 1차적인 대상이 된다. Source로부터 Sink까지의 대사경로는 그림 1과 같다. 광합성은 빛이 존재할 때만 진행되지만 식물은 빛이 없을 때에도 성장을 계속하기 위하여 빛이 있을 때 합성된 탄수화물을 starch 형태(transitory starch)로 엽록체 내에 일시적으로 저장하였다가 빛이 없을 때 이용한다. 잎의 엽록체에서 광합성에 의해 생성된 fructose-6-phopshate (F-6-P)는 glucose-1-phosphate (G-1-P)로 변환되며 이것이 ADP (adenine diphosphate) - glucose pyrophosphorylase (AGPase)에 의해 ADP-glucose (ADPG)가 되어 일시적으로 전분 형태로 저장된다. 이것이 glucose로 되어 세포질로 이동된 후 UDP (uridine diphosphate) glucose pyrophosphorylase (UGPase)에 의해 UDP glucose (UDPG)가 합성 되고, F-6-P와 반응하여 sucrose가 합성 된다. 이 sucrose가 'Sink'인 종자의 세포질로 이동 된 후 UGPase에 의해 UDPG가 되고 G-1-P로 변환되어 amyloplast에서 AGPase에 의해 ADPG가 되어 최종적으로 전분으로 저장된다.

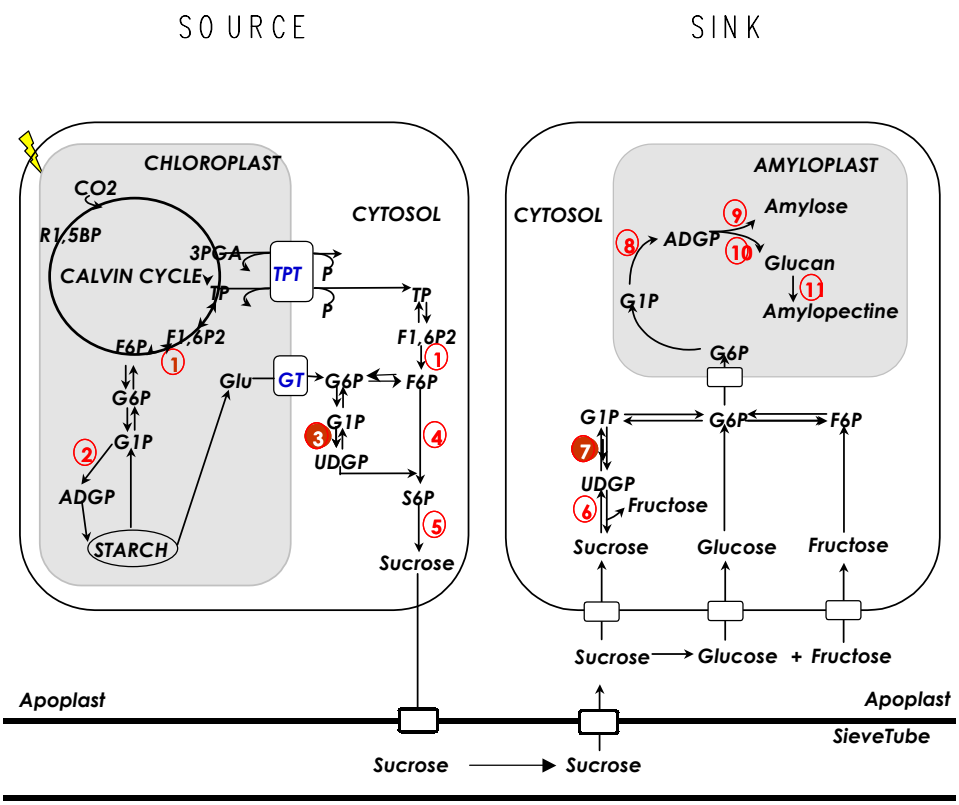
UGPase는 박테리아는 물론 식물이나 동물에서도 쉽게 찾아 볼 수 있는 효소이다. 식물에서 UGPase는 대부분 세포질에 존재 한다 (Usuda, H. 1980). 감자의 UGPase의 N-terminal에 Transit peptide가 없다는 사실을 확인했으며 (Takuya. k., 1990), 벼의 UGPase는 90%가 세포질에 존재하고 나머지 10%는 amyloplast 나 Golgi membrane에 존재한다. 후자의 경우 UDPG는 세포벽의 polysaccharide합성에 관여한다 (Dhugga, K.S., 1991)

감자에서 immunoblot을 통해 UGPase는 종자, 줄기, 잎, 뿌리, 그리고 callus등 다양한 조직에 존재하는데, 뿌리나 잎에 비해 종자나 줄기에 두드러지게 많은 활성을 가지고 있다 (Kimura, S., 1992).

source 기관인 잎에서 UGPase는 UTP와 glucose-1-P로부터 UDPG를 합성하고, sink 기관인 종자에서 UGPase는 UDPG와 PPi로부터 glucose-1-P와 UTP를 합성한다 (Katsube et al., 1991).

PPi의 농도는 UGPase 의 가역적 반응에 영향을 미치는 가장 중요한 요인으로 작용한다. 아마도 PPi는 PPi-dependent phosphofructokinase의 역반응에 의해서 사용됨으로써 세포질에서 PPi 농도를 조절하게 되는데, 이러한 PPi의 제거는 UDPG 합성 쪽으로 UGPase 반응을 이끌게 되고, 따라서 source tissue에서 sucrose합성에 관여한다고 알려져 있다. 감자의 cytosol에서 E.coli inorganic pyrophosphorylase를 발현시킨 결과 sucrose가 몇배 증가함을 보였고, 마찬가지로 sucrose합성 쪽으로(단일방향으로) UGPase 반응이 일어나고 있음을 보여주고 있다 (Sonnewald U., 1992). 곡류 seed의 경우 sucrose 분해에 필요한 PPi는 아마도 plastid 에서 PPi/adenine nucleotide exchanger에 의해 공급되거나 (Hawker J., 1991), cytosolic AGPase에 의한 ADPG 합성 과정에서 생성되는 것으로 알려져 있다 (Leszek A., 1994). endogenous한 potato AGPase를 감자에 도입시켰을 때 tuber에 감자의 starch content가 오히려 감소하였고, 반대로 mutant *E.coli AGPase*를 도입시켰을 때 tuber에서 starch축적이 증가함을 보였다 (Stark et. al., 1992).

E.coli UGPase는 가역적 반응이고, 효소로 작용하는데 있어서 Mg^{2+}가 필수적이고, 또한 free UTP와 PPi에 의해 억제된다는 점에서 식물이나 동물의 UGPase와 거의 동일하다. *E.coli* UGPase는 다른 박테리아 UGPase의 아마노산 서열과 비교해 보면 상당한 유사성을 가지는데 (*S. typhimurium* UGPase와 58%가 동일하며, *A. xylinum* UGPase와는 41%가 동일), 대조적으로 진핵생물의 UGPase와는 거의 유사한 점을 찾을 수 없다. 하지만 감자의 UGPase에 존재하는 5개의 lysyl 잔기가 *E.coli* UGPase에서도 발견됨으로써, 부분적인 유사성을 찾을 수 있다 (shaikh et, al,. 1994, Yasuaki et, al,. 1991).



1. Fructose1,6-bisphosphatase
2,8. ADP-Glucosepyrophosphorylase
3,7. UDP-Glucose pyrophosphorylase
4. Sucrose phosphate synthase
5. Sucrose phosphate phosphatase
6. Sucrose synthase
9. Granule bound starch synthase
10. Soluble starch synthase
11. Branching enzyme

그림 1. The pathway of starch synthesis in chloroplast and accumulation of starch in amyloplast.

2. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

획기적인 형질전환 기법의 확립과 함께 현재 유전공학 기술로 1997년까지 전세계적으로 생산된 3,800여종의 신형질 전환작물이 포장시험 중에 있으며 50여종이 이미 상품화되었고 나머지 대부분이 3~5년 내에 실용화 될 것으로 전망된다 (James, 1997).

벼 형질전환에 사용되는 기술은 현재 유전자총(particle gun) 이용법이 널리 사용되고 있으며(Kim et al., 1994) 최근에 *Agrobacterium*을 이용하는 방법이 개발되고 있어서 형질전환 기술의 국내 정착이 비교적 용이함(Lee et al., 1998 ; Kim et al., 1998 ; Jang et al., 1998).

벼 형질전환 기술이 보급되면서 현재까지 환경내성에 관련된 *Bt* toxin 유전자 (Fujimoto et al, 1993) 혹은 proteinase inhibitor 유전자(Ray Wu et al, 1994)를 이용한 내충성 벼, chitinase 유전자 도입에 의한 내0병성 벼(Lin et al., 1995) Rip 유전자 도입 및 제초제 저항성 벼(Kim et al., 1998)등이 있음.

그러나 벼 형질전환 기술이 1989년에 최초로 개발된 (Shimamoto, 1989) 이후 10여년이 흐른 지금에 이르기까지 형질전환 식물체가 전세계적으로 아직 한 건도 상업화되지 않았는데 이것은 농업적으로 유용한 벼 형질 전환용 유전자의 부족과 또한 쌍자엽 식물에서와 같은 효율적인 형질전환 체계의 부족에 기인한다고 볼 수 있다.

벼를 포함한 작물의 형질전환기술이 널리 보급되면서 최근에 식물유전 공학의 당면과제로 등장하는 것들을 보면 4가지로 요약할 수 있다.

첫째, 도입유전자의 copy number와 발현수준이 연관성이 없고 오히려 multicopy 형질전환체의 경우 발현수준이 떨어진다.

둘째, 유전자의 염색체내 삽입부위에 따라서 도입유전자의 발현수준이 크게 달라진다(position effect).

셋째, 두 개이상의 도입유전자가 존재할 경우에 도입 유전자의 발현이 정지되는 경우가 많다(transgene silencing).

넷째, 도입유전자의 발현수준이 원하는 표현형을 나타낼 만큼 충분히 높지 못하다.

이러한 문제점들은 현재 프로모터의 선정, intron sequence의 사용, 형질 전환 후 single copy를 갖는 형질전환체의 선발 등의 방법으로 부분적으로 해결하고 있으나, 매우 소극적이고 수동적인 방법이기 때문에 이러한 현상들에 대한 원인구명 및 적극적인 해결방안이 성공적인 형질전환체 개발에 필수적이다.

우리 나라의 벼 육종기술은 세계적 수준이며 벼에 대한 많은 유전재료를 보유하고 있으나 농업적으로 주요한 유전특성(생산성, 환경내성, 내병성 등)의 분자 유전자 분리개발 및 이를 이용한 품종 육성은 미흡한 실정이므로 재래육종법과 유전공학기법의 접목에 의한 신품종 육성기술개발이 시급한 과제이다.

본 연구팀은 지난 5년간 Agrobacterium을 이용한 벼 형질전환 기법을 이용하여 제초제 저항성 벼, 항균선 유전자 도입 벼, 전분 분지효소 도입에 의한 전분 분지 증가 벼등을 개발한 바 있으며 아울러 2000년 후반에 개발 완료 예정으로 5,000여개의 벼 발현 유전자를 이용한 DNA Chip을 제조하고 있다.

또한 본 연구에서는 이미 본 연구진에 의해서 도입유전자의 안정적인 발현유도 효과가 검증된 chicken lysozyme 5′MAR sequence를 사용하여 운반체를 제작함으로서 Sink/Source 관련 유전자 벼 형질전환율을 증대시키고 도입유전자의 불활성화율을 최소화하며, 도입유전자의 발현수준 및 발현양상을 조절하여 표현형을 효과적으로 표출시키는 방법을 사용하고자 한다.

제 3 장　연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 Sink-Source 관련 조절 유전자 발현분석 및 벼 형질 전환

1) *E. coli*의 UDP-glucose pyrophosphosrylase 유전자 분리

가) UDP-glucose pyrophosphosrylase(UGPase) 유전자 분리

UGPase의 상위 지역에 *Nco I* site를 추가 시킨 NcoUGP primer와 UGPase의 하위 지역에 *NotI* site를 추가시킨 UGPNot primer를 이용하여 PCR 한 결과 그림 2와 같은 결과를 얻었다.

나) pGEM-T운반체를 사용한 중간 운반체 제작

PCR에서 분리된 UGPase를 *Nco*I과 *Not*I으로 처리한 후, 동효소로 처리 된 pGEM-T 운반체(promega)에 도입하였고, DNA Sequencing을 통해서 UGPase가 올바르게 PCR되었는지 확인하였고 그 결과는 그림 3과 같다.

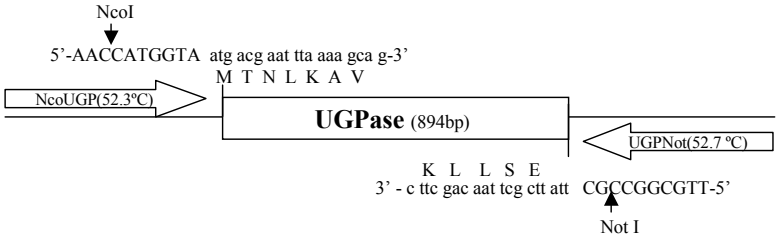
2) *E. coli*의 UDP-glucose pyrophosphosrylase 가 도입된 형질전환용 운반체 제작

가) Source기관 발현용 운반체 제작

최종 운반체인 pMJ21에 UGPase와 promoter를 도입하기 위해서, pSBRG에 존재하는 *rbc*S promoter를 *Bam*HI과 *Xba*I으로 처리한 후 동 제한효소 처리된 pMJ21에 도입시켰고 그 결과는 그림4와 같다. UGPase의 경우 *Not*I과 *Xba*I으로 처리 한 후 동 제한효소 처리 된 pMJ-rbc에 도입하기 위하여 pGEM-T 운반체에 도입된 UGPase를 *Sph*I과 *Sac*I으로 처리하여 동 제한효소 처리 된 pQE-30(QIAGEN)에 도입한 후, pQE-UGP를 *Bam*HI과 *Kpn*I으로 처리하여 동 제한 효소 처리된 pBluescript II SK(Stragene)에 다시 도입 중간 운반체인 pBlue-UGP를 제작하여 이를 *Not*I과 *Xba*I으로 처리하여 pMJ21에 삽입하였다.

최종 운반체로써 제작된 pRBC-UGP21을 그림 5와 같이 *Hind*III, *Nco*I, *Eco*RV, *Bam*HI과 *Not*I(TaKaRa)으로 처리하여 제한 효소지도 작성을 통해 그 크기를 확인하였으며, 이를 다시 제작한 NcUGP와 UGPNot primer를 이용하여 PCR을 수행하여 UGPase의 크기인 914bp 밴드를 통해 올바르게 제작되었음을 재확인하였다.

a)



b)

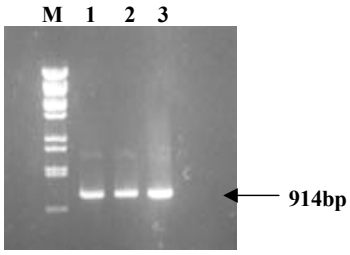


그림 2.a) The gene encoding UDP-glucose pyrophophorylase(UGPase) of E.coli

b) Polymerization-chain reaction product of UGPase from *E.Coli* genomic DNA.

The PCR was performed using NcoUGP(5′-AACCATggTAATgACgAATTTAAAAgCAg-3')

and UGPNot primer(5'- TTgCggCCgCTTATTCgCTTAACAgCTTC-3').

M, λ-Bst I as a size marker,

lane1-3, UGPase

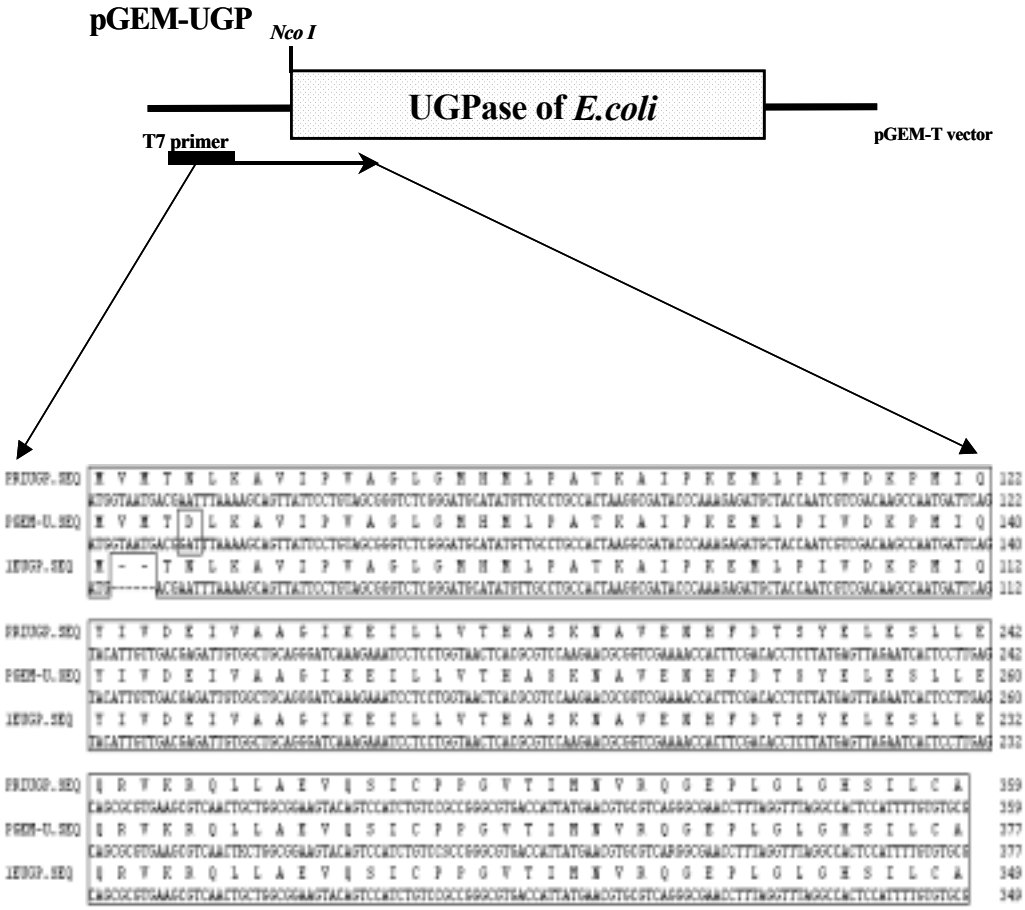


그림 3) DNA Sequencing of pG-UGP

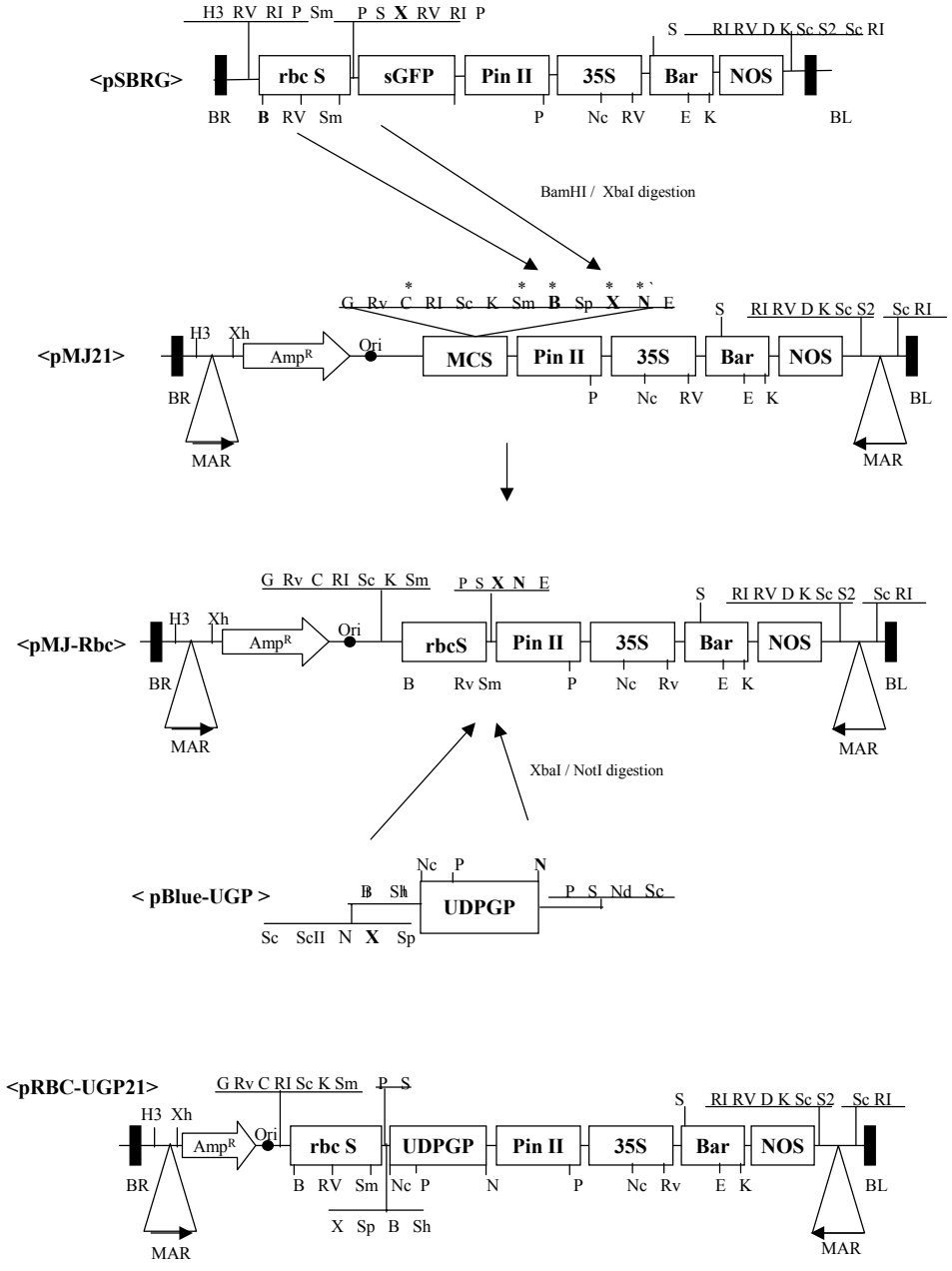
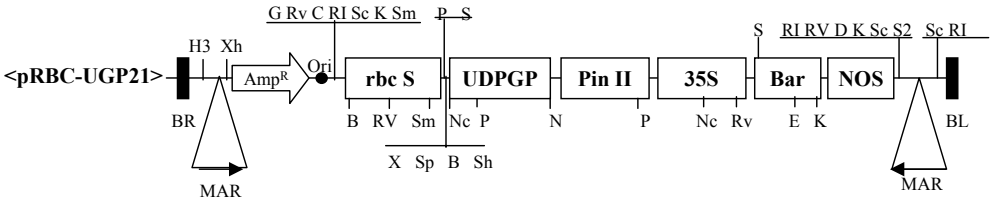


그림 4) Intermediate vectors generated during the Construction of plasmid pRBC-UGP21



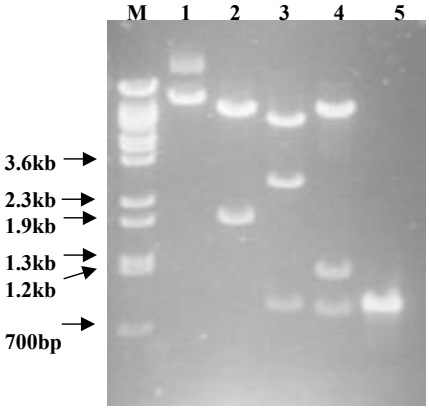


그림 5) Restriction Analysis of the plasmid, pRBC-UGP21.
M, λ-Bst I as a size marker; lane1, pRBC-UGP21digested with Hind III; lane 2, pRBC-UGP21 digested with Nco I; lane 3, pRBC-UGP21 digestde with EcoRV; lane 4, pRBC-UGP21 digested with Bam HI plus Not I; lane 5, PCR product

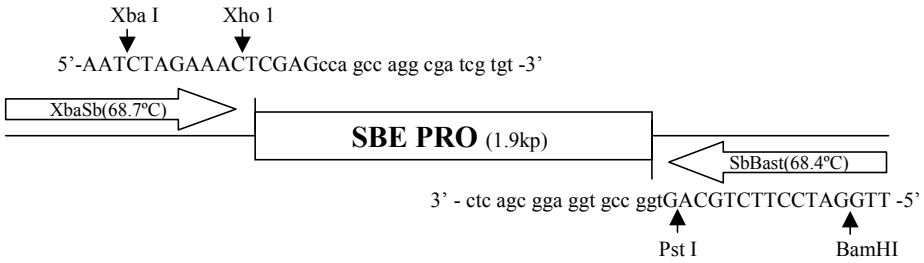
나) Sink기관 발현용 운반체 제작

최종 운반체인 pMJ21에 도입하기 위해서는 SBE promoter에 *Xba*I site를 확보해야 하고, UGPase에 *Bam*HI site를 확보해야 한다. 그림 6a와 같이 본 연구팀이 제작한 XbaSb primer (5′aatctagaactcgagccagccag gcga tcgtgt3′) SbBast primer(5′ttggatc cttctgcagtggccgtggaggcgactc3′)를 이용하여 SBE promoter를 가지고 있는 운반체를 주형으로 이용해서 제조회사(TaKaRa)의 방법대로 위에서 기술한 것과 동일한 방법으로 PCR 과정을 수행하고 SBE promoter 1.9kb를 분리하였고 그 결과는 그림 6과 같다.

획득된 SBE promoter는 그림 7과 같이 *Xba*I과 *Bam*HI으로 처리하여 동 제한 효소 처리된 pBluescript II SK에 도입하여 pBlue-UGP운반체를 만들었고, pQE-UGP를 *Bam*HI과 *Kpn*I으로 처리하여 동 제한 효소 처리된 pBlue-SBE에 도입하여 중간 운반체인 pSBE-UGP를 제작하였다. 마지막으로 pSBE-UGP를 *Xba*I과 *Not*I으로 처리하여 동 제한효소 처리 된 pMJ21에 도입하여 최종 운반체인 pSBE-UGP21를 제작하였다.

최종 운반체로서 제작된 pSBE-UGP21은 전체 크기가 약 1.6kb로 이들은 그림 8과 동일한 제한효소로 처리하여 제한효소 지도를 작성하여 확인하였다.

a)



b)

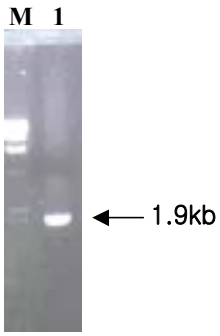


그림 6 a) The gene encoding SBE
b) PCR product of SBE promoter from vector including the SBE promoter.
M, λ-Bst I as a size marker; lane1, SBE promoter.

