

GOVP1200409896

최 중
연구보고서

가지과 작물의 내병성 육종을 위한
생명공학적 선발 기술 개발

Development of New Selection Methods for
Disease Resistance Breeding using
Biotechnological Techniques in *Solanaceae*

연구기관
서울대학교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “가지과 작물의 내병성 육종을 위한 생명공학적 선발 기술 개발” 과제 (세부과제 “제초제 저항성 형질전환체를 이용한 새로운 내병성 선발 기술 개발”, “내병성 선발용 표지 유전자의 발현 효율 및 후대 안정성 증진 연구”, “새로운 내병성 선발 기술의 산업화”)의 최종보고서로 제출합니다.

2004 . 1 . .

주관연구기관명 : 서울대학교
총괄연구책임자 : 박 효 근
협동연구기관명 : 농업생명공학원
협동연구책임자 : 류 태 훈
협동연구기관명 : 세미니스 코리아
협동연구책임자 : 이 도 현

요 약 문

I. 제 목

가지과 작물의 내병성 육종을 위한 생명공학적 선발 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구에서는 국내외적으로 중요한 원예작물의 내병성 육종에 있어 F_2 및 그 이후 분리세대에서 특정 제초제를 살포하여 병 저항성 개체들을 선발할 수 있는 획기적 선발 기술을 개발하는데 그 목적이 있다.

본 연구의 주된 목적은 제초제 저항성 유전자를 형질전환 방법으로 내병성이 확인된 식물체(본 실험에서는 저항성 유전자가 heterozygous한 상태로 있는 F_1)로 도입한 후에, T_1 이후 세대에서 이 삽입된 제초제 저항성 유전자와 내병성 유전자가 한 염색체상에 가까이 연관된 식물체를 찾아 내는 것이다. 만약 이 연구가 성공되면 지난 백여 년간 관행적으로 사용하여왔던 내병성 육종에 획기적인 변화가 올 것이다. 지금 현행의 내병성 육종에서는 F_2 세대 및 그 이후 분리세대에서 대상 식물 전체에 대하여 병원균을 인공 접종 한 후에 개체 하나 하나를 대상으로 병 발생 여부를 확인해서 저항성 개체를 선발하고 있다. 그러나 본 연구가 성공적으로 수행되면 F_2 세대 및 그 이후 분리세대에서 단순히 제초제만을 살포한 후 살아남는 것이 바로 내병성 유전자를 갖고 있는 개체이다. 이는 내병성 육종에서 간편성, 경제성 및 효율성을 획기적으로 높일 수 있게 될 것이다.

좀 더 상세히 설명하면 작물의 내병성 육종에 있어서 현재까지의 방법은 F_2 세대 및 그 이후 분리 세대의 수많은 개체에 대하여 병원균을 인위적으로 접종한 후 그 각각의 개체에 대하여 저항성 여부를 판정하고 있는데, 이는 막대한 시간과 노력 및 대규모 포장이 필요하고, 또한 포장에서 한 식물체의 표현형만으로 이병성이나 저항성이나를 판정하는 현행의 방법에는 미세한 환경의 영향으로 유전적으로 이병성 개체를 저항성인 개체로

잘 못 판정할 가능성도 높다. 그러나 이러한 병 저항성과 제초제 저항성 유전자가 연관된 개체가 개발되어 내병성 육종의 재료로 사용된다면 그 수많은 개체에 대한 인위적인 병 접종 없이 비교적 어린 2-3엽기의 유묘기에 상용되는 바스타를 0.3%로 살포하여 병 저항성 개체를 선발할 수 있는 것이다. 이것은 병 검정에 필요한 균주의 유지 및 증식에 따른 시간과 노동력, 그리고 병 접종에 적합한 시기를 기다려야 하는 번거로움과 시간 낭비를 줄일 수 있는 큰 장점이 있으며 또한 escape (이병성인 개체가 저항성인 것으로 판정되는 것) 발생 가능성을 최소화할 것이다.

현재 우리 인류는 21세기 초반에 인구의 폭발적인 증가와 새로운 경작지 개발의 한계로 대규모 식량 위기에 처하게 될 가능성이 높다. 이를 일부에서는 ‘종자전쟁’이라 하고 있다. 이러한 예상되는 종자전쟁에서 우리의 국제 경쟁력을 높이기 위해서는 본 연구와 같은 획기적인 기초 연구들이 많이 수행되어야 할 것이다. 본 연구의 궁극적인 목적은 우리 종묘산업계의 국제 경쟁력을 향상시켜서 우수한 품종을 경제적으로 육성 가능케 하는데 있다.

이러한 무한 경쟁시대에 들어선 상황에서 우리가 어려운 난관을 헤쳐 나갈 수 있는 방법은 우리의 실정을 명확히 파악하고 그에 대응할 수 있도록 국가 경쟁력을 높이는 길이다. 그것은 본 연구와 같은 세계적으로 독창성이 있는 연구이며, 우리나라의 식물생명공학과 작물육종 분야를 획기적으로 발전시켜 이 분야에서의 국제경쟁력을 높여 줄 수 있는 잠재력을 가진 기술이라고 생각한다. 이 기술이 우선 고추와 토마토와 같은 가지과 채소에서 실용화된다면, 벼를 포함한 다른 많은 원예 작물에도 원용도 바로 가능할 것