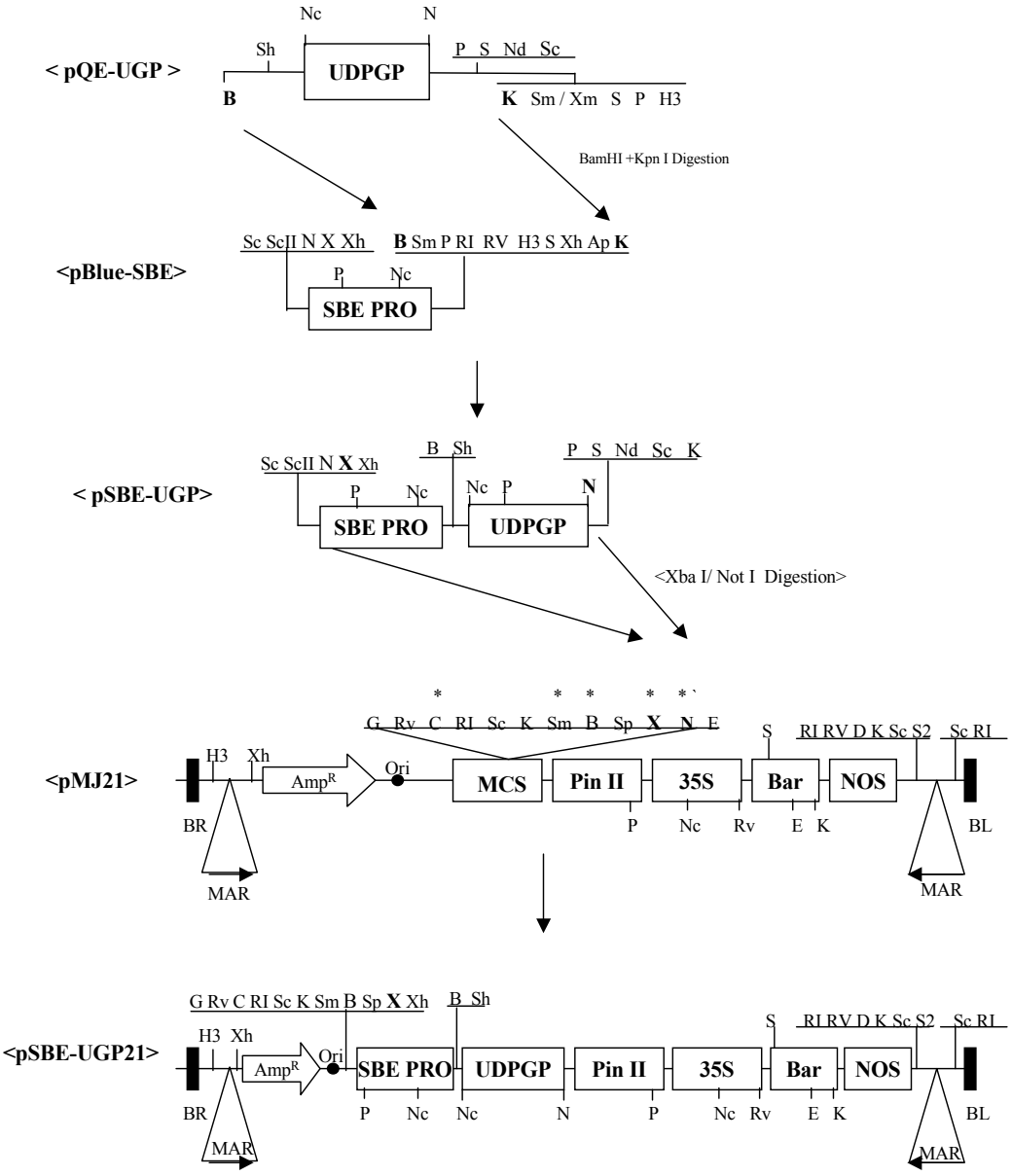
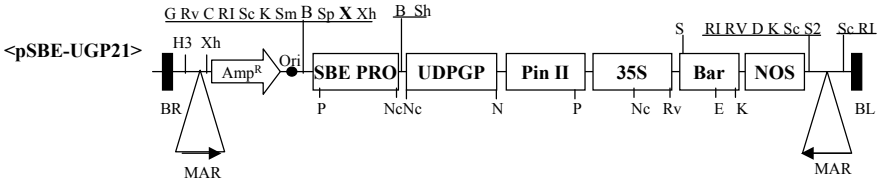


그림 7) Intermediate vectors generated during the Construction of plasmid pSBE-UGP21



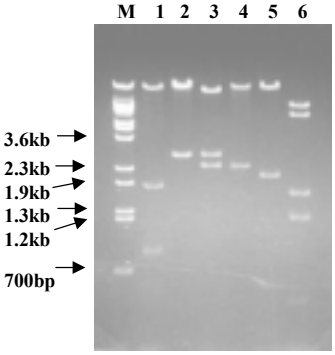


그림 8) Restriction Analysis of the plasmid,pSBE-UGP21.
M, λ-Bst I as a size marker;
lane1, pSBE-UGP21digested with Not I plus BamHI;
lane 2, pSBE-UGP21 digested with Xba I plus Not I;
lane 3, pSBE-UGP21 digestde with Xho I plus Not I;
lane 4, pSBE-UGP21 digested with Xho I plus Xba I;
lane 5, pSBE-UGP21 digestedwith NcoI;
lane 6, pSBE-UGP21 digested with PstI

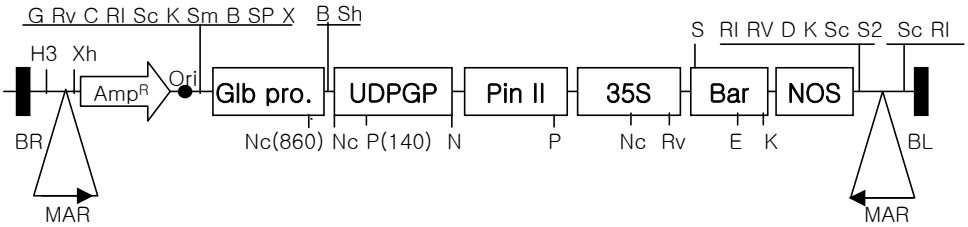
다) Sink기관 발현용 운반체 제작 Ⅱ

Takaiwa로부터 분양 받은 pUC-Glb에서 Globulin을 분리하여 최종 운반체인 pMJ21에 도입하기 위해서 그림 9와 같이 pUC-Glb를 *Xba*I과 *Bam*HI으로 처리하여 동 제한 효소 처리된 pBlue-UGP운반체에 도입하여 중간 운반체인 pGlb-UGP를 제작하였고, 이 운반체를 *Xba*I과 *Not*I으로 처리하여 동 제한효소 처리 된 pMJ21에 도입하여 최종 운반체인 pGlb-UGP21를 제작하였다.

최종 운반체로서 제작된 pGlb-UGP21은 전체 크기가 약 1.6kb로 이들은 그림 8과 동일한 제한효소로 처리하여 제한효소 지도를 작성하여 확인하였고 그 결과는 그림 10과 같다.

pGlb-UGP21이 올바르게 제작되었는지 sequencing을 통해 확인하기 위해, (주)아트만사이언스에 의뢰하여 Primer Glb600(5‘ acatacataacttcagaaacc 3′) 을 제작하였다. (주)그린진바이오텍에 의뢰하여 Glb600으로 Sequencing하였고 그 결과는 그림 11과 같다.

pGlb-UGP21



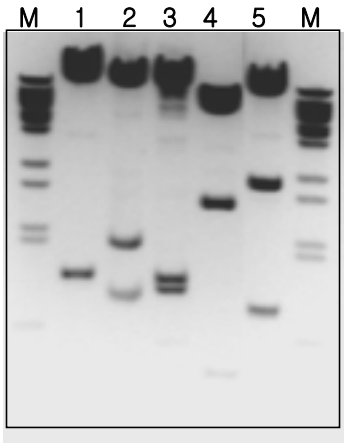


그림 10) Restriction Analysis of the plasmid , pGlb-UGP21
M, λ-Bst I as a size marker ;
Lane 1, pGlb-UGP21 digested with BamHI;
Lane 2, pGlb-UGP21 digested with NcoI plus NotI;
Lane 3, pGlb-UGP21 digested with BamHI plus NotI;
Lane 4, pGlb-UGP21 digested with PstI
Lane 5, pGlb-UGP21 digested with NcoI plus XbaI

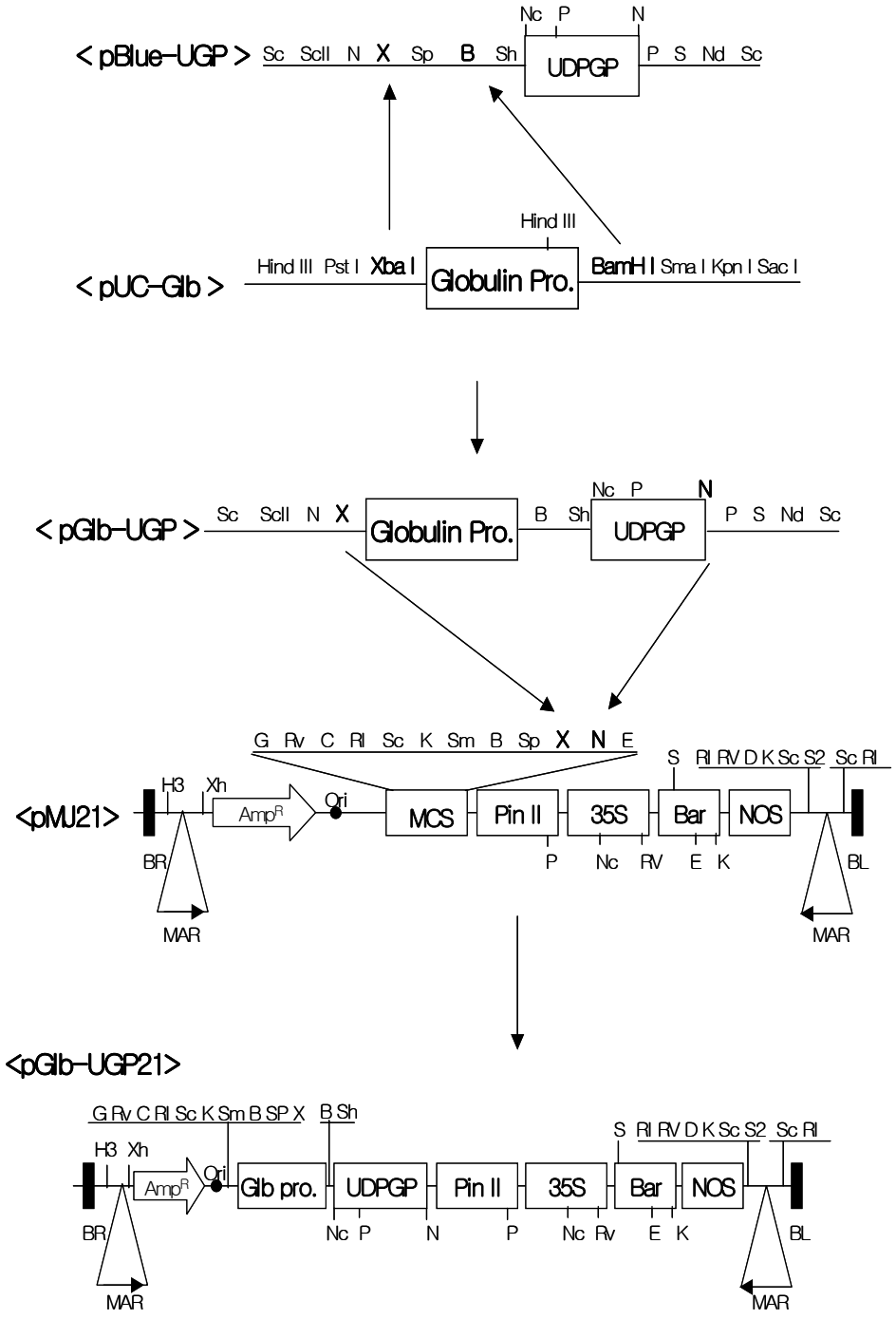
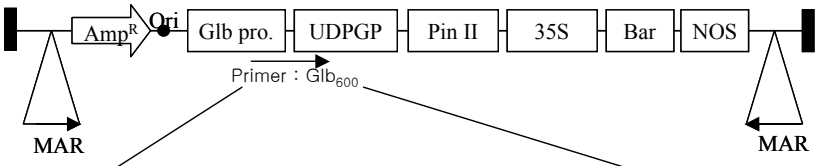


그림 9) ntermediate vectors generated during the Construction of plasmid pGlb-UGP21




```
Sequencing  :  46 tctttttgcaagctccaaatcttggaaaccttttttcactctttgcagcattgtactcttg 105
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Glb promoter: 754 tctttttgcaagctccaaatcttggaaaccttttttcactctttgcagcattgtactcttg 813

Sequencing  : 106 ctctttttccaaccgatccatgtcaccctcaagcttctacttgatctacacgaagctcac 165
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Glb promoter: 814 ctctttttccaaccgatccatgtcaccctcaagcttctacttgatctacacgaagctcac 873

Sequencing  : 166 cgtgcacacaaccatggccacaaaaaccctataaaaccccatccgatcgccatcatctca 225
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Glb promoter: 874 cgtgcacacaaccatggccacaaaaaccctataaaaccccatccgatcgccatcatctca 933

Sequencing  : 226 tcatcagttcatcaccaacaaacaaaagaggnnnnnnnncatatacacttctagtgattg 285
                  ||||||||||||||||||||||||||||||||        ||||||||||||||||||||||
Glb promoter: 934 tcatcagttcatcaccaacaaacaaaagaggaaaaaaaacatatacacttctagtgattg 993

Sequencing  : 286 tctgattgatcatca 300
                  |||||||||||||||
Glb promoter: 994 tctgattgatcatca 1008




Sequencing  :   307 taatgacgaatttaaaagcagttattcctgtagcgggtctcgggatgcatatgttgcctg 366
                    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
UGPase      : 11418 taatgacgaatttaaaagcagttattcctgtagcgggtctcgggatgcatatgttgcctg 11359

Sequencing  :   367 ccactaaggcgatacccaaagagatgctaccaatcgtcgacaagccaatgattcagtaca 426
                    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
UGPase      : 11358 ccactaaggcgatacccaaagagatgctaccaatcgtcgacaagccaatgattcagtaca 11299

Sequencing  :   427 ttgttgacgagattgtggctgcagggatcaaagaaatcctcctggtaactcacgcgtcca 486
                    ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
UGPase      : 11298 ttgttgacgagattgtggctgcagggatcaaagaaatcctcctggtaactcacgcgtcca 11239

Sequencing  :   487 agaacgcggtcgaaaaccacttcgacacctcttatgagtta 527
                    |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
UGPase      : 11238 agaacgcggtcgaaaaccacttcgacacctcttatgagtta 11198
```

그림 11) DNA Sequencing of pGlb-UGP21

3) *Agrobacteria*을 이용한 벼의 형질 전환

가) 핵 형질전환용 운반체의 *Agrobacteria*내로의 도입

형질 전환용 운반체(pSBE-UGP, pRBC-UGP21, pGlb-UGP21)를 plasmid pSB1에 도입하는 것은 triparental mating방법에 의해 수행했다. acceptor vector pSBI을 지닌 *A. tumefaciens*LBA4404를 ABT고체 배지에서 28℃에서 3일간 배양하고, *E.coli* HB101(pRK2013을 가진 conjugal helper strain)과 벼 형질전환용 운반체가 포함된 E.*coli* DH5α를 각각 LBK 고체배지와 LBS 고체배지에서 37℃에서 하룻밤동안 배양한 후 *A. tumefaciens*LBA4404, HB101, DH5α를 spotting하여 잘 28℃에서 하루 동안 배양한 후, 섞여 있는 균주들을, ABST 액체배지 500㎕에 잘 섞고 희석하여 ABST 액체배지에 spreading하고 28℃에서 3일간 배양했다. 배지 위에 형성된 single colony를 새로운 ABST 고체배지에 도말한 뒤, 그 후로도 두 번 계대 배양을 통해 최종적으로 형성된 single colony를 확보하였다. 선택된 colony들로부터 Ti-plasmid DNA의 분리는 ABST 고체배지에서 배양 중인 single colony를 취해 YEPST 액체배지 3㎖에 접종한 후 28℃에서 200rpm shaker에서 2일간 배양하였다. 그 후 4℃, 14000rpm에서 1분간 원심분리를 통해 cell pellet을 얻은 다음 cell lysis를 위해 150mM glucose, 25mM Tris Cl, 10mM EDTA(pH 8.0) 90㎕와 4㎎/㎖ lysozyme 10㎕를 넣고 잘 섞은 후 10분간 방치한 뒤 2N NaOH, 1% SDS를 200㎕를 넣은 후 10분간 방치하고, 2N NaOH, 1% SDS 60㎕, phonol 30㎕를 첨가한 후, 3M sodium acetate(pH4.8) 150㎕를 넣고 섞어서 -20℃에서 15분 동안 방치하였다. 4℃, 15000rpm으로 10분간 원심분리하여 supernatant을 취한 다음 1㎖ 95% cold 에탄올과 혼합하여 -70℃에서 15분 방치한 후, 4℃에서 15000rpm으로 10분간 원심분리하여 supernatant을 버리고 0.3M sodium acetate(pH7.0) 500㎕와 1㎖의 95% cold 에탄올과 혼합하여 다시 -70℃에서 15분 동안 방치하였다. 4℃에서 15000rpm으로 3분간 원심 분리하여 supernatant를 완전히 제거하여 DNA를 얻은 후 30㎕ 멸균수에 녹인 후, *SalI*으로 처리한 다음 전기영동을 통해 co-integration여부를 확인했다. 그림 12와 13과 같이 co-integration이 일어난 *A. tumefaciens*LBA4404에서는 co-integration이 일어나지 않은 *A. tumefaciens*LBA4404에서는 볼 수 없는 7.4kb와 3.0kb의 band를 확인할 수 있었다.

나) 벼 형질 전환 및 재분화

(1) 벼 종자로 부터 callus 유도

실험 당 약 200여개의 종자를 70% 에탄올로 1min간 씻어준 후, 20% 클로락스에

담가서 2시간 동안 멸균한 후, 멸균수로 3-4번 씻어서 클로락스를 제거한 다음, 2N6에 치상하여 28℃ 배양기에서 3-4주간 암배양 했다. 3-4주 후 생성된 callus를 새로운 2N6배지에 계대배양하여 옮긴지 4일 후 callus를 형질 전환에 사용했다.

(2) Co-cultivation

co-integration이 일어난 *A. tumefaciens*를 ABST 액체 배지에서 2-3일간 OD_{600}=0.6이나 OD_{600}=1이 될 때까지 키운다. *A. tumefaciens*를 원심분리하여 pellet을 AAM에 resuspension시키고(OD_{600}=2이 되도록), 20분간 방치해 둔 다음 callus를 넣었다. callus를 거름종이에 씻은 후 2N2-AS에 옮겨서 20℃ 배양기에서 3일 동안 암배양하였다.

(3) 1,2차 선별

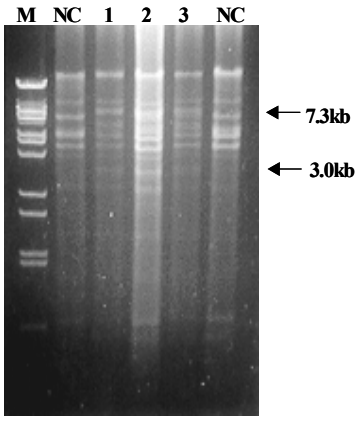
3일 후 *Agrobacteria*와 함께 배양된 callus중 형질 전환된 callus만을 선별하기 위해 2N6-CP로 옮겨서 4주 동안 28℃배양기에서 암 배양하여 1차 선별을 한후, 1차 선별된 callus를 N6-7-CP로 옮겨서 28℃배양기에서 10일 동안 암배양하여 2차 선별을 하였다.

(4) 재분화 유도 및 온실 재배

1,2차 선별 모두 마친 callus만을 MS-CP 재분화 배지로 옮겨 28℃ 배양실에서 명배양했다. 배양실에서 재분화된 벼 형질 전환체는 MS Magenta 배지에 옮겨서 식물체를 성장시킨 다음 토양이 있는 용기로 옮겨 온실에서 배양하였고 그 결과는 표 2와 같다. 온실에서 옮긴 후 14일이 지난 후 Barsta저항성 검정을 실시한 후, *Glb::ugp, Sbe::ugp,* 그리고 *Rbc::ugp*각각 21 개체, 6개체, 6개체의 형질전환벼를 얻었다.

표.1) Media for rice transformation

Midium	Composition
LB broth	tryption 10 g, yeast-extract 5 g, NaCl 10 g, pH 7.0 /L
LB plate	LB broth plus agar 15 g, pH 7.0 /L
LBA broth	LB broth plus amphicillin 50 ㎍/ml, pH 7.0 /L
LBS broth	LB broth plus spectinomycine, pH 7.0 /L
LBA plate	LB plate plus amphicillin 50 ㎍/ml, pH 7.0 /L
LBS plate	LB plate plus spectinomycine, pH 7.0 /L
LBK plate	LB plate plus kanamycin 50 ㎍/ml, pH 7.0 /L
AAM	AA salts and amino acids MS vitamins casamino acids 500㎎, sucrose 68.5 g, glucose 36 g, acetosyringone 100 uM, pH 5.2 /L
2N6	N6 major salts, N6 minor salts, N6 vitamins, casamino acids 2 g, sucrose 30 g, 2,4-D 2 ㎎, gelrite 2 g, pH 5.8 /L
2N6-CP	2N6 medium plus cefotaxime 250 ㎎, phosphinotricin 7 ㎎, pH 5.8 /L
2N6-AS	2N6 plus glucose 10 g, acetosyringone, pH 5.2 /L
N6-7-CP	N6 major salts, N6 minor salts, N6 vitamins, casamino acids 2 g, sucrose 20 g, sorbitol 30 g, 2,4-D 1 ㎎,6-benzyladenine 0.5 ㎎, phosphinotricin 7 ㎎, cefotaxime 1 g, Gelrite 2 g, pH 5.8 /L
MS-CP	MS salts, MS vitamins, myo-inositol 100 mg, sucrose 30 g NAA 1 mg, kinetin 2 mg, Ggelite 4 g cefotaxime 50 mg, phosphinotricin 4 mg, pH 5.8 /L
AB buffer	K_2HPO_4 60 g, NaH_2PO_4 20 g /L
AB salts	NH_4Cl 20 g, $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 6 g, KCl 3 g, $CaCl_2$ 0.2 g, $FeSO_4{\cdot}7H_2O$ 50 mg /L
ABT	AB buffer 50 ml, AB salts 50 ml, glucose 5 g, agar 15 g, tetracycline 10 ug/ml /L
ABST	AB buffer 50 ml, AB salts 50 ml, glucose 5 g, agar 15 g, tetracycline 10 ug/ml, spectinomycin 50 ug/ml /L
YEPST	bacto-peptone 10 g, bacto-yeast extract 10 g, NaCl 5 g, tetracycline 10 ug/ml, spectinomycin 50 ㎍/ml /L



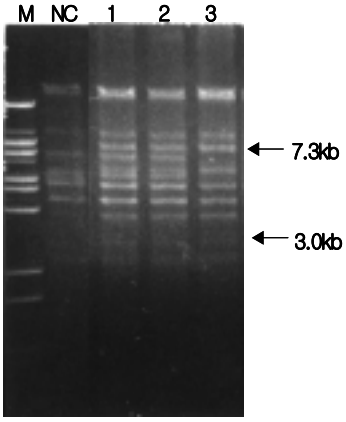


그림 12) Restriction analysis of co-integrated vector.
The plasmid pSBE-UGP21 co-integrated into the plasmid pSB1 in *A. tumefaciens* LBA 4404 after triparental mating was isolated and digested with Sal I.
M, λ-Bst I as a size marker;
NC, *A. tumefaciens* LBA 4404 digested with Sal I and used as a negative control;
lane 1-3, pSBE-UGP21/pSB1 digested with Sal I.

그림13) Restriction analysis of co-integrated vector.
The plasmid pRBC-UGP21 co-integrated into the plasmid pSB1 in *A. tumefaciens* LBA 4404 after triparental mating was isolated and digested with Sal I.
M, λ-Bst I as a size marker;
NC, *A. tumefaciens* LBA 4404 digested with Sal I and used as a negative control;
lane 1-3, pRBC-UGP21/pSB1 digested with Sal I.

표 2) *Agrobacterium*-mediated transformation of rice

plasmid	Experiments	numbers of callus			
		Co-cultivation	primary selection	secondary selection	Herbicide resistant plants
Glb::ugp	1	300	150(50%)	55(17%)	5
	2	360	160(44%)	60(17%)	1
	3	320	170(53%)	40(13%)	2
	4	320	150(47%)	53(17%)	3
	5	290	120(41%)	30(10%)	7
	6	330	170(52%)	40(12%)	3
		1920	920(48%)	278(14%)	21
Sbe::ugp	1	256	169 (66%)	48 (18%)	0
	2	243	116 (48%)	42 (17%)	1
	3	224	124 (55%)	37 (17%)	2
	4	286	146 (51%)	40 (14%)	1
	5	235	165 (70%)	38 (23%)	2
		1497	878 (58%)	227(15%)	6
Rbc::ugp	1	256	110(43%)	54(21%)	1
	2	220	98(45%)	40(18%)	2
	3	260	111(43%)	50(19%)	1
	4	230	100(23%)	60(26%)	1
	5	300	120(40%)	65(22%)	1
		966	319(33%)	144(15%)	6

4) 형질전환 벼 식물체 내 유전자 도입 확인 및 발현 분석

가) 형질전환 벼 식물체 내 유전자 도입 확인

형질전환 벼 식물체 내에 *ugpase* 유전자의 도입 확인 및 도입된 유전자 수 (copy number)를 알아보기 위해 genomic Southern blot 분석을 수행하였다.

형질전환벼와 비형질전환 벼의 잎 1g을 액체 질소로 얼린 다음, 막자사발을 이용하여 마쇄시킨다. 3ml DNA extraction buffer (7M urea, 0.35M Na2SO4, 50mM Tris/pH 8.0, 20mM EDTA, 1% sarkosyl, 0.6% SDS)를 더해서 잘 섞는 다음, 차례로 3ml의 phenol과 chloroform을 넣고 각각 10min동안 천천히 섞었다. 8000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 취한 다음 0.3ml의 4.4M NH_4OAc / pH5.2와 3ml의 isopropyl alcohol을 더해서 spool out을 통해 DNA를 회수하였다. 회수된 DNA를 750㎕의 TE 에 녹인 다음, 3㎕의 RNase (10㎍/㎕)를 넣고 60℃에서 30분 동안 반응시켰다. 8000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 취한 다음 위에서와 같이 phenol/chloroform을 처리하고 0.3ml의 4.4M NH_4OAc / pH5.2와 3ml의 isopropyl alcohol을 더해서 spool out을 통해 DNA를 회수했다. 회수된 DNA를 500㎕의 TE 에 녹였다. 분리한 genomic DNA 5ug을 제한 효소로 하룻밤 동안 처리하여 자른 다음, 1% agarose gel에 전기영동 하였다. 전기영동이 후 agarose gel을 0.25N HCl에 10분 동안 담가서 depurination시킨 후 물로 20분 동안 씻었다. capillary transfer method를 이용하여 agarose gel로부터 charged nylon membrane (Hybond-N^+, Amersham, UK)으로 DNA를 transfer했다. 이 blot을 hybidization solutin (500mM NaHPO4, 1mM EDTA, 7% SDS, 0.5 % BSA, 50ug salmon sperm DNA)에 넣은 65C℃에서 4시간 동안 pre-hybridization시킨 다음, radio-labelled DNA probe을 추가해서 65℃에서 16시간 동안 반응시켰다. washing buffer (0.1X SSC, 0.1% SDS)를 이용하여 blot을 씻어 준 다음, phosphor image analyzer를 이용하여 형질전환된 벼에 유전자 삽입여부를 확인하였다. 도입 유전자의 도입 유무를 확인하기 위하여 도입 유전자인 *ugpase*의 일부분인 700bp 유전자 단편을 probe으로 사용하였고, 도입된 유전자 수를 확인하기 위해서, MAR의 일부분인 500bp 유전자 단편을 probe으로 사용하였다. *Glb::ugp*의 경우 18개 line을 분석한 결과 2번과 17번 line을 제외한 모든 line에서 도입유전자가 도입되었음을 확인하였고 (그림 13), 다수의 1 copy 형질전환체를 얻을 수 있었다.(그림 13B). *Sbe::ugp*의 경우는 6개 line을 분석한 결과 모두 도입유전자가 도입되었음을 확인하였고 (그림 14A), 4개의 형질전환 벼가 1 copy가 도입되었고 4번 line은 2 copy가 도입되었음을 확인하였다 (그림 14B). *Rbc::ugp*의 경우는 2개 line의 genomic Southern blot 결과 모두 도입 유전자가 도입되었고 각각의 line은 모두 단일 유전자가 도입되었음을 확인하였다. (그림 15).

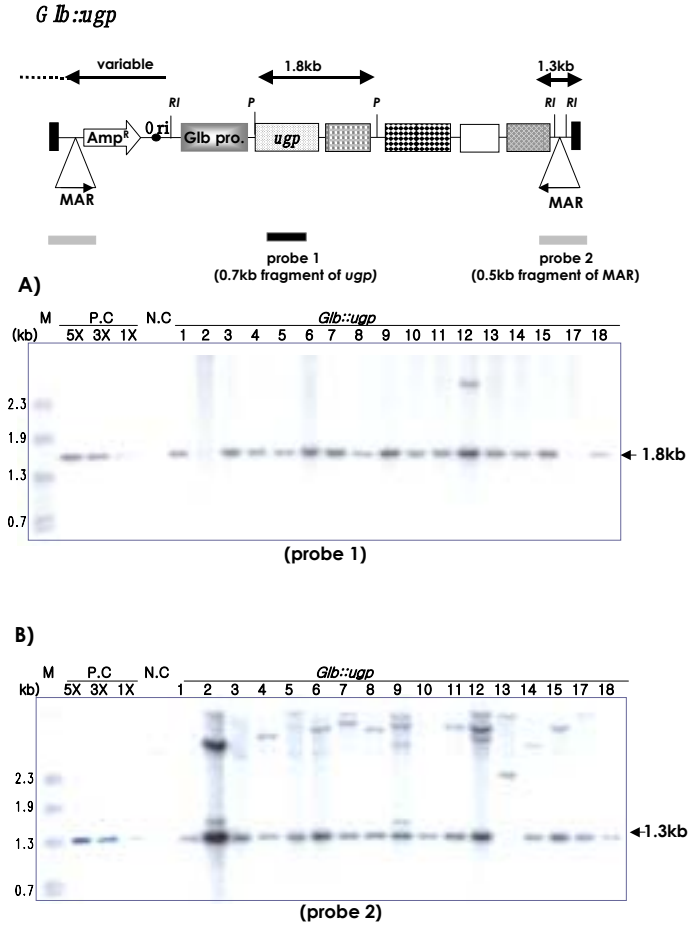


그림 13. Expression vector used for rice transformation and genomic DNA blot analysis of *Glb::ugp*-transformed rice plant.

A) 5mg Genomic DNA form the leaf tissues of transformed plants were digested with *PstI* and hybridized with a 0.7-kb DNA fragment containing *ugp* sequence. PC contained *Pst*I-digested of *Glb::ugp* rice transformation vector (1, 3, and 5 in PC represent 1, 3, and 5 genomic equivalents of *Glb::ugp* relative to 5mg of rice genomic DNA). B) 5mg genomic DNA from leaf tissue was digested with *EcoRI* and hybridized with a 0.5kb DNA fragment containing 5 region of MAR sequence. PC contained *Eco*RI-digested of *Glb::ugp* rice transformation vector ; NC, genome untransformed control plant. The DNA molecular size markers (M) are indicated.

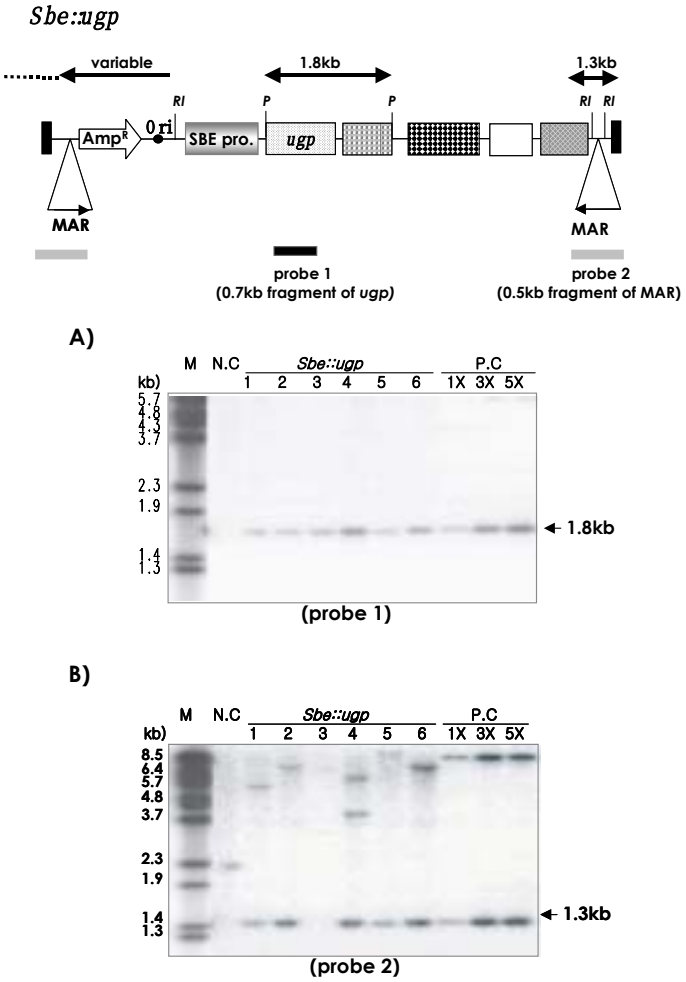


그림 14. Expression vector used for rice transformation and genomic DNA blot analysis of *Sbe::ugp*-transformed rice plant.

A) 5mg Genomic DNA form the leaf tissues of transformed plants were digested with *PstI* and hybridized with a 0.7-kb DNA fragment containing *ugp* sequence. PC contained *Pst*I-digested of *Sbe::ugp* rice transformation vector (1, 3, and 5 in PC represent 1, 3, and 5 genomic equivalents of *Sbe::ugp* relative to 5mg of rice genomic DNA). B) 5mg genomic DNA from leaf tissue was digested with *EcoRI* and hybridized with a 0.5kb DNA fragment containing 5 region of MAR sequence. PC contained *Eco*RI-digested of *Sbe::ugp* rice transformation vector ; NC, genome untransformed control plant. The DNA molecular size markers (M) are indicated.

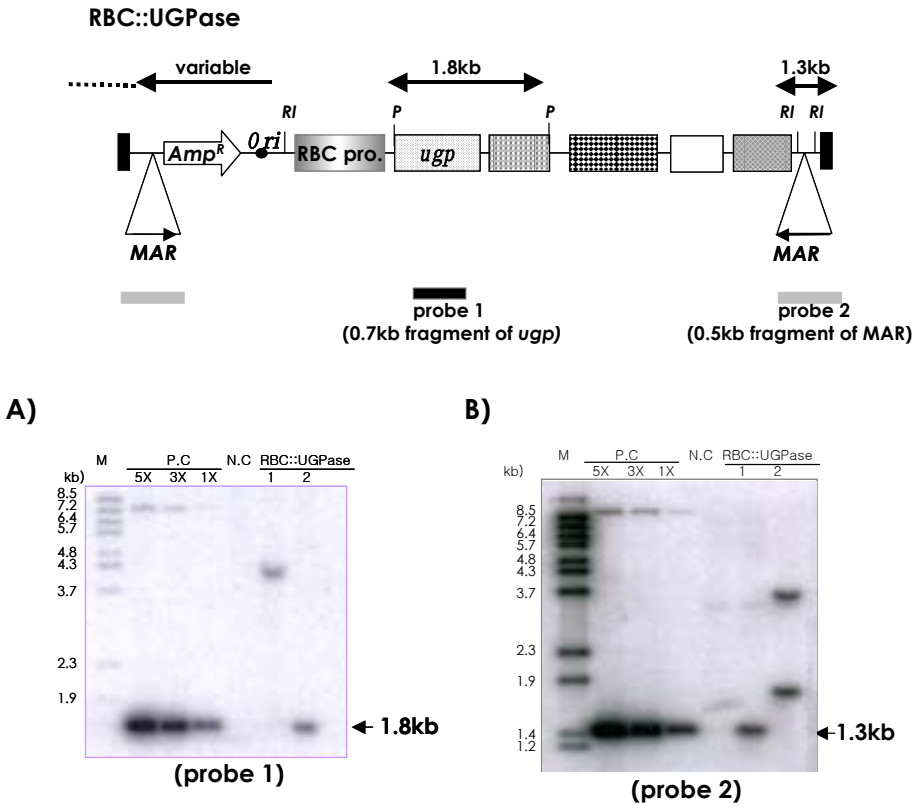


그림 15. Expression vector used for rice transformation and genomic DNA blot analysis of *Rbc::ugp*-transformed rice plant.

A) 5mg Genomic DNA form the leaf tissues of transformed plants were digested with *PstI* and hybridized with a 0.7-kb DNA fragment containing *ugp* sequence. PC contained *Pst*I-digested of *Rbc::ugp* rice transformation vector (1, 3, and 5 in PC represent 1, 3, and 5 genomic equivalents of *Rbc::ugp* relative to 5mg of rice genomic DNA). B) 5mg genomic DNA from leaf tissue was digested with *EcoRI* and hybridized with a 0.5kb DNA fragment containing 5 region of MAR sequence. PC contained *Eco*RI-digested of *Rbc::ugp* rice transformation vector ; NC, genome untransformed control plant. The DNA molecular size markers (M) are indicated.

나) 형질전환 벼 식물체 내 도입 유전자 발현 분석

형질전환 벼 내에 도입 유전자의 발현을 알아보기 위해 Northern blot 실험을 실시하였다. 형질전환 벼와 비형질전환 벼의 어린 잎 2g을 액체 질소로 얼린 다음, 막자사발을 이용하여 마쇄시킨 후, 2㎖의 RNA extraction buffer (4M guanidinium isothiocynate, 25mM sodium citrate, 0.5% sarkosyl)를 넣고 잘 섞어 줬다. 2M sodium actate (pH 4.0) 0.2㎖, 2㎖ water-saturated phenol, 그리고 1㎖의 chroloform을 순서대로 넣어주고 각각 첨가 할 때 마다 잘 섞어 준 다음, 5000g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취했다. 동량의 isopropanol을 넣어서 잘 섞어 주고 -20℃에서 1시간 이상 방치한 다음, 4℃에서 10000g로 10분간 원심분리한 후에 침전물을 500㎕의 DEPC 처리수에 녹였다. 동량의 4M LiCl을 첨가하고 4℃에서 1시간 이상 방치한 다음, 14000g에서 10분간 원심분리하여 침전물을 취했다. 침전물을 70% cold ethyl alcohol로 씻은 다음 건조 시켜서 50㎕ DEPC 처리수에 녹였다. 잎의 total RNA 10㎍을 iodoacetamide (0.28g/300㎖)가 들어 있는 agarose gel에 전기영동 한 다음 capillary transfer method를 이용하여 Southern blot 실험과 동일한 방법으로 blot을 만들었고, Southern blot에서 사용한 동일한 0.7 kb *ugpase* 유전자 단편을 사용하여 probe을 제작하였다. 대조구로써 0.9kb *rbcS* 유전자를 probe으로 사용하여 형질전환 벼 식물체 내에 도입유전자의 전사 단계에서의 발현 수준을 알아보았고 그 결과는 그림 16과 같다. Sink 기관 특이적 발현을 위해 사용한 SBE promoter와 globuline promoter의 경우 *Sbe::ugp* 형질전환벼에서는 잎 조직에서 낮은 수준에서의 UGPase가 발현되고 있음을 확인하였지만, *Glb::ugp* 형질전환 벼에서는 발현이 없음을 확인하였다. 이 두 형질전환체는 Sink기관에서의 발현 관찰이 필요하다. 반면 Souce 기관에서 발현시킨 *rbc::ugp* 형질 전환 벼에서는 2번 line의 형질전환체에서 높은 ugpase의 발현을 확인하였다.

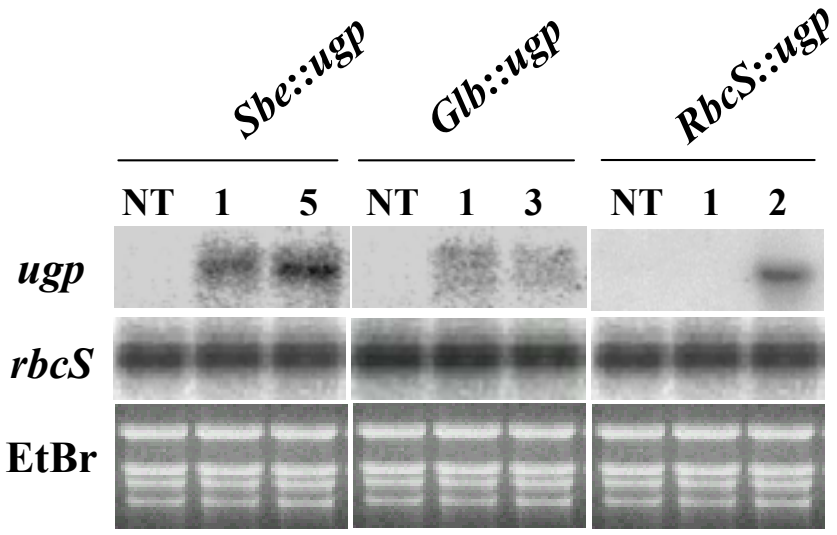


그림 16) transcript levels of E.coli ugpase in the leaves of the *Glb::ugp, Sbe::ugp* and *Rbc::ugp transgenic* plants and untransformed plant (NT).
10ug total RNA of the leaf tissues of transgenic plants and untransformed plant were hybridized with a 0.7Kb *ugpase* gene coding region(ugp). Equal loading of tatal RNA samples was verified by reprobing the membrane were the rice rbcS gene of Rubisco.

제 2 절 DNA 칩을 이용한 생산성(grain yield) 관련 변이유전자 규명 및 분리

1) 60K Rice Oligonucleotide Microarray의 유용성 검증

본 연구에서 사용할 microarray의 유용성을 검증하기 위하여 동일한 mRNA를 주형으로 사용하여 각각 다른 형광물질로 표지된 CyScript post-labelling kit를 사용하여 제조사의 방법을 사용하여 합성하였고 (Amersham biosciences, USA) 60,000개의 rice oligo DNA가 찍힌 60K Rice Oligonucleotide microarray에 혼성화 시킨 뒤 각 spot의 형광량을 측정하여 균등성의 정도를 결정하였다.

본 연구에서 사용한 cDNA probe의 제작 방법은 두 단계로 진행된다. 우선, 형광물질이 붙을 수 있는 amino allyl-dUTP를 첨가하여 cDNA를 합성하고 그 다음으로 amino-allyl기를 가지고 있는 이 cDNA를 각기 다른 CyDye NHS-ester로 표지하고 난 후 정제하여 microarray 슬라이드와 hybridization하는 것이다.

가) Amino-allyl dUTP를 함유한 cDNA의 합성

정제된 mRNA 1ug씩을 각각의 다른 두 microtube에 담고, 각각 3ul의 Anchored oligo(dT)와 섞어준 후 증류수를 첨가하여 11ul의 용량으로 맞춰주고 조심스럽게 잘 섞어준다. 이 후 70℃에서 5분간 방치하고 상온에서 10분간 방치하여 mRNA와 primer가 붙을 수 있게 한다. tube를 얼음에 방치한 상태로 이 용액에 각각 5XCyScript buffer(pH 8.3) 4ul, 0.1M DTT(Dithiothreitol) 2ul, Nucleotide mix 1ul, amino allyl-dUTP 1ul 그리고 CyScript reverse transcriptase (100U/ul) 1ul를 넣어준 후 조심스럽게 피펫으로 섞어준 다음 42℃에서 1.5시간 방치한 후 즉시 얼음에 보관한다.

나) Amino-allyl dUTP가 함유된 cDNA의 정제

cDNA를 합성한 후 반응액으로부터 mRNA를 제거하기 위하여 우선, 각각의 용액에 2.5M NaOH 2ul를 넣은 후 37℃에서 15분간 방치하고 2M HEPES 10ul를 넣어 cDNA 중합반응을 중지시킨다. 이 용액에 CyScribe GFX kit에 들어 있는 capture buffer를 500ul씩 넣은 후 GFX column에 각각 분주하고 잘 섞어준다. 이 column을 13,800g에서 30초간 원심분리하여 용액을 통과시킨 후 버린다. 용액이 통과된 GFX

column에 600ul의 wash buffer를 가한 후 13,800g에서 30초간 원심분리하여 2회 씻어 낸다. 이 column에 60ul의 elution buffer를 가하고 5분간 상온에서 방치한 후 13,800g 에서 원심분리하여 합성된 순수한 cDNA를 분리해 낸다.

다) Amino-allyl dUTP가 함유된 cDNA를 CyDye와 반응

각각 분리된 amino-allyl기가 붙어 있는 cDNA용액을 speed vac.을 이용하여 완전히 건조시킨 후 여기에 nuclease가 제거된 증류수 15ul를 가하여 cDNA를 녹인다. CyScript post-labelling kit에 포함되어 있는 CyDye3와 CyDye5를 한 vial씩 꺼내어 각각 15ul의 0.1M Sodium Bicarbonate(pH9.0)을 가하여 녹인다. 용해된 CyDye3용액과 CyDye5 용액을 amino-allyl modified cDNA에 각각 첨가하여 암실의 상온에 1시간 방치한다. 여기에 각각 15ul의 4M Hydroxylamine을 첨가한 뒤 다시 암실의 상온에서 15분간 방치한다. 이 용액을 다시 CyScribe GFX purification kit를 이용하여 정제한다.

라) Hybridization

제작된 probe cDNA 용액을 speed vac.을 이용하여 완전 건조시키고 nuclease가 제거된 증류수 22.5ul에 녹인다. 이 용액을 2분간 95℃에서 가열하여 변성시킨 후 7.5ul의 microarray hybridization buffer와 잘 섞어준다.

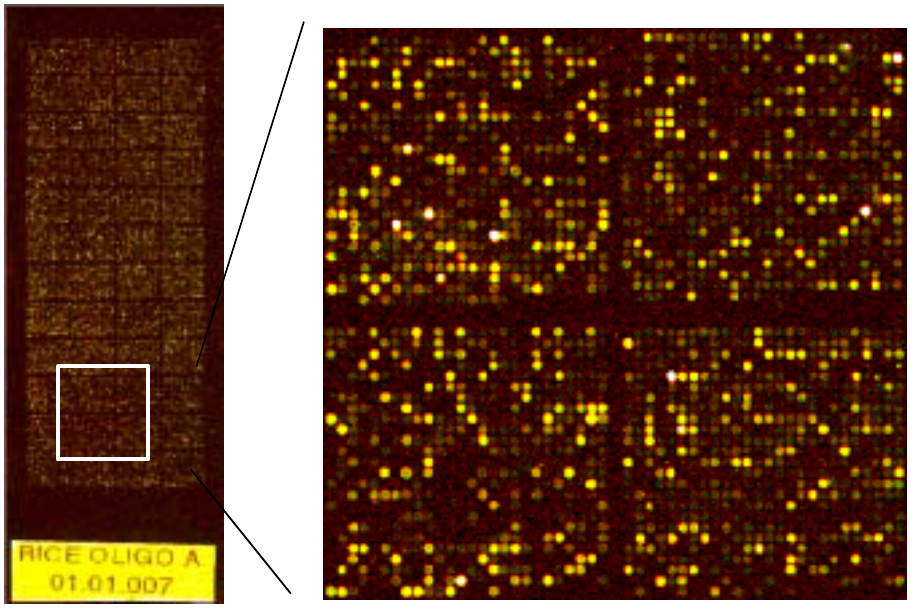
이 용액을 슬라이드 위의 microarray에 분주한 후 커버 글라스를 덮어 골고루 펴 주고 hybridization chamber에 넣어 42℃ water bath에서 16시간 동안 방치한다.

마) chip 슬라이드의 세척 및 sanning

Hybridization이 끝나고 난 후, 55℃의 1XSSC, 0.2%(w/v) SDS 용액 40ml로 Falcon tube에서 10분간 흔들면서 씻어주고, 다시 55℃의 0.1XSSC, 0.2%(w/v) SDS 용액 40ml로 Falcon tube에서 2회 10분간 흔들어서 씻어준 후, 상온의 0.1XSSC 용액 40ml로 Falcon tube에서 1분간 2회 흔들어서 씻어준다.

세척된 슬라이드를 즉시 500g에서 5분간 원심분리하여 건조시키고 Axon(Axon, USA) scanner로 scanning 하였고 그 결과는 그림 17과 같다. 그림 17 A)에서 처럼 slide 전체 spot이 편중됨이 없이 고르게 hybidization 되었음을 확인하였고 이결과를 통해 spotting 상태가 양호하며 hybidization 이 고르게 일어났음을 확인할 수 있었으며 그림 17 B)의 결과에서도 Cydye3와 Cydye5의 비가 y=ax에 수렴됨을 볼 수 있었

A)



B)

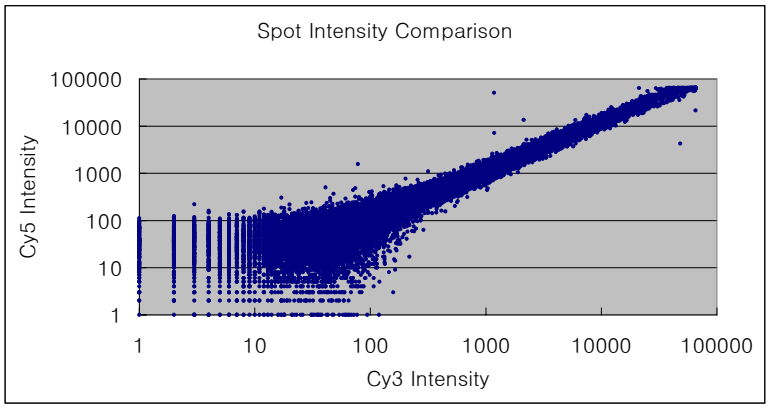


그림 17) Scanning image of 60K rice oligo chip and comparison of spot intensity A) results of hybiridization with 60K rice oligo chip probed by CyDye3 and CyDye5 labeled rice leaf mRNA B) comparison of spot intensity.

다. 하지만 발현이 낮아 intensity가 200 미만인 spot에서는 많은 오차가 남을 확인하였고 chip 분석시 이러한 data는 배제하는 것이 좋다는 결론을 얻었으며 이는 cDNA chip의 결과와 다른 그룹에서의 결과와 일치하였다.

2) rice oligonucleotide 60K chip을 이용한 Rbc::ugp 형질전환 벼에서의 유전자 발현 분석

벼를 대상으로 Sink-Source 상호작용 기작을 규명하기 위하여 E.coli UGPase의 유전자를 도입하여 제작한 형질전환 벼에서의 ugpase 발현에 따른 벼 내에서의 유전자 발현의 변화를 관찰 위하여 60K oligo chip을 이용하여 식물체 전체의 유전자 변이를 관찰하였고 실험 방법은 다음과 같다.

가) cDNA labeling

낙동벼와 형질전환벼에서 분리 정제한 mRNA 1ug씩을 각각의 다른 두 microtube에 담고, 앞서 기술한 CyScript post-labelling kit(Amersham biosciences, USA) 방법을 이용하여 낙동벼에는 Cy3dye를 형질전환벼에는 Cy5dye를 labeling하여 chip 분석에 사용할 cDNA probe을 제작하였다.

나) Hybridization, chip 슬라이드의 세척 및 sanning

제작된 2종의 probe cDNA 용액을 speed vac.을 이용하여 완전 건조시키고 nuclease가 제거된 증류수 22.5ul에 녹인다. 이 용액을 2분간 95℃에서 가열하여 변성시킨 후 7.5ul의 microarray hybridization buffer와 잘 섞어준다.

이 용액을 슬라이드 위의 microarray에 분주한 후 커버 글라스를 덮어 골고루 펴 주고 hybridization chamber에 넣어 42℃ water bath에서 16시간 동안 방치한다.

Hybridization이 끝나고 앞서 기술한 방법과 동일한 방법으로 세척한 후, 세척된 슬라이드를 즉시 500g에서 5분간 원심분리하여 건조시키고 Axon(Axon, USA) scanner로 scanning 하였고 그 결과는 그림 18과 같다. 그림 18에서 처럼 slide 전체 spot이 편중됨이 없이 고르게 hybidization 되었음을 확인하였다.

다) data 분석

Scanning 하여 얻은 Cy3, Cy5의 intensity data를 Intensity 200 미만의 값을 제거하고 남은 값을 lcDNA(Tseng et al., 2001) 프로그램을 이용하여 Rowess Regression

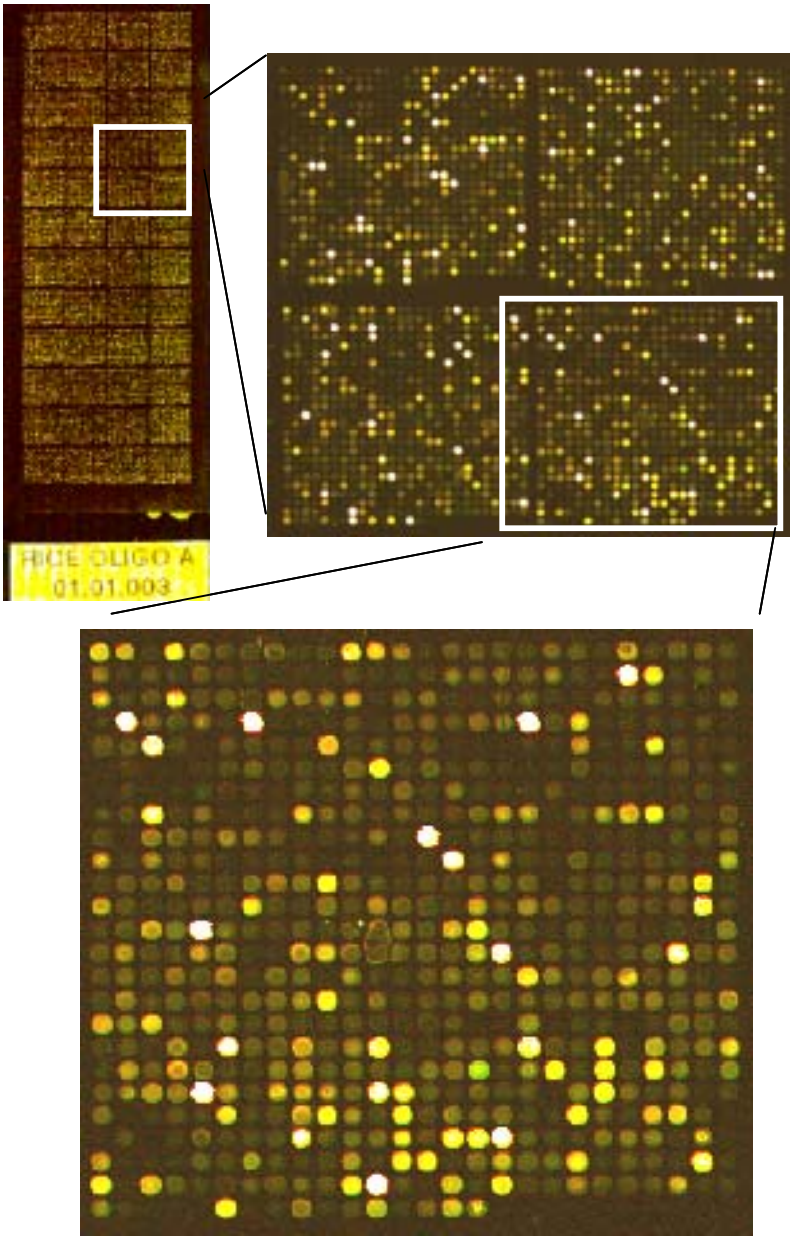


그림 18) Scanning image of the 60K oligo chip probed by untransformed rice and transgenic plants (rbc::ugp).

표 3) Result of comparison of transcript levels between untransformed rice andtransgenic plants (rbc::ugp) with rice 60K oligo nucleotide chip

2 fold increase

NT (Cy3)	UGPase(Cy5)	Serial#	Norm. Log	Slide&SpotID	
16063	33292	22101	0.34	B09011901	chlorophyll a/b-binding protein presursor [Oryza sativa]
10107	36668	8634	0.583	B04012102	glycine rich RNA binding protein [Oryza sativa]
1853	4336	5879	0.399	B03011903	metallothionein-like protein [Oryza sativa]
12789	29054	3179	0.38	B02011907	photosystem II protein D2
3347	6882	2759	0.336	B02010303	putative cytochrome p450tyr [Oryza sativa]
21839	43835	8249	0.326	B04010607	Putative DNAJ protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
34413	65217	1873	0.301	B01032101	putative lipid transfer protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
8213	17006	5646	0.339	B03011004	putative short chain alcohol dehydrogenase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1794	4118	1142	0.392	B01021824	Rad6 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] >gi|28269456|gb|AAO37999.1| ubiquitin
16361	32942	13963	0.327	B06011801	ribulosebisphosphate carboxylase large subunit
15783	36206	2556	0.384	B01042108	zinc finger protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
319	609	25572	0.312	A10022214	N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase-like protein~contains EST AU096989(S0310) [Oryza
1341	3172	446	0.328	A01011804	protein phosphatase 2C-like [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
167	512	9132	0.539	A04021406	putative AAA-type ATPase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
2160	11569	5751	0.645	A03011405	putative Bowman Birk trypsin inhibitor [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
531	1136	306	0.333	A01011220	putative hexose carrier protein [Oryza sativa] >gi|18873833|gb|AAL79779.1|AC079874_2
7712	21056	27487	0.306	A11011805	Similar to glycogenin glucosyltransferase (EC 2.4.1.186). (Z97341) [Oryza sativa (japonica

2 fold decrease

NT (Cy3)	UGPase(Cy	Serial#	Norm.Log Ratio	Slide&SpotID	
1076	467	23863	-0.355	A09040821	alanine aminotransferase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
684	320	2230	-0.301	A01040820	beta-ureidopropionase [Arabidopsis thaliana]
2956	1461	13115	-0.353	A05041111	contains eukaryotic protein kinase domain PF|00069 [Oryza sativa
763	202	23673	-0.54	A09040113	cytochrome c biogenesis protein [Oryza sativa (japonica cultivar-
27809	18957	7639	-0.326	A03040821	cytochrome P450-like protein [Sorghum bicolor]
1823	957	24013	-0.304	A09041415	cytosolic monodehydroascorbate reductase [Oryza sativa (japonica
702	188	1118	-0.531	A01021726	endo-1,4-beta-glucanase [Triticum aestivum]
18362	10328	26407	-0.384	A10040217	glycine rich protein [Oryza sativa]
26636	14648	26455	-0.411	A10040413	H1 gene [Arabidopsis thaliana]
6866	4174	24029	-0.303	A09041505	MADS15 protein [Oryza sativa]
26090	12537	23854	-0.466	A09040812	MYB27 protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
11871	6170	15993	-0.395	A06041803	osmotin protein homolog - rice (fragment)
530	236	16917	-0.309	A07020117	PDR5-like ABC transporter [Spirodela polyrhiza]
2608	1290	29131	-0.346	A11040311	putative aldehyde oxidase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
538	173	13273	-0.443	A05041713	putative ARF GAP-like zinc finger-containing protein ZiGA4 [Oryza
14088	9381	7506	-0.302	A03040318	putative auxin response transcription factor [Oryza sativa
4473	2076	26657	-0.394	A10041207	putative beta-glycosidase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
910	250	23425	-0.533	A09031725	putative diacylglycerol kinase [Oryza sativa (japonica cultivar-
17900	8533	26616	-0.45	A10041018	Putative Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor [Oryza sativa
25738	13643	29415	-0.425	A11041409	putative glutamine synthetase [Oryza sativa]
643	196	18270	-0.473	A07040118	putative IkappaB kinase complex-associated protein [Oryza sativa
5162	3045	10421	-0.302	A04041121	putative protein serine/threonine kinase [Oryza sativa (japonica
12063	4041	32343	-0.575	A12042225	Putative retroelement [Oryza sativa]
12757	8351	5160	-0.304	A02041712	putative ribosomal protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
14221	8484	23577	-0.347	A09032321	putative rice bicoid protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
9469	6016	15861	-0.301	A06041301	putative splicing factor [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]

14726	9125	24141	-0.333	A09041913	putative subtilase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
6560	3761	15590	-0.325	A06040216	putative threonine synthase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
6391	3778	29437	-0.311	A11041505	putative transcription factor [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1272	429	1354	-0.39	B01030102	disease resistance protein-like [Oryza sativa (japonica cultivar-
769	236	21441	-0.409	B08041917	heat stress transcription factor Spl7 [Oryza sativa (japonica cultivar-
3017	1057	21779	-0.408	B09010617	mago nashi-like protein [Oryza sativa]
4626	1889	1176	-0.361	B01022006	NBS-LRR-like protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1178	263	1712	-0.558	B01031422	OJ1127_E01.15 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1937	606	32146	-0.437	B12041510	polyprotein [Oryza sativa subsp. indica]
4224	1555	242	-0.4	B01011008	polyprotein [Oryza sativa subsp. indica]
2242	757	477	-0.411	B01011909	Proteasome subunit alpha type 2 (20S proteasome alpha subunit B)
3250	1362	29145	-0.336	B11040325	Putative 26S proteasome regulatory subunit S5A [Oryza sativa]
13115	2027	2061	-0.788	B01040207	putative calmodulin-binding heat-shock protein [Oryza sativa]
2744	1161	13288	-0.326	B05041802	Putative copia-type pol polyprotein [Oryza sativa]
7584	3377	1406	-0.328	B01030302	putative cytochrome P450 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
701	242	2521	-0.357	B01041925	putative FK506-binding protein [Oryza sativa]
1588	430	21343	-0.489	B08041523	putative gag-pol polyprotein [Oryza sativa]
863	330	30115	-0.322	B12011507	putative GAG-POL precursor [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
8136	3583	2308	-0.333	B01041120	putative gag-pol precursor [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
65373	22673	1828	-0.437	B01031908	putative glutathione S-transferase OsGSTU2 [Oryza sativa subsp.
1183	354	32290	-0.436	B12042024	putative mucin [Oryza sativa]
2285	916	12931	-0.341	B05040409	Putative mutator-like transposase [Oryza sativa (japonica cultivar-
14741	3121	2129	-0.651	B01040423	putative mutator-like transposase [Oryza sativa (japonica cultivar-
10422	1479	2165	-0.825	B01040607	putative NBS-LRR type resistance protein [Oryza sativa (japonica
12013	5601	1889	-0.308	B01032117	putative nitrate transporter [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1531	571	10	-0.355	B01010110	putative polyprotein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
4521	1768	2374	-0.378	B01041408	putative polyprotein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]

831	129	2238	-0.691	B01040902	putative polyprotein [Oryza sativa]
4569	473	2207	-0.93	B01040723	Putative retroelement [Oryza sativa]
22602	10328	1796	-0.317	B01031802	Putative retroelement [Oryza sativa]
684	135	2191	-0.582	B01040707	putative retrotransposon-related protein [Oryza sativa]
7714	1602	2558	-0.659	B01042110	putative RNA binding protein [Oryza sativa]
956	371	687	-0.32	B01020111	putative valyl tRNA synthetase [Oryza sativa (japonica cultivar-
1401	562	2592	-0.322	B01042218	receptor protein kinase -like [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
3761	1524	20513	-0.356	B08030925	Ser/Thr protein kinase-like protein [Oryza sativa (japonica cultivar-
5717	886	2039	-0.771	B01040111	Similar to Antirrhinum majus transposon Tam3 gene;

표 4) Results of COGs assay from comparison of trascription levels between ugpase transformed rice and untransformed rice

INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Incress	Decress
[J] Translation, ribosomal structure and biogenesis	2	8
[A] RNA processing and modification	0	6
[K] Transcription	1	4
[L] Replication, recombination and repair	1	2
[B] Chromatin structure and dynamics	0	0
	4	20
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING		
[D] Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	0	2
[Y] Nuclear structure	0	1
[V] Defense mechanisms	0	0
[T] Signal transduction mechanisms	3	4
[M] Cell wall/membrane/envelope biogenesis	0	2
[N] Cell motility	0	0
[Z] Cytoskeleton	0	0
[W] Extracellular structures	0	0
[U] Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	1	7
[O] Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2	9
	6	25
METABOLISM		
[C] Energy production and conversion	4	0
[G] Carbohydrate transport and metabolism	1	3
[E] Amino acid transport and metabolism	1	6
[F] Nucleotide transport and metabolism	0	0
[H] Coenzyme transport and metabolism	0	1
[I] Lipid transport and metabolism	1	4
[P] Inorganic ion transport and metabolism	1	2
[Q] Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	5	8
	13	24
POORLY CHARACTERIZED		
[R] General function prediction only	4	13
[S] Function unknown	1	3
[X] Unnamed protein	1	7
	6	23

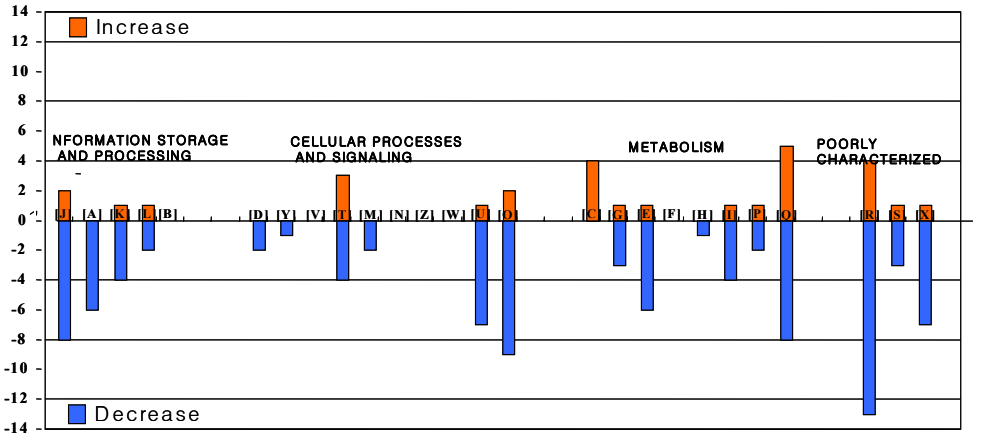


표 5) list of clone from COGs assay from comparison of trascription levels between ugpase transformed rice and untransformed rice

2 fold increase

INFORMATION STORAGE AND PROCESSING
Mitochondrial ribosomal protein S28 Translation initiation factor 1 (eIF-1/SUI1) Transcriptional regulator Predicted 3'-5' exonuclease
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
Ubiquitin-protein ligase FOG: Predicted E3 ubiquitin ligase Serine/threonine protein phosphatase Tyrosine kinase specific for activated (GTP-bound) p21cdc42Hs Serine/threonine protein kinase
METABOLISM
A Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, large subunit A Chlorophyll A/B binding protein A Photosystem II protein D1/D2 Predicted mitochondrial carrier protein Prephenate dehydratase 5'-phosphoribosylglycinamide formyltransferase Malonyl-CoA:ACP transacylase Mn2+ and Fe2+ transporters of the NRAMP family Multidrug/pheromone exporter, ABC superfamily Multidrug/pheromone exporter, ABC superfamily Copper amine oxidase A Chalcone synthase Transporter, ABC superfamily (Breast cancer resistance protein)
POORLY CHARACTERIZED
A Predicted membrane protein FOG: PPR repeat Protein tyrosine phosphatase-like protein PTPLA (contains Pro instead of catalytic Arg)

2 fold decrease

INFORMATION STORAGE AND PROCESSING
RNA-directed RNA polymerase QDE-1 required for posttranscriptional gene silencing and RNA interference
Splicing factor 3b, subunit 3
Nonsense-mediated mRNA decay 2 protein
Exon-exon junction complex, Magoh component
Predicted snRNP core protein
Component of the U4/U6.U5 snRNP/mitosis protein DIM1
Translation initiation factor 2, alpha subunit (eIF-2alpha)
tRNA cytosine-5-methylases and related enzymes of the NOL1/NOP2/sun superfamily
Translation initiation factor 6 (eIF-6)
Diphthine synthase
60s ribosomal protein L15
Valyl-tRNA synthetase
Mitochondrial ribosomal protein MRP7 (L2)
60s ribosomal protein L34
Transcription factor MEIS1 and related HOX domain proteins
Thyroid hormone receptor-associated coactivator complex component (TRAP170)
A Ovule development protein/AP2 domain transcription factor
Mitochondrial transcription termination factor, mTERF
DNA repair protein, SNF2 family
Predicted 3'-5' exonuclease
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
Cdc2-related protein kinase A DAG protein involved in chloroplast differentiation/palisade development and related proteins
Extracellular protein SEL-1 and related proteins
20S proteasome, regulatory subunit alpha type PSMA3/PRE10
Mitochondrial chaperonin, Cpn60/Hsp60p
Serine protease
Glutathione S-transferase
20S proteasome, regulatory subunit alpha type PSMA2/PRE8
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
A Subtilisin-like proteinase
A Subtilisin-like proteinase

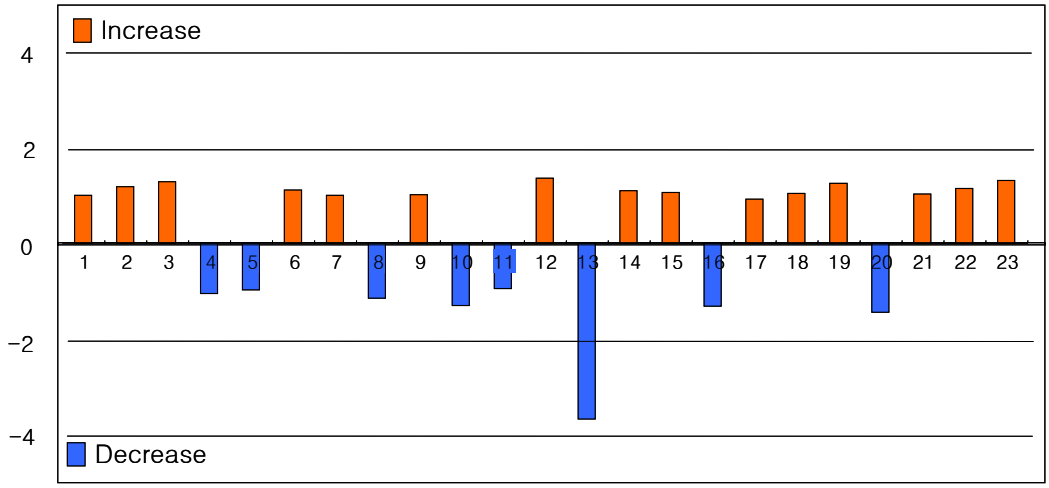
Serine/threonine protein kinase
A Auxin-inducible protein
Signal recognition particle, subunit Srp54
Signal recognition particle, subunit Srp54
Endosomal membrane proteins, EMP70
Endosomal membrane proteins, EMP70
Amphiphysin
Predicted small molecule transporter
Nuclear pore complex, p54 component (sc Nup57)
METABOLISM
A Threonine synthase
Glycine cleavage system H protein (lipoate-binding)
Isocitrate dehydrogenase, alpha subunit
Carbon-nitrogen hydrolase
Alanine aminotransferase
N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase
Trehalose-6-phosphate synthase component TPS1 and related subunits
Glycosyl transferase, family 8 - glycogenin
A Glycosyl hydrolase (endo-1, 4-beta-glucanase)
A Predicted phytochelatin synthetase
START domain-containing proteins involved in steroidogenesis/phosphatidylcholine transfer
N-myristoyl transferase
Diacylglycerol kinase
Na+-independent Cl/HCO3 exchanger AE1 and related transporters
Divalent cation tolerance-related protein
Pleiotropic drug resistance proteins (PDR1-15), ABC superfamily
Pleiotropic drug resistance proteins (PDR1-15), ABC superfamily
Cytochrome P450 CYP2 subfamily
Cytochrome P450 CYP2 subfamily
Cytochrome P450
Flavin-containing monooxygenase
Cytochrome P450 CYP2 subfamily
Cytochrome P450 CYP4/CYP19/CYP26 subfamilies

POORLY CHARACTERIZED
WD40 repeat-containing protein
A Predicted methyltransferase
FOG: TPR repeat
P-type ATPase
Monodehydroascorbate/ferredoxin reductase
Predicted metal-binding protein
FOG: Transposon-encoded proteins with TYA, reverse transcriptase,
A Predicted methyltransferase

soluble acid invertase 방법으로 Normalization 낙동벼와 형질전환벼 간의 유전자 증감의 비를 통해 2배 이상 증가했거나 감소한 spot을 선정하였다. 낙동벼에 비해 형질전환벼에서 2배 이상 유전자 발현이 증가한 유전자의 수는 총 406 가지 였으며, 감소한 유전자의 수는 1184 종이었고, 유전자의 발현이 증가하거나 감소한 유전자 중 그 기능을 밝혀진 것들은 표 3과 같다. 증가한 유전자들의 정보를 COGs 분석 (Clusters of Orthologous Groups of proteins)을 통해 각각의 유전자를 그 기능에 따라 분류하였고 그 결과는 표 4, 표 5과 같다. 분류 결과 증가한 406 종 중 29 종의 유전자의 기능을 확인하였다. 동일한 방법으로 감소한 유전자들을 기능에 따란 분류한 결과 92종의 유전자가 발현이 감소하였다. 발현이 증가한 유전자는 6종의 신호 전달 유전자들과 13종의 대사 관련 유전자들이 있었다. 한편, ugpase의 발현에 따른 벼 내의 sink-source 관련 유전자의 변화 알아보기 위하여 60K chip 내에 존재하는 관련 유전자 23 종을 대상으로 유전자 발현 양상을 비교하여 보았고 그 결과는 표 6 같다. 표 6을 보면 총 23 종의 관련 유전자들 중에 soluble acid invertase 만이 2배 이상의 감소를 보였으며 나머지 유전자들은 2배 이하의 변화를 보였다. 비록, ugpase 발현 증가로 일부의 유전자들의 발현이 증가 혹은 감소하였으나 그 변화에 의한 sink-source 관련 기작에는 많은 영향을 주지 못하였음을 확인하였다.

표 6) Comparison of sink-source related gene expression between untransformed rice and transgenic plants (rbc::ugp) with rice 60K microarray.

	gene name	Slide&SpotID	NT (Cy3)	UGP(Cy5)	Norm.Log Ratio	Fold Induction
1	Fructose-bisphosphate aldolase	B10032103	5323	5520	0.039	1.09
2	phosphoglucomutase	B03021824	840	913	0.112	1.29
3	ADP-glucose pyrophosphorylase	A08011313	931	1366	0.151	1.42
4	sucrose-phosphate synthase	A05041710	7897	8650	-0.069	-1.17
5	Sucrose synthase 1	A11031624	569	501	-0.033	-1.08
6	sucrose-phosphate synthase	A11012424	3722	5396	0.083	1.21
7	sucrose synthase	A08020321	306	299	0.041	1.10
8	putative soluble starch synthase IV-1	A07011701	427	303	-0.107	-1.28
9	sucrose transporter	A05041102	1866	2298	0.044	1.11
10	invertase	B10011908	223	98	-0.159	-1.44
11	apoplastic invertase	A09012107	13504	17583	-0.025	-1.06
12	apoplastic invertase	A03021308	336	460	0.174	1.49
13	soluble acid invertase	A09012224	368	75	-0.61	-4.07
14	vacuolar acid invertase	A08011026	526	600	0.077	1.19
15	soluble starch synthase II-2	A03041117	2848	3845	0.067	1.17
16	apoplastic invertase	A07012107	58886	64919	-0.166	-1.47
17	Putative starch synthase	B12012015	220	148	0.004	1.01
18	putative soluble starch synthase IV-2	A04021205	659	729	0.053	1.13
19	starch branching enzyme rbe4	B03032107	759	864	0.135	1.36
20	starch branching enzyme isoform RBE3	B05032107	225	88	-0.204	-1.60
21	isoamylase-type starch debranching enzyme IS	A09011712	3064	4004	0.05	1.12
22	starch debranching enzyme	B03042105	1173	1280	0.1	1.26
23	hexokinase	A02011104	343	452	0.157	1.44



3) rice oligonucleotide 60K chip을 이용한 다수확 품종(다산) 과 일반벼(일품) 유전자 발현 비교 분석

벼를 대상으로 Sink-Source 상호작용 기작을 규명과 생산성 관련 유전자 탐색을 위하여 일반벼 (일품)과 다수확 품종으로 개발된 다산 품종을 대상으로 하여 발현에 따른 벼 내에서의 유전자 발현의 변화를 관찰 위하여 60K oligo chip을 이용하여 식물체 전체의 유전자 변이를 관찰하였고 실험 방법은 다음과 같다.

가) cDNA labeling

일품벼와 다산벼에서 분리 정제한 mRNA 1ug씩을 각각의 다른 두 microtube에 담고, 앞서 기술한 CyScript post-labelling kit(Amersham biosciences, USA) 방법을 이용하여 일품벼에는 Cy3dye를 다산벼에는 Cy5dye를 labeling하여 chip 분석에 사용할 cDNA probe을 제작하였다.

나) Hybridization, chip 슬라이드의 세척 및 sanning

제작된 2종의 probe cDNA 용액을 speed vac.을 이용하여 완전 건조시키고 nuclease가 제거된 증류수 22.5ul에 녹인다. 이 용액을 2분간 95℃에서 가열하여 변성시킨 후 7.5ul의 microarray hybridization buffer와 잘 섞어준다.

이 용액을 슬라이드 위의 microarray에 분주한 후 커버 글라스를 덮어 골고루 펴 주고 hybridization chamber에 넣어 42℃ water bath에서 16시간 동안 방치한다. Hybridization이 끝나고 앞서 기술한 방법과 동일한 방법으로 세척한 후, 세척된 슬라이드를 즉시 500g에서 5분간 원심분리하여 건조시키고 Axon(Axon, USA) scanner로 scanning 하였고 그 결과는 그림 19과 같다. 그림 19에서 처럼 slide 전체 spot이 편중됨이 없이 고르게 hybidization 되었음을 확인하였다.

다) data 분석

Scanning 하여 얻은 Cy3, Cy5의 intensity data를 Intensity 200 미만의 값을 제거하고 남은 값을 lcDNA(Tseng et al., 2001) 프로그램을 이용하여 Rowess Regression 방법으로 Normalization하여 일품 벼와 다산벼 간의 유전자 증감의 비를 통해 2배 이상 증가했거나 감소한 spot을 선정하였고 그 결과는 표 7과 같다. 일품벼에 비해 다산벼에서 2배 이상 유전자 발현이 증가한 유전자의 수는 총 2082 종이었으며, 감소한 유전자의 수는 1184 종이었고 표 6은 증가와 감소한 유전자 중 그 기능을 알 수 있는

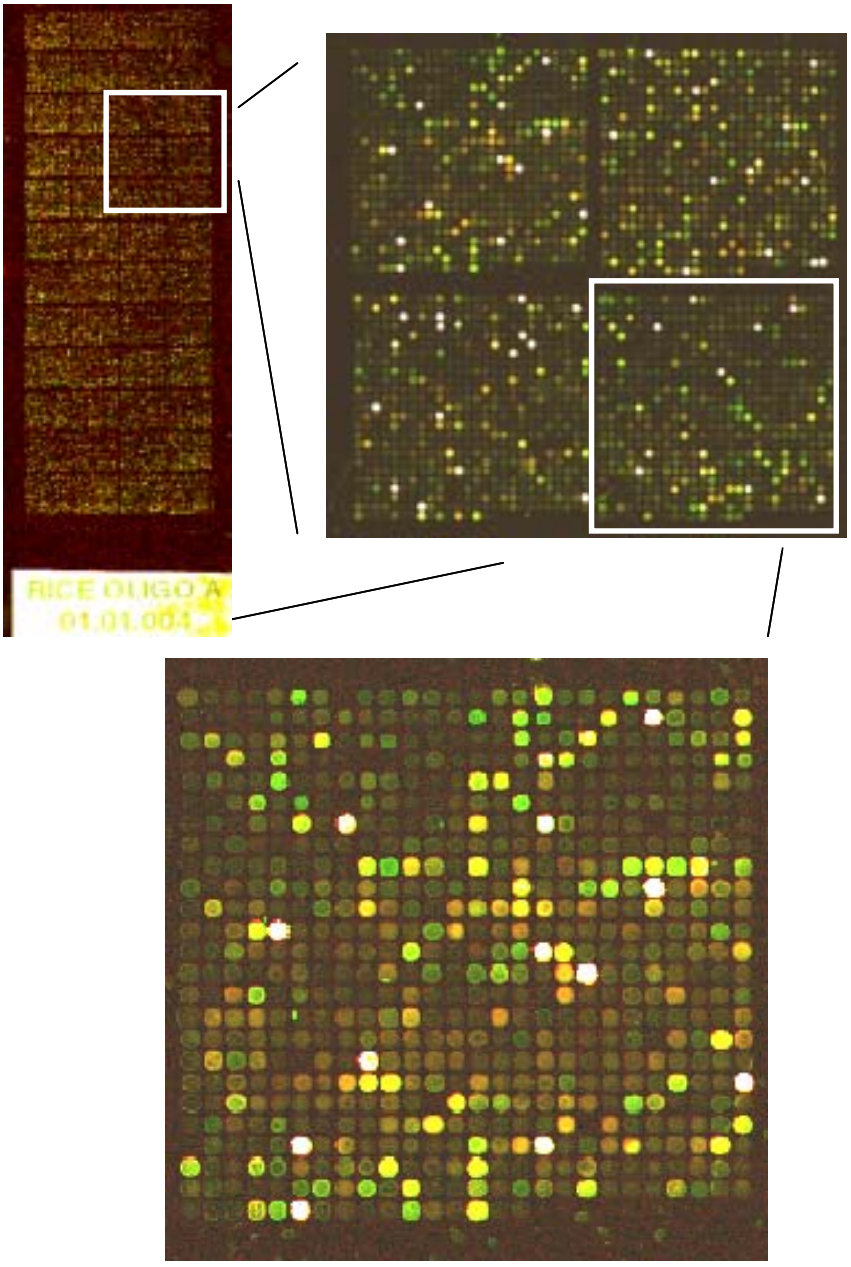


그림 19) Scanning image of the 60K oligo chip probed by ilpum rice and Dasan rice.

표 7) Results of comparison of transcript levels between Ilpom rice(normal grain yield rice) and Dasan rice(high grain yield rice) with rice 60K oligo nucleotide chip

2 fold increase

Ilpum (Cy3)	Dasa (Cy5)	Serial#	Norm.Log Ratio	Slide&SpotID	
1801	7335	24205	0.907	B09042125	40S ribosomal protein S23 [Lumbricus rubellus]
791	769	593	0.339	B01012321	biogenesis protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
1867	1830	1878	0.312	B01032106	catalase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
752	695	5544	0.319	B03010606	disease resistance response protein-like [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1762	1863	10925	0.345	B05010505	ferritin [Hordeum vulgare]
15918	30829	8634	0.533	B04012102	glycine rich RNA binding protein [Oryza sativa]
731	668	28861	0.316	B11031901	nucleotide translocator
3284	4149	12024	0.398	B05022112	P700 chlorophyll a-protein PSI-A2
9739	12767	3179	0.382	B02011907	photosystem II protein D2
3299	4112	3909	0.392	B02022109	photosystem II reaction center protein K precursor (PSII-K) [Oryza sativa]
872	825	5853	0.324	B03011803	putative gag-pol precursor [Oryza sativa]
1555	2392	6379	0.506	B03021209	Putative glucosyltransferase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1207	1204	9193	0.334	B04021615	putative glutathione transferase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
944	1218	18929	0.45	B08010101	putative lipid transfer protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1571	1631	16699	0.342	B07011907	putative nuclear RNA binding protein A [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
597	624	13998	0.379	B06011910	putative protein phosphatase [Oryza sativa]
694	665	19524	0.337	B08012324	putative receptor-like protein kinase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
563	589	31490	0.381	B12031604	putative triacylglycerol lipase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1860	1780	11358	0.302	B05012122	retroelement-like protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
5704	7848	13963	0.416	B06011801	ribulosebisphosphate carboxylase large subunit
1297	1391	3257	0.362	B02012207	S-adenosylmethionine:2-demethylmenaquinone methyltransferase-like
1304	1586	4489	0.43	A02031717	60S RIBOSOMAL PROTEIN L24 >gi|7440778|pir||T06178 ribosomal protein
26243	29597	5879	0.362	A03011903	AP2 domain -like protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
3736	3810	5671	0.355	A03011103	B1088C09.18 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] >gi|20160633|dbj|BAB89578.1|

3271	3241	31939	0.343	A12040711	B1139B11.20 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
3575	3267	883	0.308	A01020825	beta-carotene hydroxylase [Arabidopsis thaliana]
10810	10632	21778	0.323	A09010616	chloroplast import-associated channel protein homolog [Oryza sativa (japonica cultivar-
4097	4777	3494	0.412	A02020510	cysteine synthase [Oryza sativa (indica cultivar-group)]
4883	10180	6305	0.658	A03020913	expressed protein; protein id: At1g10030.1, supported by cDNA: 145854. [Arabidopsis
408	623	26084	0.527	A10031606	expressed protein; protein id: At3g15000.1, supported by cDNA: gi_16226542 [Arabidopsis
1843	2302	30274	0.444	A12012110	gibberellin 20-oxidase-like protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
717	662	5911	0.306	A03012009	glucosyltransferase-like protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1501	1793	2714	0.423	A02010110	glutathione peroxidase, putative; protein id: At4g31870.1 [Arabidopsis thaliana]
20502	24094	7338	0.384	A03032306	glycine cleavage complex P-protein [Zea mays]
3063	3444	7888	0.398	A03041810	glycine rich protein [Oryza sativa]
1141	1149	22060	0.346	A09011712	isoamylase-type starch debranching enzyme ISO3 [Zea mays]
586	540	569	0.306	A01012223	nuclear cap-binding protein CBP80 [Oryza sativa subsp. japonica]
610	567	17065	0.309	A07020709	origin recognition complex2 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
8080	7844	8789	0.324	A04020101	osmotin-like protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
546	506	3165	0.309	A02011819	peroxisomal multifunctional protein [Oryza sativa]
2122	2315	970	0.385	A01021208	phosphate hydrogen transporter [Spinacia oleracea]
1168	1163	446	0.342	A01011804	protein phosphatase 2C-like [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
513	502	11255	0.334	A05011723	putative 5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole synthetase [Oryza sativa (japonica cultivar-
841	1097	8694	0.457	A04012310	putative acetyltransferase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
717	728	30307	0.347	A12012217	putative aminotransferase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
642	792	433	0.432	A01011717	Putative ATP phosphoribosyl transferase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
16031	16993	5951	0.346	A03012123	putative auxin response factor [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
711	672	30798	0.316	A12021514	putative carboxypeptidase D [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
5891	5818	2764	0.337	A02010308	Putative catalase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]

4703	5563	3076	0.417	A02011508	putative cop-coated vesicle membrane protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
677	623	5748	0.305	A03011402	putative CTP synthase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
14110	16610	30984	0.393	A12022218	putative dormancy-asociated protein [Oryza sativa]
1723	2123	387	0.438	A01011523	Putative enolase (2-phospho-D-glycerate hydroylase) [Oryza sativa (japonica cultivar-
8205	8919	1868	0.371	A01032022	putative glutathione S-transferase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
770	905	2267	0.411	A01041005	putative glutathione S-transferase OsGSTF5 [Oryza sativa subsp. japonica]
1188	1170	5588	0.337	A03010724	putative glycyl tRNA synthetase [Arabidopsis thaliana]
3817	3810	24116	0.346	A09041814	putative GTPase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
44124	51771	13601	0.367	A06010403	putative leucine-rich repeat transmembrane protein kinase [Oryza sativa (japonica cultivar-
1699	1731	864	0.355	A01020806	putative LIM-domain protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1835	1708	11323	0.316	A05012013	putative lipid transfer protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
6380	6428	12729	0.344	A05032215	putative nuclease [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
2553	3251	999	0.453	A01021311	putative peptide transporter [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
2933	2661	3168	0.306	A02011822	Putative peroxidase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
9568	10598	1944	0.376	A01032320	putative peroxidase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1598	3232	25336	0.654	A10021312	putative P-glycoprotein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
2262	5391	11207	0.724	A05011601	putative PGPD14 protein (pollen germination related protein) [Oryza sativa (japonica
6067	6350	5947	0.362	A03012119	putative purine permease [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1567	1443	1938	0.31	A01032314	putative receptor kinase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
664	615	4061	0.307	A02030105	Putative serine/threonine kinase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1053	1307	2722	0.437	A02010118	Putative serine/threonine kinase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
622	620	30897	0.339	A12021909	Putative sugar transporter [Oryza sativa]
515	527	2712	0.353	A02010108	putative WD40 protein [Oryza sativa]
536	550	6538	0.353	A03021812	RNase L inhibitor-like protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1203	1303	10818	0.379	A05010102	serine/threonine protein kinase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]

2319	2704	11137	0.415 A05011309	similar to an Arabidopsis thialiana chromosome BAC genomic sequence; unknown protein
873	1021	1103	0.41 A01021711	Similar to Arabidopsis thaliana gamma-adaptin 1 mRNA, complete cds.(AF061286) [Oryza
6387	7973	27487	0.435 A11011805	Similar to glycogenin glucosyltransferase (EC 2.4.1.186). (Z97341) [Oryza sativa (japonica
745	706	30951	0.317 A12022111	starch synthase I [Triticum aestivum]
516	523	28806	0.348 A11031624	Sucrose synthase 1 (Sucrose-UDP glucosyltransferase 1)
464	554	337	0.42 A01011325	threonyl-tRNA synthetase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1179	1475	5418	0.442 A03010110	ubiquitin extension protein [Pyrus communis]
567	543	3045	0.323 A02011403	vacuolar-type H+-translocating inorganic pyrophosphatase [Arabidopsis thaliana]
838	1011	1212	0.423 A01022116	yippee interacting protein 5 [Drosophila melanogaster]
1247	1992	2890	0.549 A02010804	zeaxanthin epoxidase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]

2 fold decrease

Ilpum (Cy3)	Dasa (Cy5)	Serial#	Norm.Log Ratio	Slide&SpotID	
4101	387	7946	-0.681	A03042016	zwh12.1 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]
527	52	19185	-0.605	A08011023	WRKY transcription factor [Oryza sativa (indica cultivar-group)]
6178	1300	26373	-0.329	A10040109	seed imbibition protein [Arabidopsis thaliana]
509	83	20704	-0.405	A08031708	saline-responsive OSSR1 [Oryza sativa]
2110	212	21419	-0.657	A08041821	pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit [Zea mays]
1195	139	13287	-0.586	A05041801	putative transcription repressor HOTR [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1972	389	11696	-0.364	A05020822	putative transcription initiation factor [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
26089	2599	32119	-0.666	A12041409	putative serine acetyltransferase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
603	82	3970	-0.49	A02022318	Putative retroelement [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
974	188	18053	-0.368	A07031909	putative regulatory protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
2518	544	6231	-0.322	A03020617	putative receptor-like protein kinase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
881	149	25367	-0.42	A10021417	putative protein phosphatase 2C [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
603	110	15893	-0.371	A06041407	putative proteasome regulatory non-ATPase subunit [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1043	67	18467	-0.826	A07040907	putative protease inhibitor [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
3288	658	9299	-0.353	A04022017	putative protease inhibitor [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
658	100	17975	-0.45	A07031609	Putative probable submergence induced, nickel-binding protein 2A [Oryza sativa
1106	185	4990	-0.431	A02041024	putative precursor chloroplastic glutamine synthetase [Oryza sativa (japonica cultivar-
5266	742	16078	-0.504	A06042110	putative potassium channel regulatory factor [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
3081	680	15501	-0.311	A06032505	putative polyprotein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1162	247	9613	-0.33	A04030619	putative phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 1, chloroplast
911	185	17820	-0.344	A07031010	putative phi-1(phosphate-induced protein 1) [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
3776	809	11254	-0.322	A05011722	putative peroxidase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
5756	1108	22592	-0.368	A09021124	putative peptide transporter [Oryza sativa]
1399	268	22104	-0.377	A09011904	putative omega-6 fatty acid desaturase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
504	92	6300	-0.359	A03020908	putative omega-3 fatty acid desaturase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1818	309	31977	-0.429	A12040823	putative nematode resistance-like protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]

3332	603	9126	-0.397	A04021326	putative nascent polypeptide associated complex alpha chain [Oryza sativa (japonica
2483	176	23738	-0.809	A09040326	Putative Magnaporthe grisea pathogenicity protein [Oryza sativa]
21064	4205	13978	-0.367	A06011816	putative lipoxygenase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1116	217	14508	-0.368	A06021226	putative l-asparaginase [Oryza sativa (indica cultivar-group)]
1090	206	17987	-0.379	A07031621	putative hydrolase [Oryza sativa] >gi|28372700|gb|AAO39884.1| putative
625	65	17097	-0.599	A07020815	putative histone H1 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
2668	250	9656	-0.687	A04030810	putative glutathione S-transferase OsGSTU9 [Oryza sativa subsp. japonica]
2474	497	29415	-0.354	A11041409	putative glutamine synthetase [Oryza sativa]
675	84	3177	-0.533	A02011905	putative glucosyltransferase [Oryza sativa]
940	194	27517	-0.338	A11011909	putative glucosyltransferase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
579	115	3592	-0.334	A02020904	putative G10 protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
12370	2521	12396	-0.348	A05030920	putative fruit-ripening protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
6786	1373	26481	-0.346	A10040513	putative formin-like protein AHF1 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
2486	559	22070	-0.304	A09011722	putative eIF3e [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1448	184	12867	-0.553	A05040123	putative dynein light chain [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
756	141	21309	-0.373	A08041415	putative decarboxylase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
514	62	16158	-0.524	A06042412	putative cytidine deaminase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1463	317	9697	-0.324	A04030925	putative cysteine proteinase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
3963	659	16103	-0.433	A06042209	putative cysteine proteinase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1023	213	31553	-0.337	A12031815	putative coat protein complex II (COPII) component [Oryza sativa (japonica cultivar-
1523	338	14480	-0.313	A06021124	putative branched-chain amino acid aminotransferase protein [Oryza sativa
4813	814	21560	-0.425	A08042406	putative blue copper-binding protein homolog [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
791	152	27157	-0.363	A11010513	putative beta-D-galactosidase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
5778	861	24201	-0.479	A09042121	putative beta-1,3-glucanase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
8170	982	24045	-0.572	A09041521	putative AT hook-containing MAR binding protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
2575	576	11531	-0.306	A05020213	probable homeobox protein OSH45, splice form OSH44 [similarity] - rice
5685	1013	20971	-0.401	A08040115	plastid protein [Arabidopsis thaliana]

4058	877	14523	-0.318	A06021315	phospholipase D [Oryza sativa]
1187	205	17917	-0.419	A07031403	phosphoinositide-specific phospholipase C [Oryza sativa]
864	108	19232	-0.544	A08011218	Phenylalanine ammonia-lyase >gi|2130081|pir||S66313 phenylalanine
567	100	16129	-0.381	A06042309	nitrate reductase [Zea mays]
14412	2137	12777	-0.486	A05032411	Nitrate reductase [NADH] 1 (NR1) >gi|82490|pir||S07554 nitrate reductase
3219	498	16074	-0.466	A06042106	NADP-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Chlamydomonas sp. W80]
576	43	26898	-0.721	A10042114	mitochondrial chaperonin-60 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1757	320	15846	-0.399	A06041212	LIGULELESS1 PROTEIN >gi|7489786|pir||T04328 liguleless1 protein -
924	142	16079	-0.461	A06042111	heat shock protein HSP70-1
709	149	13828	-0.321	A06011222	GF14omega isoform
1307	230	13184	-0.413	A05041402	GF14-d protein - rice >gi|1519253|gb|AAB07458.1| GF14-d protein
2217	393	27763	-0.41	A11020221	FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE, CHLOROPLAST PRECURSOR (D-FRUCTOSE-
1832	404	29451	-0.315	A11041519	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 11 (eIF-3 p25) (eIF3k)
649	79	14907	-0.539	A06030209	disease resistance response protein-like [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1259	39	4462	-1.132	A02031616	cytochrome P450-like protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
2274	491	16522	-0.323	A07011212	contains EST D48384(S14556)~unknown protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
841	84	18395	-0.634	A07040613	contains EST AU033250(S5865)~disease resistance response protein family/ dirigent
720	137	31918	-0.363	A12040616	coclaurine N-methyltransferase [Arabidopsis thaliana]
3386	707	23572	-0.334	A09032316	cap-binding protein p28 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
2842	590	13040	-0.338	A05040814	calmodulin [Zea mays]
884	146	9478	-0.43	A04030114	C13 endopeptidase NP1 precursor [Zea mays]
18908	2027	31022	-0.628	A12022404	B1088C09.10 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
1377	221	9204	-0.453	A04021626	B1033B05.3 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] >gi|20161925|dbj|BAB90836.1|
4274	824	7050	-0.368	A03031204	AP2-containing protein [Triticum aestivum]
525	91	4291	-0.383	A02031001	alpha-expansin OsEXP7 [imported] - rice >gi|7407663|gb|AAF62182.1|AF247164_1
1079	221	19736	-0.345	A08020602	alpha tubulin [Hordeum vulgare]
1016	215	9476	-0.33	A04030112	allene oxide cyclase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]

517	95	3576	-0.359	A02020814	adenosine kinase-like protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
2096	327	26446	-0.466	A10040404	adenosine 5'-phosphosulfate reductase [Zea mays]
5801	903	20283	-0.46	A08030103	adenine phosphoribosyltransferase form 2 [Oryza sativa (indica cultivar-group)]
830	175	8790	-0.326	A04020102	60S ribosomal protein L13, BBC1 protein [Arabidopsis thaliana]
39386	9556	32264	-0.366	B12041924	DNA polymerase III catalytic subunit; protein id: At5g63960.1 [Arabidopsis thaliana]
768	116	5227	-0.436	B02042001	dnaJ-like protein [imported] - rice >gi|4680190|gb|AAD27555.1|AF111710_1
540	107	21779	-0.311	B09010617	mago nashi-like protein [Oryza sativa]
692	122	22536	-0.368	B09020920	nodulin-like protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
6299	881	29535	-0.542	B11041825	proline-rich protein RiP-15 [Oryza sativa]
670	108	21739	-0.404	B09010503	putative alpha-galactosidase [Oryza sativa]
517	69	29755	-0.472	B12010111	putative chitinase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
877	164	21343	-0.352	B08041523	putative gag-pol polyprotein [Oryza sativa]
840	70	17446	-0.687	B07022126	putative glutathione S-transferase [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
956	160	18483	-0.401	B07040923	Putative lipid tranfer protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]

유전자들이다. 증가한 유전자들의 정보를 COGs 분석 (Clusters of Orthologous Groups of proteins)을 통해 각각의 유전자를 그 기능에 따라 분류하였고 그 결과는 표 8, 표 9과 같다. 분류 결과 증가한 2082 종 중 123 종의 유전자의 기능을 확인하였다. 동일한 방법으로 감소한 유전자들을 기능에 따란 분류한 결과 138종의 유전자가 발현이 감소하였다. 일품과 다산 품종간의 벼 내의 sink-source 관련 유전자의 변화 알아보기 위하여 60K chip 내에 존재하는 관련 유전자 23 종을 대상으로 유전자 발현 양상을 비교하여 보았고 그 결과는 표 10 같다. 표 10을 보면 총 23 종의 관련 유전자들 중에 soluble acid invertase 만이 2배 이상의 감소를 보였으며 나머지 유전자들은 2배 이하의 변화를 보였다.

표 8) Results of COGs assay from comparison of trascription levels between Ilpum rice and Dasan rice

INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	Incress	Decress
[J] Translation, ribosomal structure and biogenesis	12	8
[A] RNA processing and modification	1	2
[K] Transcription	3	8
[L] Replication, recombination and repair	1	2
[B] Chromatin structure and dynamics	1	0
	18	20
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING		
[D] Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	0	1
[Y] Nuclear structure	0	0
[V] Defense mechanisms	1	0
[T] Signal transduction mechanisms	6	11
[M] Cell wall/membrane/envelope biogenesis	1	1
[N] Cell motility	0	0
[Z] Cytoskeleton	2	1
[W] Extracellular structures	0	0
[U] Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	2	4
[O] Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	13	16
	25	34
METABOLISM		
[C] Energy production and conversion	11	7
[G] Carbohydrate transport and metabolism	9	11
[E] Amino acid transport and metabolism	10	10
[F] Nucleotide transport and metabolism	2	2
[H] Coenzyme transport and metabolism	3	3
[I] Lipid transport and metabolism	4	4
[P] Inorganic ion transport and metabolism	10	5
[Q] Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	2	9
	51	51
POORLY CHARACTERIZED		
[R] General function prediction only	15	16
[S] Function unknown	9	6
[X] Unnamed protein	5	11
	29	33

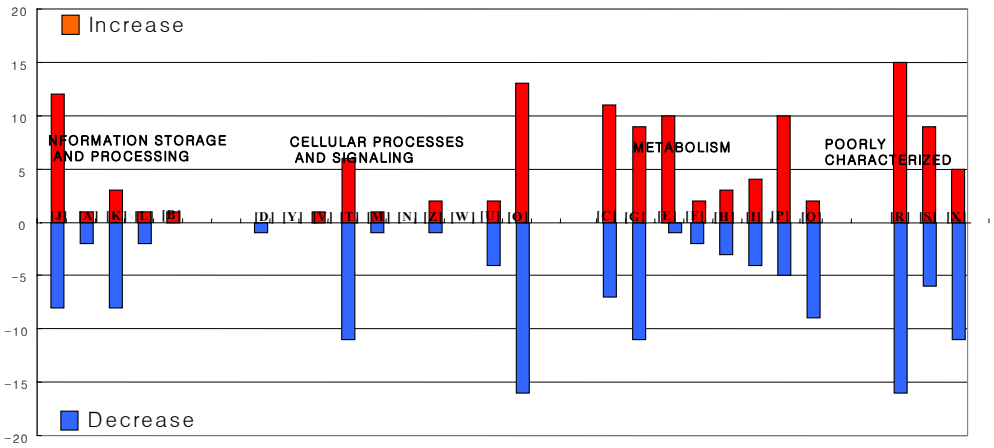


표 9) list of clones from COGs assay Results of COGs assay from comparison of trascription levels between Ilpum rice and Dasan rice

2 fold increase

INFORMATION STORAGE AND PROCESSING
Exon-exon junction complex, Magoh component
Predicted snRNP core protein
60S acidic ribosomal protein P0
60S acidic ribosomal protein P0
60s ribosomal protein L19
Ribosomal protein S4
Translation elongation factor EF-1 alpha/Tu
Ubiquitin/40S ribosomal protein S27a fusion
60S ribosomal protein L14/L17/L23
A AP2 domain transcription factor
G10 protein/predicted nuclear transcription regulator
A AP2 domain transcription factor
Transcription factor MBF1
A WRKY superfamily transcription factors
DNA polymerase delta, catalytic subunit
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
Cdk activating kinase (CAK)/RNA polymerase II transcription initiation/nucleotide excision rep
A Receptor-like protein kinase, contains lectin domains
Calmodulin and related proteins (EF-Hand superfamily)
Copine
Phosphoinositide-specific phospholipase C
A Receptor-like protein kinase, contains lectin domains
Conserved phosducin-like protein
A Expansin
Dynein light chain type 1
Putative Rab5-interacting protein
emp24/gp25L/p24 family of membrane trafficking proteins
emp24/gp25L/p24 family of membrane trafficking proteins
Asparaginyl peptidases
Thioredoxin
Glutathione S-transferase
Multifunctional chaperone (14-3-3 family)
Cysteine proteinase Cathepsin L
Multifunctional chaperone (14-3-3 family)
26S proteasome regulatory complex, subunit RPN5/PSMD12
26S proteasome regulatory complex, ATPase RPT6
26S proteasome regulatory complex, ATPase RPT3
Beta-tubulin folding cofactor A
20S proteasome, regulatory subunit beta type PSMB3/PUP3
A Predicted carboxyl-terminal proteinase, contains an unknown domain
METABOLISM
Inorganic pyrophosphatase/Nucleosome remodeling factor, subunit NURF38
Vacuolar H+-ATPase V1 sector, subunit B
A Phosphoenolpyruvate carboxylase
Mitochondrial carrier protein MRS3/4
Mitochondrial tricarboxylate/dicarboxylate carrier proteins
Pyruvate dehydrogenase E1, alpha subunit
Sulfite oxidase, molybdopterin-binding component

Fructose-1,6-bisphosphatase
Beta-galactosidase
Beta-galactosidase
Possible pfkB family carbohydrate kinase
UDP-galactose transporter related protein
Pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase
Predicted dehydrogenase
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Alpha-D-galactosidase (melibiase)
Glucosyltransferase - Alg6p
A Anthranilate phosphoribosyltransferase and related proteins
Alanine aminotransferase
Phosphoadenosine phosphosulfate reductase
H+/oligopeptide symporter
Acetylornithine aminotransferase
Glutamine synthetase
Isocitrate dehydrogenase, gamma subunit
Nucleoside transporter
Stationary phase-induced protein, SOR/SNZ family
A Predicted phytochelatin synthetase
A Predicted phytochelatin synthetase
Soluble epoxide hydrolase
3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase (I and II)
3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase (I and II)
Copper chaperone
Cu2+/Zn2+ superoxide dismutase SOD1
Glutamate-gated kainate-type ion channel receptor subunit GluR5 and related subunits
Phenylalanine and histidine ammonia-lyase
Phenylalanine and histidine ammonia-lyase
Cytochrome P450 CYP2 subfamily
Phenylalanine and histidine ammonia-lyase
Cytochrome P450 CYP2 subfamily
Alcohol dehydrogenase, class III
Iron/ascorbate family oxidoreductases
POORLY CHARACTERIZED
Predicted unusual protein kinase
A Predicted methyltransferase
Predicted RNA-binding protein (RRM superfamily)
Predicted Zn-finger protein
P-type ATPase
Ras-related small GTPase, Rho type
FOG: Ankyrin repeat
FOG: RRM domain
Predicted transporter (major facilitator superfamily)
FOG: PPR repeat
Reductases with broad range of substrate specificities
A MYB transcription factor
A Uncharacterized protein
A Uncharacterized protein
A Uncharacterized protein
A No apical meristem (NAM) developmental protein and related proteins
Defense-related protein containing SCP domain

2 fold decrease

INFORMATION STORAGE AND PROCESSING
Exon-exon junction complex, Magoh component
Predicted snRNP core protein
60S ribosomal protein L35A/L37
60S acidic ribosomal protein P0
60S acidic ribosomal protein P0
60s ribosomal protein L19
Ribosomal protein S4
Translation elongation factor EF-1 alpha/Tu
Ubiquitin/40S ribosomal protein S27a fusion
60S ribosomal protein L14/L17/L23
A AP2 domain transcription factor
G10 protein/predicted nuclear transcription regulator
A AP2 domain transcription factor
Transcription factor MBF1
A WRKY superfamily transcription factors
DNA polymerase delta, catalytic subunit
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING
Cdk activating kinase (CAK)/RNA polymerase II transcription initiation/nucleotide excision repair factor TFIIH/TFIIK, kinase subunit CDK7
A Expansin
Asparaginyl peptidases
Thioredoxin
Purple (tartrate-resistant) acid phosphatase
FOG: Predicted E3 ubiquitin ligase
Glutathione S-transferase

Multifunctional chaperone (14-3-3 family)
Cysteine proteinase Cathepsin L
Multifunctional chaperone (14-3-3 family)
26S proteasome regulatory complex, subunit RPN5/PSMD12
26S proteasome regulatory complex, ATPase RPT6
Chaperone HSP104 and related ATP-dependent Clp proteases
26S proteasome regulatory complex, ATPase RPT3
Molecular chaperones HSP70/HSC70, HSP70 superfamily
Beta-tubulin folding cofactor A
20S proteasome, regulatory subunit beta type PSMB3/PUP3
A Predicted carboxyl-terminal proteinase, contains an unknown domain
A Receptor-like protein kinase, contains lectin domains
Calmodulin and related proteins (EF-Hand superfamily)
Copine
Phosphoinositide-specific phospholipase C
A Receptor-like protein kinase, contains lectin domains
Conserved phosducin-like protein
GTP-binding ADP-ribosylation factor Arf1
Putative Rab5-interacting protein
emp24/gp25L/p24 family of membrane trafficking proteins
emp24/gp25L/p24 family of membrane trafficking proteins
Dynein light chain type 1
METABOLISM
Inorganic pyrophosphatase/Nucleosome remodeling factor, subunit NURF38
Vacuolar H+-ATPase V1 sector, subunit B

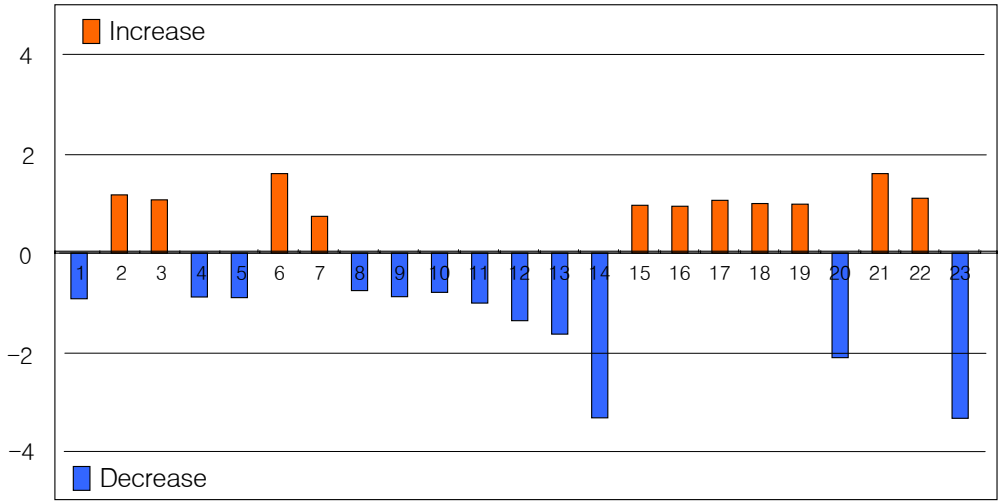
Vacuolar H+-ATPase V1 sector, subunit B
A Phosphoenolpyruvate carboxylase
Mitochondrial carrier protein MRS3/4
Mitochondrial tricarboxylate/dicarboxylate carrier proteins
Pyruvate dehydrogenase E1, alpha subunit
Sulfite oxidase, molybdopterin-binding component
A Anthranilate phosphoribosyltransferase and related proteins
Alanine aminotransferase
Phosphoadenosine phosphosulfate reductase
H+/oligopeptide symporter
Acetylornithine aminotransferase
Glutamine synthetase
Isocitrate dehydrogenase, gamma subunit
Nucleoside diphosphate kinase
Nucleoside transporter
Fructose-1,6-bisphosphatase
Beta-galactosidase
Beta-galactosidase
Possible pfkB family carbohydrate kinase
UDP-galactose transporter related protein
Pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase
Predicted dehydrogenase
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Alpha-D-galactosidase (melibiase)
Glucosyltransferase - Alg6p
Stationary phase-induced protein, SOR/SNZ family
A Predicted phytochelatin synthetase
A Predicted phytochelatin synthetase
Soluble epoxide hydrolase
3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase (I and II)

3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase (I and II)
Lipid exporter ABCA1 and related proteins, ABC superfamily
Ferric reductase-like proteins
Copper chaperone
Cu2+/Zn2+ superoxide dismutase SOD1
Copper transporter
Glutamate-gated kainate-type ion channel receptor subunit GluR5 and related subunits
Phenylalanine and histidine ammonia-lyase
Phenylalanine and histidine ammonia-lyase
Cytochrome P450 CYP2 subfamily
Phenylalanine and histidine ammonia-lyase
Cytochrome P450 CYP2 subfamily
Alcohol dehydrogenase, class III
Iron/ascorbate family oxidoreductases
POORLY CHARACTERIZED
Predicted unusual protein kinase
A Predicted methyltransferase
Predicted RNA-binding protein (RRM superfamily)
Predicted Zn-finger protein
P-type ATPase
Ras-related small GTPase, Rho type
FOG: Ankyrin repeat
FOG: RRM domain
Predicted transporter (major facilitator superfamily)
Haloacid dehalogenase-like hydrolase

FOG: PPR repeat
Reductases with broad range of substrate specificities
A MYB transcription factor
A No apical meristem (NAM) developmental protein and related proteins
Defense-related protein containing SCP domain

표 10) Comparison of sink-source related gene expression between Ilpum rice and Dasan with rice 60K microarray.

	gene name	Slide&SpotID	Ilpum(Cy3)	Dasa(Cy5)	Norm.Log Ratio	Fold Induction
1	Fructose-bisphosphate aldolase	B10032103	1683	604	-0.103	-1.27
2	phosphoglucomutase	B03021824	839	600	0.209	1.62
3	ADP-glucose pyrophosphorylase	A08011313	471	314	0.174	1.49
4	sucrose-phosphate synthase	A05041710	1056	393	-0.089	-1.23
5	sucrose-phosphate synthase	A11012424	1525	562	-0.092	-1.24
6	Sucrose synthase 1	A11031624	516	523	0.348	2.23
7	sucrose synthase	A08020321	236	93	0.007	1.02
8	putative soluble starch synthase IV-1	A07011701	184	64	-0.016	-1.04
9	sucrose transporter	A05041102	1049	398	-0.08	-1.20
10	invertase	B10011908	90	25	-0.038	-1.09
11	apoplastic invertase	A09012107	5531	1796	-0.141	-1.38
12	apoplastic invertase	A03021308	303	61	-0.276	-1.89
13	soluble acid invertase	A09012224	333	56	-0.355	-2.26
14	vacuolar acid invertase	A08011026	373	29	-0.662	-4.59
15	soluble starch synthase II-2	A03041117	1273	772	0.125	1.33
16	apoplastic invertase	A07012107	27598	17560	0.118	1.31
17	Putative starch synthase	B12012015	119	59	0.166	1.47
18	putative soluble starch synthase IV-2	A04021205	128	61	0.142	1.39
19	starch branching enzyme rbe4	B03032107	614	361	0.138	1.37
20	starch branching enzyme isoform RBE3	B05032107	351	44	-0.464	-2.91
21	isoamylase-type starch debranching enzyme IS	A09011712	1141	1149	0.346	2.22
22	starch debranching enzyme	B03042105	215	127	0.185	1.53
23	hexokinase I	A02011104	133	8	-0.664	-4.61



제 3 절 수량생산성 특성검정 및 재료 육성

1) 재료 및 방법

1. 시험재료

1991년 작물시험장 벼유전육종과에서 일품벼, 수원391호, 수원392호의 수정란에 돌연변이 유기물질인 N-*methyl*-N-*nitrosourea*(MNU)를 1mol/ℓ의 농도로 암상태에서 1시간 처리한 후 24시간 동안 수세하여 얻은 종자를 계통육종법에 의거 선발 고정시킨 후대 99계통을 이용하였다.

o 일품벼 MNU 처리 후대계통 : 66계통

o 수원391호 MNU 처리 후대계통 : 24계통

o 수원392호 MNU 처리 후대계통 : 9계통

2. 재배법

특성 검정 및 재료 육성을 위하여 작물시험장 표준재배법에 따라 작물시험장 시험포장에서 재배하였다(표 3-1).

Table 3-1. Standard cultivation method of National Crop Experiment Station.

Seeding date	Transplanting date	Planting distance	Seedling number per hill	Seedling raising method	Amount of applied fertilizer(kg/10a) N-P_2O_5-K_2O
April 20	May 25	30×15cm	1	Seedling box	11 - 4.5 - 5.7

3. 특성 검정

시험재료로 이용된 MNU 처리 후대는 다양한 수량성과 전분 특성을 나타내는 계통으로서 이들 계통에 대한 수량구성요소, 전분의 특성 및 주요 이화학적 특성을 조사하였다.

o 주요 조사항목 : 출수기, 수량 관련요소, 현미입형, 정조 수량, 배유형태, 알카리 붕괴도, 아밀로스 및 단백질 함량, 호화점도특성

2) 결과 및 고찰

1. 주요 작물학적 특성

시험에 이용된 일품벼 돌연변이 후대 66계통, 수원391호 돌연변이 후대 24계통, 수원392호 돌연변이 후대 9계통의 출수기, 간장, 수장, 현미입형의 측정치와 표준편차를 표 2, 3, 4에 나타내었다.

1) 출수기

시험재료의 출수기 분포는 일품벼 돌연변이 후대계통은 8월 3일~8월 27일, 수원391호 돌연변이 후대계통은 8월 12일~8월 26일, 수원392호 돌연변이 후대계통은 8월 10일~8월14일의 분포를 나타냈다.

2) 간장

시험재료의 간장은 일품벼, 수원391호 및 수원392호 유래 돌연변이 계통군별로 65~87cm, 76~95cm, 75~79cm의 분포를 나타내었다.

3) 수장

시험재료의 수장은 일품벼, 수원391호 및 수원392호 유래 돌연변이 계통군별로 18~24cm, 18~22cm, 22~25cm 분포를 나타내었으며 수장의 변이 폭이 출수기, 간장보다 적었다.

4) 현미입형

현미입형은 길이, 너비, 두께, 장폭비를 조사하였는데, 일품벼 유래 돌연변이 계통은 각각 평균 4.85±0.17mm, 평균 2.77±0.11mm, 평균 1.87±0.11mm, 평균 1.75±0.08, 수원391호 유래 돌연변이 계통은 각각 평균 5.87±0.18mm, 평균 3.12±0.13mm, 평균 1.95±0.10mm, 평균 1.89±0.07, 수원392호 유래 돌연변이 계통은 각각 평균 5.24±0.08mm, 평균 2.70±0.07mm, 평균 1.78±0.06mm, 평균 1.95±0.04의 분포를 나타냈으며, 각 처리계통 모두 현미 길이의 변이가 너비, 두께, 장폭비보다 크게 나타났다.

Table 3-2. Agronomic characteristics of Ilpumbyeo mutant lines.

No	Pedigree	Heading date (m.d)	Culm length (cm)	Panicle length (cm)	Grain			
					Length (mm)	Width (mm)	Thickness (mm)	L/W ratio
1	Ilpum(MNU)-2-3-GH1-3-3-2-2-2-3	8.18	81	21	5.22	3.06	2.03	1.71
2	Ilpum(MNU)-3-2-GH1-4-4-2-2-3-3	8.21	74	21	4.93	2.80	1.64	1.77
3	Ilpum(MNU)-6-2-GH1-2-1-3-3-3-2	8.03	75	21	4.80	2.77	1.90	1.71
4	Ilpum(MNU)-6-2-GH1-2-5-3-1-2-1	8.21	77	20	4.91	2.64	1.80	1.87
5	Ilpum(MNU)-6-4-GH1-3-2-3-2-2-2	8.22	74	21	4.88	2.72	1.83	1.79
6	Ilpum(MNU)-8-4-GH1-2-5-1-3-2-1	8.20	69	22	4.77	2.71	1.78	1.80
7	Ilpum(MNU)-10-2-GH1-3-1-3-2-2-3	8.25	68	21	4.80	2.91	1.97	1.65
8	Ilpum(MNU)-11-2-GH1-2-5-2-1-3-1	8.24	70	22	4.55	2.90	2.00	1.57
9	Ilpum(MNU)-12-3-GH1-4-1-3-2-2-2	8.26	68	21	4.68	2.88	2.07	1.63
10	Ilpum(MNU)-13-4-GH1-2-4-1-2-3-3	8.26	71	21	4.68	2.94	2.01	1.60
11	Ilpum(MNU)-14-16-GH1-3-3-3-1-3-1	8.27	71	20	4.64	2.92	2.06	1.59
12	Ilpum(MNU)-15-4-GH1-3-5-1-2-1-1	8.12	79	20	5.04	2.91	2.03	1.74
13	Ilpum(MNU)-23-1-GH1-3-3-3-2-3-2	8.25	74	22	4.87	2.67	1.58	1.81
14	Ilpum(MNU)-24-2-GH1-3-1-2-3-1-3	8.20	73	21	4.90	2.79	1.84	1.76
15	Ilpum(MNU)-24-2-GH1-3-4-2-2-3-2	8.21	69	21	4.80	2.77	1.88	1.74
16	Ilpum(MNU)-26-1-GH1-3-3-3-3-1-3	8.21	73	21	4.89	2.87	1.89	1.71
17	Ilpum(MNU)-27-5-GH1-1-2-2-2-5-2	8.20	76	22	4.67	2.73	1.82	1.70
18	Ilpum(MNU)-28-3-GH1-2-5-3-3-2-1	8.21	74	21	4.65	2.89	2.00	1.61
19	Ilpum(MNU)-29-1-GH1-2-3-3-2-3-2	8.18	74	22	4.90	2.65	1.75	1.94
20	Ilpum(MNU)-30-2-GH1-5-3-3-3-2-3	8.24	71	20	4.33	2.64	1.77	1.63
21	Ilpum(MNU)-30-2-GH1-5-5-3-1-3-1	8.21	69	20	4.77	2.79	1.97	1.69
22	Ilpum(MNU)-31-1-GH1-2-3-2-1-1-3	8.18	75	21	5.15	2.82	1.89	1.83
23	Ilpum(MNU)-32-2-GH1-1-5-3-2-2-1	8.20	76	21	4.77	2.95	2.01	1.62
24	Ilpum(MNU)-33-1-GH1-2-1-3-3-1-1	8.21	79	24	4.96	3.01	2.04	1.65
25	Ilpum(MNU)-34-2-GH1-3-1-3-3-3-3	8.21	87	23	4.87	2.93	2.03	1.67
26	Ilpum(MNU)-35-4-GH1-2-2-3-2-2-2	8.18	68	20	4.81	2.83	1.97	1.70
27	Ilpum(MNU)-36-2-GH1-2-10-1-2-3-2	8.20	81	22	4.87	2.93	1.99	1.66
28	Ilpum(MNU)-36-2-GH1-2-7-3-2-3-3	8.20	82	24	4.79	2.93	1.98	1.64
29	Ilpum(MNU)-39-2-GH1-2-2-3-3-1-1	8.12	74	19	5.23	2.81	1.99	1.86
30	Ilpum(MNU)-42-3-GH1-3-1-2-1-2-1	8.14	66	22	4.85	2.72	1.84	1.80
31	Ilpum(MNU)-42-3-GH1-3-1-2-2-3-3	8.18	73	21	4.84	2.75	1.80	1.77
32	Ilpum(MNU)-44-2-GH1-2-2-3-2-2-3	8.20	72	21	4.75	2.69	1.82	1.76
33	Ilpum(MNU)-45-2-GH1-3-2-3-1-2-3	8.20	71	20	4.82	2.66	1.73	1.84

No	Pedigree	Heading date (m.d)	Culm length (cm)	Panicle length (cm)	Grain			
					Length (mm)	Width (mm)	Thickness (mm)	L/W ratio
34	Ilpum(MNU)-47-2-GH1-2-1-3-3-2-2	8.16	70	20	5.24	2.85	1.93	1.84
35	Ilpum(MNU)-47-2-GH1-2-2-2-2-3-1	8.14	71	20	5.10	2.88	1.94	1.77
36	Ilpum(MNU)-48-2-GH1-2-2-3-1-2-1	8.20	71	21	4.73	2.70	1.85	1.76
37	Ilpum(MNU)-51-5-GH1-4-2-2-3-3-2	8.20	68	20	4.50	2.68	1.79	1.67
38	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-2-1-3-2-1	8.21	67	21	4.78	2.93	1.93	1.63
39	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-2-3-3-2-1	8.21	68	21	4.92	2.87	1.98	1.72
40	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-3-2-2-2-3	8.26	66	21	4.78	2.70	1.79	1.78
41	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-5-3-3-1-1	8.20	72	21	4.96	2.84	2.01	1.76
42	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-5-3-3-3-1	8.26	68	20	4.85	2.71	1.78	1.80
43	Ilpum(MNU)-56-3-GH1-2-2-2-2-1-1	8.21	65	22	4.86	2.66	1.74	1.83
44	Ilpum(MNU)-57-2-GH1-5-3-1-2-2-2	8.12	67	21	5.09	2.75	1.82	1.88
45	Ilpum(MNU)-58-6-GH1-7-4-2-3-3-3	8.22	75	22	4.72	2.75	1.75	1.72
46	Ilpum(MNU)-59-2-GH1-5-3-3-3-3-2	8.20	79	21	4.82	2.76	1.79	1.77
47	Ilpum(MNU)-60-1-GH1-4-5-3-2-1-3	8.13	82	21	4.68	2.68	1.84	1.77
48	Ilpum(MNU)-62-4-GH1-5-2-1-2-2-1	8.20	86	23	4.69	2.72	1.79	1.75
49	Ilpum(MNU)-63-5-GH1-4-2-1-3-2-1	8.20	77	21	4.72	2.66	1.77	1.77
50	Ilpum(MNU)-65-5-GH1-4-4-2-3-3-2	8.12	78	21	4.76	2.64	1.79	1.81
51	Ilpum(MNU)-66-6-GH1-1-1-2-2-1-3	8.20	77	21	4.81	2.64	1.76	1.82
52	Ilpum(MNU)-67-4-GH1-2-1-1-1-1-1	8.18	78	21	4.85	2.62	1.80	1.86
53	Ilpum(MNU)-67-4-GH1-2-3-2-2-3-1	8.17	83	20	4.93	2.74	1.77	1.82
54	Ilpum(MNU)-67-4-GH1-2-3-2-2-3-3	8.14	79	22	4.89	2.62	1.78	1.86
55	Ilpum(MNU)-68-4-GH1-4-2-2-3-2-1	8.18	76	21	4.87	2.65	1.76	1.87
56	Ilpum(MNU)-69-2-GH1-1-1-3-2-2-3	8.18	82	21	4.82	2.66	1.72	1.80
57	Ilpum(MNU)-70-1-GH1-5-4-3-1-2-2	8.14	77	22	4.87	2.63	1.76	1.87
58	Ilpum(MNU)-71-3-GH1-4-5-2-2-2-1	8.20	85	23	4.83	2.65	1.79	1.86
59	Ilpum(MNU)-72-4-GH1-5-4-3-3-2-3	8.16	78	20	4.94	2.72	1.86	1.83
60	Ilpum(MNU)-73-4-GH1-5-2-3-2-3-1	8.14	85	20	4.84	2.70	1.85	1.81
61	Ilpum(MNU)-75-3-GH1-1-4-3-3-3-2	8.20	83	22	4.76	2.70	1.88	1.75
62	Ilpum(MNU)-76-2-GH1-2-4-1-3-1-3	8.20	84	22	4.84	2.76	1.82	1.74
63	Ilpum(MNU)-77-3-GH1-1-3-3-2-1-3	8.20	84	23	4.90	2.78	1.86	1.76
64	Ilpum(MNU)-78-2-GH1-4-5-2-2-1-2	8.20	86	21	4.90	2.78	1.87	1.72
65	Ilpum(MNU)-80-2-GH1-4-3-3-1-3-1	8.19	85	18	5.12	2.97	2.01	1.73
66	Ilpum(MNU)-87-5-GH1-2-2-2-1-2-1	8.18	68	20	5.35	2.91	2.08	1.84
	Range	8.03 ~ 8.27	65~87	18~24	4.33 ~5.35	2.62 ~3.06	1.58 ~2.08	1.57 ~1.94
	Mean	8.19	75	21	4.85	2.77	1.87	1.75
	Standard deviation	4.12	5.98	1.07	0.1	0.11	0.11	0.08

Table 3-3. Agronomic characteristics of Suweon 391 mutant lines.

No	Pedigree	Heading date (m.d)	Culm length (cm)	Panicle length (cm)	Grain			
					Length (mm)	Width (mm)	Thickness (mm)	L/W ratio
1	S.391(MNU)-38-1-GH1-5-3-2-2-2-3	8.16	89	19	6.03	3.29	1.85	1.83
2	S.391(MNU)-38-1-GH1-5-3-2-2-2-4	8.14	83	19	5.91	3.16	1.96	1.88
3	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-1-1-3-3-3	8.20	93	21	5.83	3.10	1.90	1.89
4	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-2-1-3-1-3	8.18	81	22	5.91	3.14	2.01	1.88
5	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-2-3-2-2-3	8.20	79	19	5.79	3.17	1.98	1.83
6	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-2-3-3-3-3	8.18	82	21	5.77	3.33	2.17	1.89
7	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-3-1-1-2-3	8.20	76	19	6.15	3.16	2.00	1.95
8	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-3-1-1-3-1	8.20	78	19	5.58	2.95	1.93	1.89
9	S.391(MNU)-40-1-GH1-2-1-1-2-2-2	8.20	90	19	5.70	3.03	1.98	1.89
10	S.391(MNU)-40-1-GH1-2-6-3-2-3-2	8.16	92	19	6.15	3.29	2.14	1.88
11	S.391(MNU)-40-1-GH1-2-9-3-2-2-1	8.17	95	20	6.19	3.29	2.04	1.89
12	S.391(MNU)-41-2-GH1-5-3-3-1-2-3	8.18	89	19	6.07	3.05	1.91	2.01
13	S.391(MNU)-41-2-GH1-5-5-3-2-2-2	8.18	89	21	5.90	3.05	1.79	1.96
14	S.391(MNU)-80-2-GH1-4-2-3-3-1-1	8.16	87	20	5.59	3.14	1.72	1.77
15	S.391(MNU)-81-2-GH1-4-2-2-3-3-2	8.12	76	18	5.82	3.25	1.95	1.78
16	S.391(MNU)-82-2-2-GH1-5-3-3-2-1	8.16	91	22	5.97	3.32	2.06	1.83
17	S.391(MNU)-82-2-GH1-5-2-3-1-3-2	8.16	91	21	5.65	3.07	1.93	1.87
18	S.391(MNU)-83-2-GH1-5-4-3-1-2-3	8.26	85	19	5.98	3.06	1.96	1.98
19	S.391(MNU)-83-2-GH1-5-4-3-2-2-1	8.16	87	19	5.89	2.93	1.90	2.04
20	S.391(MNU)-83-2-GH1-5-5-3-3-2-5	8.14	88	19	5.95	3.04	1.84	1.99
21	S.391(MNU)-84-2-GH1-1-4-3-1-2-2	8.14	90	19	5.56	2.97	1.96	1.87
22	S.391(MNU)-84-2-GH1-1-5-1-3-1-3	8.17	92	20	5.87	2.97	1.89	1.98
23	S.391(MNU)-85-1-GH1-2-4-3-2-2-3	8.16	91	19	5.75	2.91	1.90	1.95
24	S.391(MNU)-85-1-GH1-2-4-3-2-2-3-2	8.16	93	19	5.82	3.27	2.13	1.79
	Range	8.12 ~8.26	76~95	18~22	5.56 ~6.19	2.91 ~3.33	1.72 ~2.17	1.77 ~2.04
	Mean	8.17	87	20	5.87	3.12	1.95	1.89
	Standard deviation	2.86	5.65	1.09	0.18	0.13	0.10	0.07

Table 3-4. Agronomic characteristics of Suweon 392 mutant lines.

No	Pedigree	Heading date (m.d)	Culm length (cm)	Panicle length (cm)	Grain			
					Length (mm)	Width (mm)	Thickness (mm)	L/W ratio
1	S.392(MNU)-17-3-GH1-5-3-3-3-1-2	8.12	77	25	5.35	2.71	1.81	1.97
2	S.392(MNU)-18-2-GH1-3-1-3-2-2-3	8.14	76	24	5.26	2.71	1.82	1.95
3	S.392(MNU)-18-2-GH1-3-5-2-2-2-2	8.11	78	25	5.30	2.69	1.81	1.98
4	S.392(MNU)-19-3-GH1-5-4-3-2-2-2	8.11	78	24	5.25	2.71	1.82	1.94
5	S.392(MNU)-19-3-GH1-5-5-2-2-1-2	8.12	79	25	5.24	2.73	1.78	1.93
6	S.392(MNU)-20-4-GH1-5-1-2-2-3-3	8.11	78	24	5.31	2.74	1.77	1.94
7	S.392(MNU)-20-4-GH1-5-3-2-2-2-1	8.10	78	23	5.22	2.70	1.78	1.93
8	S.392(MNU)-21-5-GH1-5-2-3-3-2-1	8.12	78	24	5.16	2.81	1.78	1.89
9	S.392(MNU)-21-5-GH1-5-5-1-2-1-3	8.11	75	22	5.10	2.53	1.63	2.03
	Range	8.10 ~8.14	75~79	22~25	5.10 ~5.35	2.53 ~2.81	1.63 ~1.82	1.89 ~2.03
	Mean	8.12	77	24	5.24	2.70	1.78	1.95
	Standard deviation	1.13	1.24	1.00	0.08	0.07	0.06	0.04

2. 수량 관련 특성

시험재료의 수량 관련 특성을 조사하기 위하여 수량 관련 요소인 수수, 수당립수, 등숙율, 천립중 및 정조수량을 조사하였으며, 이들 수량 구성요소 중 가장 큰 변이를 보인 형질은 수당립수였으며 등숙율, 천립중, 수수순으로 낮았으며 재료육성을 위하여 각 시험에 사용할 종자를 계통당 2001년 56~840g, 2002년 382~1,594g을 생산하였다 (표 5, 6, 7).

1) 수수

일품벼 돌연변이 계통의 수수는 9~16개, 수원391호 돌연변이 계통은 9~14개, 수원392호 돌연변이 계통은 8~11개의 분포를 보였으며, 수원391호 돌연변이 계통의 변이 폭이 상대적으로 일품벼, 수원392호 돌연변이 계통보다 큰 편이었다.

2) 수당립수

수당립수의 분포는 일품벼 돌연변이 계통에서 56~130개, 수원391호 돌연변이 계통에서 44~127개, 수원392호 돌연변이 계통은 129~181개였으며 수수와 마찬가지로 수원391호 계통들의 변이가 상대적으로 일품벼, 수원392호 계통보다 큰 편이었으며 수당립수의 변이가 다른 수량 구성요소들 보다 큰 편으로 나타났다.

3) 등숙률

일품벼 돌연변이 계통의 등숙률 분포는 51.5~98.6%, 수원391호 돌연변이 계통은 56.5~98.9%, 수원392호 돌연변이 계통은 51.8~69.6%의 범위를 나타냈어, 일품벼와 수원391호 돌연변이 계통의 변이 폭이 수원392호 돌연변이 계통보다 컸고, 평균 등숙률도 높았다.

4) 천립중

천립중의 변이는 일품벼 돌연변이 계통에서 13.4~24.4g, 수원391호 돌연변이 계통에서 18.1~37.4g, 수원392호 돌연변이 계통에서 17.8~19.5g의 범위를 보였으며 대립종인 수원391호의 계통들이 상대적으로 일품벼나 수원392호 계통보다 더 큰 변이 폭을 나타내었다..

5) 정조수량

정조수량은 일품벼 돌연변이 계통에서 236~848kg/10a 범위에 평균 621kg/10a을, 수원391호 돌연변이 계통은 312~844kg/10a 범위에 평균 607kg/10a을, 수원392호 돌연변이 계통은 668~984kg/10a 범위에 평균 765kg/10a을 보여 수원392호 돌연변이 계통들이 정조수량의 변이 폭이 가장 작았다.

Table 3-5. Yield components and grain yield of Ilpumbyeo mutant lines.

No	Pedigree	No. of panicles / hill	No. of spikelts / panicle	Ratio of ripened grains (%)	1,000 grain weight (g)	Rough rice yield (kg)	Seed harvested weight(g)	
							2001	2002
1	Ilpum(MNU)-2-3-GH1-3-3-2-2-2-3	14	92	68.2	19.4	406	562	347
2	Ilpum(MNU)-3-2-GH1-4-4-2-2-3-3	11	102	98.6	13.4	385	490	302
3	Ilpum(MNU)-6-2-GH1-2-1-3-3-3-2	11	91	91.3	23.9	707	1,012	643
4	Ilpum(MNU)-6-2-GH1-2-5-3-1-2-1	14	90	66.2	20.1	553	1,076	664
5	Ilpum(MNU)-6-4-GH1-3-2-3-2-2-2	14	93	73.1	20.8	700	1,268	783
6	Ilpum(MNU)-8-4-GH1-2-5-1-3-2-1	11	106	65.8	21.5	741	980	605
7	Ilpum(MNU)-10-2-GH1-3-1-3-2-2-3	11	108	81.9	18.4	616	1,086	670
8	Ilpum(MNU)-11-2-GH1-2-5-2-1-3-1	12	130	69.3	18.3	644	1,062	656
9	Ilpum(MNU)-12-3-GH1-4-1-3-2-2-2	12	122	92.8	18.7	609	1,088	672
10	Ilpum(MNU)-13-4-GH1-2-4-1-2-3-3	13	88	78.0	19.1	840	1,178	727
11	Ilpum(MNU)-14-16-GH1-3-3-3-1-3-1	12	90	74.4	18.6	545	982	606
12	Ilpum(MNU)-15-4-GH1-3-5-1-2-1-1	13	77	82.4	19.8	602	1,090	673
13	Ilpum(MNU)-23-1-GH1-3-3-3-2-3-2	12	106	97.4	14.8	665	682	421
14	Ilpum(MNU)-24-2-GH1-3-1-2-3-1-3	11	108	70.0	20.0	672	876	541
15	Ilpum(MNU)-24-2-GH1-3-4-2-2-3-2	14	94	78.9	20.5	532	1,160	716
16	Ilpum(MNU)-26-1-GH1-3-3-3-3-1-3	12	75	98.5	14.2	434	382	236
17	Ilpum(MNU)-27-5-GH1-1-2-2-2-5-2	14	56	54.0	18.9	700	666	411
18	Ilpum(MNU)-28-3-GH1-2-5-3-3-2-1	12	76	60.9	18.7	627	1,202	742
19	Ilpum(MNU)-29-1-GH1-2-3-3-2-3-2	12	125	87.4	17.7	587	746	460
20	Ilpum(MNU)-30-2-GH1-5-3-3-3-2-3	11	102	68.9	17.6	721	898	554
21	Ilpum(MNU)-30-2-GH1-5-5-3-1-3-1	15	106	82.5	24.4	513	1,054	651
22	Ilpum(MNU)-31-1-GH1-2-3-2-1-1-3	12	127	93.8	15.7	595	920	568
23	Ilpum(MNU)-32-2-GH1-1-5-3-2-2-1	13	109	54.0	18.1	607	1,046	646
24	Ilpum(MNU)-33-1-GH1-2-1-3-3-1-1	12	98	56.8	18.4	540	1,096	677
25	Ilpum(MNU)-34-2-GH1-3-1-3-3-3-3	12	115	59.9	17.9	602	1,298	801
26	Ilpum(MNU)-35-4-GH1-2-2-3-2-2-2	12	107	68.3	17.5	483	1,024	632
27	Ilpum(MNU)-36-2-GH1-2-10-1-2-3-2	12	108	71.1	18.5	594	1,188	733
28	Ilpum(MNU)-36-2-GH1-2-7-3-2-3-3	12	98	80.1	22.8	560	1,104	681
29	Ilpum(MNU)-39-2-GH1-2-2-3-3-1-1	12	100	86.8	21.0	545	1,076	664
30	Ilpum(MNU)-42-3-GH1-3-1-2-1-2-1	12	107	74.2	19.3	487	754	465
31	Ilpum(MNU)-42-3-GH1-3-1-2-2-3-3	13	102	88.4	20.3	640	1,180	728
32	Ilpum(MNU)-44-2-GH1-2-2-3-2-2-3	12	129	79.3	19.7	653	938	579
33	Ilpum(MNU)-45-2-GH1-3-2-3-1-2-3	16	115	71.9	16.8	493	934	577
34	Ilpum(MNU)-47-2-GH1-2-1-3-3-2-2	12	121	90.8	20.2	573	1,108	684
35	Ilpum(MNU)-47-2-GH1-2-2-2-2-3-1	13	115	96.7	21.0	660	1,002	619

No	Pedigree	No. of panicles / hill	No. of spikelts / panicle	Ratio of ripened grains (%)	1,000 grain weight (g)	Rough rice yield (kg)	Seed harvested weight(g)	
							2001	2002
36	Ilpum(MNU)-48-2-GH1-2-2-3-1-2-1	12	126	59.3	20.8	685	600	1,110
37	Ilpum(MNU)-51-5-GH1-4-2-2-3-3-2	11	104	70.2	21.7	602	520	976
38	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-2-1-3-2-1	12	122	73.5	21.1	664	420	1,076
39	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-2-3-3-2-1	10	107	84.4	21.5	472	647	764
40	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-3-2-2-2-3	11	104	64.1	21.7	614	534	994
41	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-5-3-3-1-1	12	114	63.6	20.9	453	56	734
42	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-5-3-3-3-1	11	125	59.0	21.5	374	308	606
43	Ilpum(MNU)-56-3-GH1-2-2-2-2-1-1	9	71	62.4	18.8	511	106	828
44	Ilpum(MNU)-57-2-GH1-5-3-1-2-2-2	11	78	88.0	21.2	647	70	1,048
45	Ilpum(MNU)-58-6-GH1-7-4-2-3-3-3	12	100	69.6	21.0	774	658	1,254
46	Ilpum(MNU)-59-2-GH1-5-3-3-3-3-2	11	120	75.4	20.9	665	679	1,142
47	Ilpum(MNU)-60-1-GH1-4-5-3-2-1-3	12	108	93.4	22.7	706	609	1,144
48	Ilpum(MNU)-62-4-GH1-5-2-1-2-2-1	12	107	70.4	21.6	848	686	1,374
49	Ilpum(MNU)-63-5-GH1-4-2-1-3-2-1	14	106	71.6	20.4	681	616	1,157
50	Ilpum(MNU)-65-5-GH1-4-4-2-3-3-2	14	72	81.2	20.2	641	595	1,038
51	Ilpum(MNU)-66-6-GH1-1-1-2-2-1-3	11	72	87.4	21.1	602	588	976
52	Ilpum(MNU)-67-4-GH1-2-1-1-1-1-1	12	106	89.7	20.5	654	665	1,060
53	Ilpum(MNU)-67-4-GH1-2-3-2-2-3-1	12	104	92.3	21.7	681	595	1,104
54	Ilpum(MNU)-67-4-GH1-2-3-2-2-3-3	11	95	94.1	21.6	696	546	1,128
55	Ilpum(MNU)-68-4-GH1-4-2-2-3-2-1	13	104	87.9	21.8	627	574	1,016
56	Ilpum(MNU)-69-2-GH1-1-1-3-2-2-3	12	88	91.2	21.7	665	651	1,078
57	Ilpum(MNU)-70-1-GH1-5-4-3-1-2-2	11	122	52.8	21.7	641	607	1,038
58	Ilpum(MNU)-71-3-GH1-4-5-2-2-2-1	11	112	88.7	19.9	454	721	736
59	Ilpum(MNU)-72-4-GH1-5-4-3-3-2-3	13	80	82.3	18.6	635	580	1,028
60	Ilpum(MNU)-73-4-GH1-5-2-3-2-3-1	12	117	86.5	22.7	667	518	1,080
61	Ilpum(MNU)-75-3-GH1-1-4-3-3-3-2	13	94	72.8	20.8	683	679	1,106
62	Ilpum(MNU)-76-2-GH1-2-4-1-3-1-3	14	94	60.0	20.7	764	553	1,238
63	Ilpum(MNU)-77-3-GH1-1-3-3-2-1-3	11	129	72.3	21.0	767	660	1,242
64	Ilpum(MNU)-78-2-GH1-4-5-2-2-1-2	14	121	84.7	21.0	809	700	1,310
65	Ilpum(MNU)-80-2-GH1-4-3-3-1-3-1	13	95	51.5	18.4	483	507	782
66	Ilpum(MNU)-87-5-GH1-2-2-2-1-2-1	16	93	68.2	20.2	693	506	1,122
	Range	9～16	56～130	51.5 ～98.6	13.4 ～24.4	236 ～848	-	-
	Mean	12	103	76.7	19.9	621	-	-
	Standard deviation	1.30	16.38	12.82	2.09	123	-	-

Table 3-6. Yield components and grain yield of Suweon 391 mutant lines.

No	Pedigree	No. of panicles / hill	No. of spikelts / panicle	Ratio of ripened grains (%)	1,000 grain weight (g)	Rough rice yield (kg)	Seed harvested weight(g)	
							2001	2002
1	S.391(MNU)-41-2-GH1-5-5-3-2-2-2	10	82	56.5	33.3	494	357	800
2	S.391(MNU)-41-2-GH1-5-3-3-1-2-3	9	78	89.7	27.5	599	532	970
3	S.391(MNU)-85-1-GH1-2-4-3-2-2-3	10	87	68.8	18.1	596	310	966
4	S.391(MNU)-85-1-GH1-2-4-3-2-2-3-2	12	61	71.5	23.4	448	235	726
5	S.391(MNU)-84-2-GH1-1-5-1-3-1-3	5	54	71.1	26.0	298	912	563
6	S.391(MNU)-84-2-GH1-1-4-3-1-2-2	14	77	80.9	20.4	682	1,292	798
7	S.391(MNU)-83-2-GH1-5-4-3-2-2-1	6	90	85.9	25.9	711	1,306	806
8	S.391(MNU)-83-2-GH1-5-4-3-1-2-3	7	84	71.8	25.3	468	962	594
9	S.391(MNU)-83-2-GH1-5-5-3-3-2-5	11	82	68.3	31.3	620	1,086	670
10	S.391(MNU)-82-2-2-GH1-5-3-3-2-1	11	79	76.9	35.9	799	1,246	769
11	S.391(MNU)-82-2-GH1-5-2-3-1-3-2	12	112	71.8	37.4	535	1,214	749
12	S.391(MNU)-38-1-GH1-5-3-2-2-2-3	9	63	98.9	29.0	380	864	533
13	S.391(MNU)-38-1-GH1-5-3-2-2-2-4	11	44	63.3	34.8	387	862	532
14	S.391(MNU)-81-2-GH1-4-2-2-3-3-2	11	60	79.7	33.3	300	534	330
15	S.391(MNU)-80-2-GH1-4-2-3-3-1-1	9	85	79.5	22.1	637	1,068	659
16	S.391(MNU)-40-1-GH1-2-9-3-2-2-1	11	61	75.8	29.2	595	984	607
17	S.391(MNU)-40-1-GH1-2-6-3-2-3-2	9	61	80.7	35.5	749	1,060	654
18	S.391(MNU)-40-1-GH1-2-1-1-2-2-2	10	89	60.2	26.3	621	1,300	802
19	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-3-1-1-2-3	13	59	70.8	35.9	413	586	362
20	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-3-1-1-3-1	12	53	73.8	36.1	322	506	312
21	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-2-3-3-3-3	11	105	79.3	18.2	347	1,368	844
22	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-2-3-2-2-3	11	65	59.6	33.5	75	598	369
23	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-2-1-3-1-3	10	127	80.4	28.9	540	1,266	781
24	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-1-1-3-3-3	13	78	64.2	33.9	687	1,140	704
	Distribition	9~14	44~127	56.5 ~98.9	18.1 ~37.4	312 ~844	-	-
	Mean	10	77	74.1	29.2	607	-	-
	Standard deviation	2.14	19.78	9.90	5.93	161	-	-

Table 3-7. Yield components and grain yield of Suweon 392 mutant lines.

No	Pedigree	No. of panicles / hill	No. of spikelts / panicle	Ratio of ripened grains (%)	1,000 grain weight (g)	Rough rice yield (kg)	Seed harvested weight(g)	
							2001	2002
1	S.392(MNU)-21-5-GH1-5-5-1-2-1-3	10	82	56.5	33.3	494	357	800
2	S.392(MNU)-21-5-GH1-5-2-3-3-2-1	9	78	89.7	27.5	599	532	970
3	S.392(MNU)-20-4-GH1-5-3-2-2-2-1	10	87	68.8	18.1	596	310	966
4	S.392(MNU)-20-4-GH1-5-1-2-2-3-3	12	61	71.5	23.4	448	235	726
5	S.392(MNU)-19-3-GH1-5-5-2-2-1-2	5	54	71.1	26.0	298	912	563
6	S.392(MNU)-19-3-GH1-5-4-3-2-2-2	14	77	80.9	20.4	682	1,292	798
7	S.392(MNU)-18-2-GH1-3-5-2-2-2-2	6	90	85.9	25.9	711	1,306	806
8	S.392(MNU)-18-2-GH1-3-1-3-2-2-3	7	84	71.8	25.3	468	962	594
9	S.392(MNU)-17-3-GH1-5-3-3-3-1-2	11	82	68.3	31.3	620	1,086	670
	Range	8~11	129~181	51.8 ~69.6	17.8 ~19.5	668 ~984	-	-
	Mean	9	158	60.6	18.4	765	-	-
	Standard deviation	1.12	14.66	5.56	0.53	94	-	-

3. 주요 이화학적 특성

시험재료의 주요 이화학적 특성은 배유 형태, 아밀로스함량, 호화온도, 단백질함량, 호화점도특성을 조사하였다(표 8, 9, 10, 11, 12, 13).

1) 배유형태

벼의 수정란에 돌연변이 유기 화학물질인 MNU를 처리하면 다양한 배유의 전분 형태를 가진 돌연변이체를 유기할 수 있는데 본 시험에서 이용한 일품벼 돌연변이 계통은 전분의 형태가 원품종과 같은 메벼는 40계통, 중간찰(*dull*) 6, 거대배(*ge*) 7, 뽀얀메(*op*) 7, 당질(*su*) 4 계통이었고, 수원391호는 원품종과 같은 메벼는 16계통, 중간찰(*dull*) 3, 분상질(*flo*) 5 계통이었으며, 수원392호는 8계통 모두 중간찰(*dull*) 계통이었다.

2) 아밀로스함량

아밀로스 함량은 일품벼 돌연변이 계통에서 7.5~25.5%, 수원391호 돌연변이 계통은 11.9~25.2%, 모두 중간찰 특성을 나타낸 수원392호 돌연변이 계통은 9.6~13.8%의 범위를 나타냈다.

3) 알카리붕괴도

일품벼 돌연변이 계통의 알카리붕괴도는 2.0~6.0, 수원391호 돌연변이 계통은 1.0~

5.5, 수원392호 돌연변이 계통은 모두 7.0을 나타냈다.

4) 단백질함량

백미 단백질 함량은 일품벼 돌연변이 계통에서 5.9±0.88%, 수원391호 돌연변이 계통은 7.5±1.06%, 수원392호 돌연변이 계통은 7.4±0.26%의 평균 및 변이를 보였으며 수원391호 돌연변이 계통들이 일품벼, 수원392호 계통보다 큰 함량 변이를 보였다.

5) 호화점도특성

호화점도특성은 호화개시온도, 최고점도, 최저점도, 강하점도, 치반점도를 조사하였는데 일품벼 돌연변이 계통에서 각각 65.5~87.7℃, 44~285, 32~149, 67~242, 12~138, -103~36RVU, 수원391호 후대계통에서 각각 56.4~72.4℃, 102~274, 45~101, 67~199, 36~218, 183~40RVU, 수원392호 돌연변이 계통에서 71.4~73.9℃, 204~269, 72~87, 101~197, 130~183, -63~149RVU의 범위의 변이를 보여 배유의 형태가 모두 중간찰인 수원392호 돌연변이 계통 보다 일품벼, 수원391호 돌연변이 계통의 호화점도 특성의 변이가 더 큰 경향을 보였다.

Table 3-8. Grain appearance and quality characteristics of Ilpumbyeo mutant lines.

No	Pedigree	Grain appearance	Amylose content (%)	ADV (1~7)	Protein content (%)
1	Ilpum(MNU)-3-2-GH1-4-4-2-2-3-3	*su*	19.3	5.0	6.2
2	Ilpum(MNU)-6-2-GH1-2-1-3-3-3-2	non-wax	19.8	4.0	5.6
3	Ilpum(MNU)-6-2-GH1-2-5-3-1-2-1	non-wax	21.6	5.0	5.7
4	Ilpum(MNU)-6-4-GH1-3-2-3-2-2-2	non-wax	20.0	4.0	5.3
5	Ilpum(MNU)-8-4-GH1-2-5-1-3-2-1	non-wax	21.3	5.0	5.1
6	Ilpum(MNU)-10-2-GH1-3-1-3-2-2-3	*dull*	11.0	3.5	5.9
7	Ilpum(MNU)-11-2-GH1-2-5-2-1-3-1	*dull*	11.2	4.0	5.8
8	Ilpum(MNU)-12-3-GH1-4-1-3-2-2-2	*dull*	12.6	4.0	6.4
9	Ilpum(MNU)-13-4-GH1-2-4-1-2-3-3	*dull*	12.5	4.0	6.5
10	Ilpum(MNU)-14-16-GH1-3-3-3-1-3-1	*dull*	11.0	4.0	6.3
11	Ilpum(MNU)-15-4-GH1-3-5-1-2-1-1	*dull*	7.5	3.2	5.3
12	Ilpum(MNU)-23-1-GH1-3-3-3-2-3-2	*su*	18.2	5.0	5.4
13	Ilpum(MNU)-24-2-GH1-3-1-2-3-1-3	*op*	21.4	3.0	4.6
14	Ilpum(MNU)-24-2-GH1-3-4-2-2-3-2	*op*	21.2	3.0	4.6
15	Ilpum(MNU)-26-1-GH1-3-3-3-3-1-3	*su*	18.9	3.8	7.4
16	Ilpum(MNU)-27-5-GH1-1-2-2-2-5-2	*ge*	12.6	5.0	7.9
17	Ilpum(MNU)-28-3-GH1-2-5-3-3-2-1	*op*	20.2	5.0	4.7
18	Ilpum(MNU)-29-1-GH1-2-3-3-2-3-2	*op*	20.1	2.0	6.1
19	Ilpum(MNU)-30-2-GH1-5-3-3-3-2-3	non-wax	12.1	5.0	5.2
20	Ilpum(MNU)-30-2-GH1-5-5-3-1-3-1	non-wax	20.5	4.8	5.1
21	Ilpum(MNU)-31-1-GH1-2-3-2-1-1-3	*su*	21.7	5.5	6.8
22	Ilpum(MNU)-32-2-GH1-1-5-3-2-2-1	*ge*	23.9	4.0	5.5
23	Ilpum(MNU)-33-1-GH1-2-1-3-3-1-1	*ge*	25.2	5.8	8.1
24	Ilpum(MNU)-34-2-GH1-3-1-3-3-3-3	*ge*	19.6	6.0	5.3
25	Ilpum(MNU)-35-4-GH1-2-2-3-2-2-2	*ge*	23.0	6.0	5.0
26	Ilpum(MNU)-36-2-GH1-2-10-1-2-3-2	*ge*	18.6	4.0	5.5
27	Ilpum(MNU)-36-2-GH1-2-7-3-2-3-3	*ge*	19.8	4.0	5.3
28	Ilpum(MNU)-39-2-GH1-2-2-3-3-1-1	non-wax	21.5	4.0	6.4
29	Ilpum(MNU)-42-3-GH1-3-1-2-1-2-1	*op*	19.1	4.0	5.4
30	Ilpum(MNU)-42-3-GH1-3-1-2-2-3-3	non-wax	21.7	5.0	5.5
31	Ilpum(MNU)-44-2-GH1-2-2-3-2-2-3	*op*	20.0	4.8	5.1
32	Ilpum(MNU)-45-2-GH1-3-2-3-1-2-3	non-wax	21.1	5.0	5.3
33	Ilpum(MNU)-47-2-GH1-2-1-3-3-2-2	non-wax	20.4	4.5	5.6
34	Ilpum(MNU)-47-2-GH1-2-2-2-2-3-1	non-wax	20.3	4.5	5.6
35	Ilpum(MNU)-48-2-GH1-2-2-3-1-2-1	non-wax	15.9	5.0	4.9

No	Pedigree	Grain appearance	Amylose content (%)	ADV (1~7)	Protein content (%)
36	Ilpum(MNU)-51-5-GH1-4-2-2-3-3-2	non-wax	21.5	4.8	7.4
37	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-2-1-3-2-1	non-wax	21.7	4.0	5.0
38	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-2-3-3-2-1	non-wax	22.2	4.0	5.0
39	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-3-2-2-2-3	non-wax	20.2	5.0	5.3
40	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-5-3-3-1-1	non-wax	23.3	4.0	5.1
41	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-5-3-3-3-1	non-wax	19.0	5.0	5.2
42	Ilpum(MNU)-56-3-GH1-2-2-2-2-1-1	non-wax	25.5	5.0	6.1
43	Ilpum(MNU)-57-2-GH1-5-3-1-2-2-2	non-wax	19.0	4.0	5.7
44	Ilpum(MNU)-58-6-GH1-7-4-2-3-3-3	non-wax	17.4	5.0	4.7
45	Ilpum(MNU)-59-2-GH1-5-3-3-3-3-2	non-wax	21.2	5.0	4.7
46	Ilpum(MNU)-60-1-GH1-4-5-3-2-1-3	non-wax	10.5	5.0	5.2
47	Ilpum(MNU)-62-4-GH1-5-2-1-2-2-1	non-wax	20.8	5.0	4.9
48	Ilpum(MNU)-63-5-GH1-4-2-1-3-2-1	non-wax	20.2	5.0	5.1
49	Ilpum(MNU)-65-5-GH1-4-4-2-3-3-2	non-wax	20.4	5.0	6.3
50	Ilpum(MNU)-66-6-GH1-1-1-2-2-1-3	non-wax	18.2	5.0	7.3
51	Ilpum(MNU)-67-4-GH1-2-1-1-1-1-1	non-wax	20.9	5.0	7.4
52	Ilpum(MNU)-67-4-GH1-2-3-2-2-3-1	non-wax	18.7	5.0	6.8
53	Ilpum(MNU)-67-4-GH1-2-3-2-2-3-3	non-wax	18.3	5.0	7.2
54	Ilpum(MNU)-68-4-GH1-4-2-2-3-2-1	non-wax	18.0	5.0	6.9
55	Ilpum(MNU)-69-2-GH1-1-1-3-2-2-3	non-wax	20.7	5.0	7.1
56	Ilpum(MNU)-70-1-GH1-5-4-3-1-2-2	non-wax	20.4	4.0	7.2
57	Ilpum(MNU)-71-3-GH1-4-5-2-2-2-1	non-wax	18.8	5.0	7.0
58	Ilpum(MNU)-72-4-GH1-5-4-3-3-2-3	non-wax	21.6	4.0	6.4
59	Ilpum(MNU)-73-4-GH1-5-2-3-2-3-1	non-wax	21.1	4.0	6.5
60	Ilpum(MNU)-75-3-GH1-1-4-3-3-3-2	non-wax	19.1	4.0	6.3
61	Ilpum(MNU)-76-2-GH1-2-4-1-3-1-3	non-wax	18.8	4.0	5.9
62	Ilpum(MNU)-77-3-GH1-1-3-3-2-1-3	non-wax	17.9	4.0	6.2
63	Ilpum(MNU)-78-2-GH1-4-5-2-2-1-2	non-wax	19.6	4.0	5.9
64	Ilpum(MNU)-80-2-GH1-4-3-3-1-3-1	*op*	18.5	3.5	5.3
-	Ilpumbyeo	non-wax	19.5	5.0	5.2
	Range	-	7.5~25.5	2.0~6.0	4.6~8.1
	Mean	-	19.0	4.5	5.9
	Standard deviation	-	3.65	0.74	0.88

ADV : alkali digestion value(1~7)

Table 3-9. Endosperm and grain quality characteristics of Suweon 391 mutant lines.

No	Pedigree	Endosperm characteristics	Amylose content (%)	ADV (1~7)	Protein content (%)
1	S.391(MNU)-41-2-GH1-5-5-3-2-2-2	*dull*	12.9	2.0	8.2
2	S.391(MNU)-41-2-GH1-5-3-3-1-2-3	*flo*	19.2	3.0	8.2
3	S.391(MNU)-85-1-GH1-2-4-3-2-2-3	*flo*	16.8	3.0	7.7
4	S.391(MNU)-85-1-GH1-2-4-3-2-2-3-2	non-wax	16.4	5.0	7.2
5	S.391(MNU)-84-2-GH1-1-5-1-3-1-3	non-wax	21.0	4.0	7.4
6	S.391(MNU)-84-2-GH1-1-4-3-1-2-2	non-wax	25.2	4.0	7.1
7	S.391(MNU)-83-2-GH1-5-4-3-2-2-1	non-wax	22.3	3.0	8.3
8	S.391(MNU)-83-2-GH1-5-4-3-1-2-3	non-wax	19.8	5.0	7.1
9	S.391(MNU)-83-2-GH1-5-5-3-3-2-5	non-wax	20.7	5.0	7.3
10	S.391(MNU)-82-2-2-GH1-5-3-3-2-1	*dull*	13.1	3.0	7.1
11	S.391(MNU)-82-2-GH1-5-2-3-1-3-2	non-wax	21.6	5.5	7.8
12	S.391(MNU)-38-1-GH1-5-3-2-2-2-3	non-wax	21.2	5.0	8.9
13	S.391(MNU)-38-1-GH1-5-3-2-2-2-4	non-wax	17.9	4.0	8.9
14	S.391(MNU)-81-2-GH1-4-2-2-3-3-2	non-wax	21.0	4.0	5.3
15	S.391(MNU)-80-2-GH1-4-2-3-3-1-1	non-wax	19.3	4.0	7.5
16	S.391(MNU)-40-1-GH1-2-9-3-2-2-1	non-wax	18.5	4.0	5.7
17	S.391(MNU)-40-1-GH1-2-6-3-2-3-2	non-wax	19.4	4.0	7.5
18	S.391(MNU)-40-1-GH1-2-1-1-2-2-2	non-wax	12.2	1.0	7.6
19	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-3-1-1-2-3	*flo*	20.4	2.0	8.3
20	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-3-1-1-3-1	*flo*	21.1	2.0	9.1
21	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-2-3-3-3-3	non-wax	21.1	5.2	5.7
22	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-2-3-2-2-3	*flo*	20.9	2.0	8.8
23	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-2-1-3-1-3	non-wax	20.8	4.0	6.0
24	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-1-1-3-3-3	*dull*	11.9	4.3	6.5
-	Suweon 391	non-wax	22.5	4.0	7.7
	Range	-	11.9~25.2	1.0~5.5	5.3~9.1
	Mean	-	18.9	3.7	7.5
	Standard deviation	-	3.44	1.22	1.06

Table 3-10. Endosperm and grain quality characteristics of Suweon 392 mutant lines.

No	Pedigree	Endosperm characteristics	Amylose content (%)	ADV (1~7)	Protein content (%)
1	S.392(MNU)-21-5-GH1-5-2-3-3-2-1	*dull*	11.5	7.0	6.9
2	S.392(MNU)-20-4-GH1-5-3-2-2-2-1	*dull*	10.8	7.0	7.5
3	S.392(MNU)-20-4-GH1-5-1-2-2-3-3	*dull*	9.6	7.0	7.1
4	S.392(MNU)-19-3-GH1-5-5-2-2-1-2	*dull*	11.6	7.0	7.5
5	S.392(MNU)-19-3-GH1-5-4-3-2-2-2	*dull*	12.4	7.0	7.4
6	S.392(MNU)-18-2-GH1-3-5-2-2-2-2	*dull*	10.7	7.0	7.3
7	S.392(MNU)-18-2-GH1-3-1-3-2-2-3	*dull*	13.8	7.0	7.7
8	S.392(MNU)-17-3-GH1-5-3-3-3-1-2	*dull*	12.7	7.0	7.5
	Suweon 392	non-wax	17.3	7.0	6.7
	Range	-	9.6~13.8	7.0~7.0	6.9~7.7
	Mean	-	11.6	7.0	7.4
	Standard deviation	-	1.32	0.00	0.26

Table 3-11. Viscogram characteristics of Ilpumbyeo mutant lines.

No	Pedigree	Gelatinization initiation temperature (℃)	Peak viscocity (RVU)	Hot viscocity (RVU)	Cool viscocity (RVU)	Break down viscocity (RVU)	Setback viscocity (RVU)
1	Ilpum(MNU)-3-2-GH1-4-4-2-2-3-3	87.7	44	32	80	12	36
2	Ilpum(MNU)-6-2-GH1-2-1-3-3-3-2	72.5	211	105	200	106	-11
3	Ilpum(MNU)-6-2-GH1-2-5-3-1-2-1	66.3	190	91	174	99	-16
4	Ilpum(MNU)-6-4-GH1-3-2-3-2-2-2	66.8	212	94	182	118	-30
5	Ilpum(MNU)-8-4-GH1-2-5-1-3-2-1	78.2	187	113	207	74	20
6	Ilpum(MNU)-10-2-GH1-3-1-3-2-2-3	68.1	201	69	102	132	-100
7	Ilpum(MNU)-11-2-GH1-2-5-2-1-3-1	68.4	207	72	105	135	-102
8	Ilpum(MNU)-12-3-GH1-4-1-3-2-2-2	67.5	214	76	111	138	-103
9	Ilpum(MNU)-13-4-GH1-2-4-1-2-3-3	67.5	215	82	118	133	-96
10	Ilpum(MNU)-14-16-GH1-3-3-3-1-3-1	68.4	199	70	103	130	-97
11	Ilpum(MNU)-15-4-GH1-3-5-1-2-1-1	69.1	102	51	68	51	-34
12	Ilpum(MNU)-23-1-GH1-3-3-3-2-3-2	66.7	115	63	125	52	10
13	Ilpum(MNU)-24-2-GH1-3-1-2-3-1-3	68.2	153	79	165	74	12
14	Ilpum(MNU)-24-2-GH1-3-4-2-2-3-2	69.1	207	114	216	93	9
15	Ilpum(MNU)-26-1-GH1-3-3-3-3-1-3	68.3	44	32	80	12	36
16	Ilpum(MNU)-27-5-GH1-1-2-2-2-5-2	69.4	197	106	202	91	5
17	Ilpum(MNU)-28-3-GH1-2-5-3-3-2-1	66.3	90	51	100	39	10
18	Ilpum(MNU)-29-1-GH1-2-3-3-2-3-2	72.1	200	96	153	104	-47
19	Ilpum(MNU)-30-2-GH1-5-3-3-3-2-3	67.5	185	89	146	96	-39
20	Ilpum(MNU)-30-2-GH1-5-5-3-1-3-1	65.6	139	90	154	49	15
21	Ilpum(MNU)-31-1-GH1-2-3-2-1-1-3	72.2	193	92	156	102	-37
22	Ilpum(MNU)-32-2-GH1-1-5-3-2-2-1	67.7	116	66	120	50	3
23	Ilpum(MNU)-33-1-GH1-2-1-3-3-1-1	67.6	112	64	118	48	6
24	Ilpum(MNU)-34-2-GH1-3-1-3-3-3-3	66.6	137	68	113	70	-25
25	Ilpum(MNU)-35-4-GH1-2-2-3-2-2-2	67.5	117	79	138	38	21
26	Ilpum(MNU)-36-2-GH1-2-10-1-2-3-2	66.2	123	57	67	67	-28
27	Ilpum(MNU)-36-2-GH1-2-7-3-2-3-3	66.5	135	59	96	75	-39
28	Ilpum(MNU)-39-2-GH1-2-2-3-3-1-1	70.9	83	45	92	39	9
29	Ilpum(MNU)-42-3-GH1-3-1-2-1-2-1	70.1	208	116	190	92	-18
30	Ilpum(MNU)-42-3-GH1-3-1-2-2-3-3	68.9	285	149	242	136	-42
31	Ilpum(MNU)-44-2-GH1-2-2-3-2-2-3	70.9	216	121	227	95	11
32	Ilpum(MNU)-45-2-GH1-3-2-3-1-2-3	69.8	208	106	191	102	-17
33	Ilpum(MNU)-47-2-GH1-2-1-3-3-2-2	75.9	124	67	123	57	-1
34	Ilpum(MNU)-47-2-GH1-2-2-2-2-3-1	65.5	147	79	140	68	-7
35	Ilpum(MNU)-48-2-GH1-2-2-3-1-2-1	68.9	201	101	188	100	-13

No	Pedigree	Gelatinization initiation temperature (℃)	Peak viscocity (RVU)	Hot viscocity (RVU)	Cool viscocity (RVU)	Break down viscocity (RVU)	Setback viscocity (RVU)
36	Ilpum(MNU)-51-5-GH1-4-2-2-3-3-2	67.7	115	89	143	26	28
37	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-2-1-3-2-1	67.9	120	80	143	39	23
38	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-2-3-3-2-1	65.8	128	79	145	50	17
39	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-3-2-2-2-3	67.4	176	84	167	92	-9
40	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-5-3-3-1-1	68.4	122	81	143	40	21
41	Ilpum(MNU)-55-2-GH1-2-5-3-3-3-1	66.1	171	87	171	84	0
42	Ilpum(MNU)-56-3-GH1-2-2-2-2-1-1	68.2	182	95	181	87	-1
43	Ilpum(MNU)-57-2-GH1-5-3-1-2-2-2	69.0	192	86	172	106	-20
44	Ilpum(MNU)-58-6-GH1-7-4-2-3-3-3	71.4	180	102	191	78	11
45	Ilpum(MNU)-59-2-GH1-5-3-3-3-3-2	70.7	199	96	184	103	-15
46	Ilpum(MNU)-60-1-GH1-4-5-3-2-1-3	70.6	232	122	218	110	-14
47	Ilpum(MNU)-62-4-GH1-5-2-1-2-2-1	69.0	212	117	208	95	-4
48	Ilpum(MNU)-63-5-GH1-4-2-1-3-2-1	68.2	198	99	184	99	-14
49	Ilpum(MNU)-65-5-GH1-4-4-2-3-3-2	72.4	199	102	192	97	-7
50	Ilpum(MNU)-66-6-GH1-1-1-2-2-1-3	68.2	177	91	181	86	4
51	Ilpum(MNU)-67-4-GH1-2-1-1-1-1-1	68.2	172	90	180	82	8
52	Ilpum(MNU)-67-4-GH1-2-3-2-2-3-1	70.6	213	100	184	113	-29
53	Ilpum(MNU)-67-4-GH1-2-3-2-2-3-3	71.4	226	109	199	117	-27
54	Ilpum(MNU)-68-4-GH1-4-2-2-3-2-1	69.0	197	98	188	99	-9
55	Ilpum(MNU)-69-2-GH1-1-1-3-2-2-3	69.0	198	92	177	106	-21
56	Ilpum(MNU)-70-1-GH1-5-4-3-1-2-2	70.7	194	104	192	90	-2
57	Ilpum(MNU)-71-3-GH1-4-5-2-2-2-1	71.2	168	93	183	75	15
58	Ilpum(MNU)-72-4-GH1-5-4-3-3-2-3	71.4	211	95	180	116	-31
59	Ilpum(MNU)-73-4-GH1-5-2-3-2-3-1	72.3	201	97	186	104	-15
60	Ilpum(MNU)-75-3-GH1-1-4-3-3-3-2	69.9	188	99	177	89	-11
61	Ilpum(MNU)-76-2-GH1-2-4-1-3-1-3	67.3	191	104	193	87	2
62	Ilpum(MNU)-77-3-GH1-1-3-3-2-1-3	69.8	185	101	191	84	6
63	Ilpum(MNU)-78-2-GH1-4-5-2-2-1-2	70.8	192	92	173	100	-19
64	Ilpum(MNU)-80-2-GH1-4-3-3-1-3-1	70.9	83	45	92	39	9
-	Ilpumbyeo	68.5	142	86	160	56	17
	Range	65.5~87.7	44~285	32~149	67~242	12~138	-103~36
	Mean	69.4	171	87	158	84	-13
	Standard deviation	3.31	47.52	22.18	42.32	30.83	32.00

Table 3-12. Viscogram characteristics of Suweon 391 mutant lines.

No	Pedigree	Gelatinization initiation temperature (℃)	Peak viscocity (RVU)	Hot viscocity (RVU)	Cool viscocity (RVU)	Break down viscocity (RVU)	Setback viscocity (RVU)
1	S.391(MNU)-41-2-GH1-5-5-3-2-2-2	72.2	149	48	78	101	-71
2	S.391(MNU)-41-2-GH1-5-3-3-1-2-3	72.4	127	54	117	73	-10
3	S.391(MNU)-85-1-GH1-2-4-3-2-2-3	68.3	145	69	143	76	-2
4	S.391(MNU)-85-1-GH1-2-4-3-2-2-3-2	68.6	174	80	165	94	-9
5	S.391(MNU)-84-2-GH1-1-5-1-3-1-3	69.0	167	85	174	82	7
6	S.391(MNU)-84-2-GH1-1-4-3-1-2-2	67.9	109	73	135	36	26
7	S.391(MNU)-83-2-GH1-5-4-3-2-2-1	68.2	181	95	199	86	18
8	S.391(MNU)-83-2-GH1-5-4-3-1-2-3	70.7	137	80	177	57	40
9	S.391(MNU)-83-2-GH1-5-5-3-3-2-5	70.6	182	80	183	102	1
10	S.391(MNU)-82-2-2-GH1-5-3-3-2-1	70.5	127	45	67	82	-60
11	S.391(MNU)-82-2-GH1-5-2-3-1-3-2	60.9	192	97	197	95	5
12	S.391(MNU)-38-1-GH1-5-3-2-2-2-3	64.2	161	89	175	72	14
13	S.391(MNU)-38-1-GH1-5-3-2-2-2-4	70.7	119	54	117	65	-2
14	S.391(MNU)-81-2-GH1-4-2-2-3-3-2	56.4	274	56	91	218	-183
15	S.391(MNU)-80-2-GH1-4-2-3-3-1-1	69.8	181	93	171	88	-10
16	S.391(MNU)-40-1-GH1-2-9-3-2-2-1	69.2	163	79	165	84	2
17	S.391(MNU)-40-1-GH1-2-6-3-2-3-2	71.7	194	101	196	93	2
18	S.391(MNU)-40-1-GH1-2-1-1-2-2-2	72.2	231	77	115	154	-116
19	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-3-1-1-2-3	70.2	103	52	108	51	5
20	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-3-1-1-3-1	71.4	105	51	108	54	3
21	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-2-3-3-3-3	67.6	142	76	144	66	2
22	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-2-3-2-2-3	71.4	102	50	107	52	5
23	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-2-1-3-1-3	69.0	180	90	176	90	-4
24	S.391(MNU)-39-2-GH1-2-1-1-3-3-3	69.9	144	47	72	97	-72
-	Suweon 391	66.5	117	67	129	50	13
	Range	56.4~72.4	102~274	45~101	67~199	36~218	-183~40
	Mean	68.9	158	72	141	86	-17
	Standard deviation	3.71	41.54	18.26	41.72	36.68	49.80

Table 3-13. Viscogram characteristics of Suweon 392 mutant lines.

No	Pedigree	Gelatinization initiation temperature (℃)	Peak viscocity (RVU)	Hot viscocity (RVU)	Cool viscocity (RVU)	Break down viscocity (RVU)	Setback viscocity (RVU)
1	S.392(MNU)-21-5-GH1-5-2-3-3-2-1	71.4	212	77	108	135	-104
2	S.392(MNU)-20-4-GH1-5-3-2-2-2-1	73.2	204	74	105	130	-99
3	S.392(MNU)-20-4-GH1-5-1-2-2-3-3	72.9	210	78	107	132	-103
4	S.392(MNU)-19-3-GH1-5-5-2-2-1-2	73.9	206	73	102	133	-104
5	S.392(MNU)-19-3-GH1-5-4-3-2-2-2	73.9	205	72	101	133	-104
6	S.392(MNU)-18-2-GH1-3-5-2-2-2-2	73.7	260	87	123	173	-137
7	S.392(MNU)-18-2-GH1-3-1-3-2-2-3	73.9	260	87	197	173	-63
8	S.392(MNU)-17-3-GH1-5-3-3-3-1-2	73.9	269	86	120	183	-149
-	Suweon 392	2.1	148	69	117	79	-31
	Range	71.4~73.9	204~269	72~87	101~197	130~183	-63~-149
	Mean	73.4	228	79	120	149	-108
	Standard deviation	0.88	29.03	6.45	31.98	22.88	25.91

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

Sink-Source 관련 조절유전자 발현분석 및 형질전환 벼 개발을 위하여 본 연구진은 전분 대사과정 중 UTP와 glucose-1-phosphate로부터 UDP-glucose를 합성하는 효소인 UGPase를 벼의 sink 기관과 source 기관에 과량 발현시켜 sink-source 조절 기작을 규명하고 벼의 광합성 산물을 수확량 증대 쪽으로 분배하여 다수확 품종을 육성하고자 벼의 수확량 증대를 목적으로 대장균으로부터 이를 분리하고 벼 sink 기관 특이적 발현을 위하여 sbe promoter와 globulin promoter를 *ugp*와 각각 연결시켜서 벼 형질전환용 운반체 *Glb::ugp, Sbe::ugp*를 제작하였으며, source 기관 특이적 발현을 위하여 rbcS promoter와 *ugp*를 연결시켜서 벼 형질전환용 운반체 *Rbc::ugp*를 제작하였다. 각 운반체를 *Agrobactium*을 이용하여 벼에 형질 전환시켜서 *Glb::ugp, Sbe::ugp*, 그리고 *Rbc::ugp* 각각 21 개체, 6개체, 그리고 6개체의 형질전환체를 얻었고, 이들 개체 모두 제초제 저항성 검정을 통해 모두 저항성을 나타남을 확인하였다. Genomic Southern blot 분석을 통해 형질전환 벼 식물체 내에 *ugp* 유전자의 도입 확인하였다. Source 기관으로의 발현을 위한 Rbc::ugp 형질전환에서의 Northern blot 분석 결과 잎조직에서의 높은 발현이 확인되었으며 sink 기관에서의 발현을 위한 *Sbe::ugp, Glb::ugp* 형질전환체에서는 *Sbe::ugp* 에서는 잎 조직에서 낮은 수준의 발현이 확인되었으며 *Glb::ugp*에서는 발현되지 않음을 확인하였으나 sink 기관에서의 발현 분석은 sink 기관의 특성과 벼의 작물상 특성으로 sample 획득에 어려움으로 인해 현재 진행중에 있다..

이에 Source 기관에서의 발현이 확인된 Rbc::ugp 형질전환체를 이용하여 벼 내에서 ugpase의 발현에 따른 기타 관련 유전자의 변이를 보기 위하여 DNA chip 분석을 실시하였다. 지금까지의 국내외 DNA chip연구는 cDNA를 중심으로 이루워져 왔으나, 유전자원 확보의 어려움으로 다양한 정보의 획득에 제한이 있었다. 본 연구진이 Rice cDNA sequecing 을 통해 다수의 유전자들을 확보하였으나 생명정보학의 기법을 이용하여 uni-gene을 선발한 결과 약 3000개 정도에 지나지 않음을 확인하였다 이에 벼 전체 유전체에서의 유전자 발현을 관찰하기 위해 주)그린진 바이오텍에서 벼 전체 유전자 chip인 60,000개의 유전자의 정보가 담긴 oligonucleotide chip을 분양받아 이를 이용하여 유전자 발현 양상을 비교하였고, 그 결과의 E.coli UGPase 유전자가 과량 발현 되는 형질전환체에서 비 형질전환체보다 406 종의 유전자가 2배 이상 발현이 증가되었음을 확인하였고, 반면에 1184 종의 유전자가 발현이 감소함을 확인하

였다. 또한, 생산성 관련 유전자 탐색을 위하여 작물시험장으로 부터 다수확성 품종인 다산 품종을 분양받아 일품벼와의 유전자 발현 분석을 실시하여 다수의 생산성관련 유전자를 분리하였고, 이를 생명정보학 기법을 이용하여 지금까지 알려진 유전정보와 비교 분석하여 유전자 분석을 실시하였다. 이번 연구를 통해 아직까지 초기 단계에 있는 DNA chip 연구에 있어서 cDNA labeling 기법의 확립과 DNA chip 해석 능력 증진을 통해 기능적 유전체 연구의 연구 기법을 확립하는데 많은 도움을 주었다. 한편, 기능적 유전체 연구의 발달과 더불어 다량의 생물학 정보들을 분석하기 위한 생명정보학의 연구 발전에도 많은 기여를 했다.

제 5 장 참고문헌

Robson, P. R. H.., McCormac, A. C., Irvine, A. S., and Smith, H. (1996) Genetic engineering of harvest index in tobacco through overexpression of a phytochrome gene. Biotechnology 14, 995-998.

Sambrook, J., E. F. Tritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory mannual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory press.

Adam, E., Kozma-Bognar, L., Kolar, C., Schafer, E. and Nagy, F. (1996) *Plant Physiol.* 110, 1081 - 1088

Botto, J. F., Sanchez, R. A., Whitelam, G. C. and Casal, J. J. (1996) *Plant Physiol.* 110, 439 - 444

Clough, R. C., Casal, J. J., Jordan, E. T., Christou, P. and Vierstra, R. D. (1995) *Plant Physiol.* 109, 1039 - 1045

Emmler, K., Kretsch, T. and Schafer, E. (1996) *Planta* 199, 50 - 56

Izawa, T. and Shimamoto, K. (1996) Trens in Plant Science 1, 95 - 99

Parks, B. M., Quail, P. H. and Hangarter, R. P. (1996) *Plant Physiol.* 110, 155 - 162

Quail, P. H., Boylan, M. T., Parks, B. M., Short, T. W., Xu, Y. and Wagner, D. (1995) *Science* 268, 675 - 680

Yanovsky, M. J., Casal, J. J. and Whitelam, G. C. (1995) *Plant Cell and Environment* 18, 788 - 794

Asoka, M., Okuno, K., Sugimoto, Y., Kawakami, J. and Fuwa, H.(1984). Effect of environmental temperature during development of rice lants on some properties of endosperm starch. Starch, 36, 189

Beck, E. and Ziegler, P.(1989). Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 40, 95

Bollich, C.N. and Webb, B.D.(1973) Inheritance of amylose in two hybrid populations of rice. Cereal Chem., 50, 631

Heu, M.H. and Park, S.Z. (1976 a). Dosage Effect of Wx Allele on the Amylose content of rice grain. 1. Amylose content of Hybrid seeds obtained from isogenic lines for glutinous and base color. Korean J. Breeding,8, 48.

Heu, M.H. and Park, S.Z. (1976 b). Dosage Effect of Wx Allele on the Amylose content of rice grain. II. Amylose content of Hybrid seeds obtained from male sterile stock. Seoul Natl. Univ. Coll. Agric. Bull. 1, 39.

Juliano, B.O., Bautista, G. M., Lugay, J.C., Reyes, A.C.(1964). Studies on the physicochemical properties of rice. J. Agric. Food Chem. 12, 131.

Juliano, B.O., Onate, L.U., del Mundo, A.M. (1965). Relation of starch composition, protein content, and gelatinization temperature to cooking and eating qualities of milled rice. Food Technol.19, 1006.

Korstee, A.J., Vermeesch A.M.S. de Vries, B.J. Jacobsen E. and R. G. F. Visser (1996) Expression of E. coli branching enzyme in tubers of amylose-free transgenic potato leads to an increased branching degree of the amylopectin. The Plant Journal, 10 (1), 83-90

Kumar, I and Khush, G.S. (1986). Gene dosage effects of amylose content in rice endosperm. Japan J. Genet. 61, 559

Kumar, I and Khush, G.S. (1987). Genetic Analysis of waxy locus in rice (Oryzae sativa L.). Theor. Appl. Genet. 73, 481

Mckenzie, K.S. and Rutger, J.N.(1983). Genetic analysis of amylose content, alkali spreading score, and grain dimension in rice. Crop Sci. 23, 306

Nahm, B.H., Kim, J.K. and Choi, H.C.(1993b) The Identification and purification of Waxy protein involved in biosynthesis of amylose in rice. J. Kor. Agr. Chem. Soc. 36, 533-538

Nakamura, Y. and Yanmaouchi, H.(1992) Nucleotide sequence of a cDNA encoding Starch-branching enzyme or Q-enayme I from rice endosperm. Plant Physiol., 99, 1265-1266.

Okuno, K. (1978). Gene Dosage Effect of of waxy alleles on amylose content in endosperm starch of rice. Japan J. Genet. 53, 219.

Okuno, K., Fuwa, H., Yano, M.(1983). A new mutantant gene lowering amylose content in endosperm starch of rice. Japan J. Breed, 33, 387.

Resurreccion, A.P., Hara, T, Juliano , B.O. and Yoshida, S. (1977). Effect of termperature during ripening of grain quality of rice. Soil Sci. Plant Nutr., 23, 109.

Sano, Y.(1984). Differential regulation of waxy gene expression in rice endosperm. Theor. Appl. Genet. 68, 467.

Sano, Y., Katsumata, M. and Okuno, K.(1986). Genetic studies of speciation in cultivated rice. 5. Inter- and intraspecific differentiation in the Waxy Gene expression of rice. Euphytica, 35, 1.

Shewmaker, C.K. and Stalker,D.M. (1992) Modifying Starch Biosynthesis with transgenes in Potatoes. Plant Physiol. 100, 1083-1086

Shure, M., Wessler, S.R., and Fedoroff, N. (1983). Molecular Identification and Isolation of the Waxy Locus in Maize. Cell. 35, 225

Tomlinson, K J.R. Lloyed and A. M. Smith (1997) Importance of isoforms of starch branching enzyme in determining the structure of starch in pea leaves. The Plant Journal, 11 (1)., 31-43

Tanaka, S. (1983) Seed protein of rice and possibilities of its improvement through mutant genes. In seed proteins: Biochemistry, Genetics, Nutritive value. ed Gschalk, W and Muller, H.P. p225-244

Villareal, R.M. and Juliano. B. O. (1978) Properties of glutelin from mature and developing ricd grain phytochemistry 17: 177-182

Williams, V.R.,Wu, W.T.,Tsai, H.Y.,and Bates, H.G.(1958). Varietal differences in amylose content of rice starch. J. Agr. Food Chem., 6, 47.

Yano, M., Okuno, K., Satoh, H. and Omura, T. (1988). Chromosomal location of genes conditioning low amylose content of endosperm starches in rice, Oryzae sativa L. Theor. Appl. Genet. 76, 183.

Wang Z.Y., Wu Z.L., Xing Y.Y., Zheng F.G., Guo X.L., Zhang W.G.,Wang,M.M.(1990) Nucleotide sequence of rice waxy gene. Nucleic acids Res. 18:5898-5898.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

[부 표]

인 쇄 내 용

Ⅰ. 인쇄규격

1. 크 기 : 4×6배판(가로 188㎜×세로 259㎜)
2. 제 본 : 좌철
3. 용 지 : ○ 표지 200 g/m. 양면 아트지
   ○ 내용 80 g/m. 모조지
4. 인쇄방식 :
   1) 표지 : 바탕 백색, 활자 흑색
   2) 내용 : 흑색 지정활자로 인쇄한다
   3) 양면인쇄

Ⅱ. 편집순서

1. 표 지
2. 제출문
3. 요약문
4. Summary
5. Contents
6. 목 차
7. 본 문
8. 뒷면지

Ⅲ. 참고사항

○ 공판인쇄시에는 이 요령에 준한다.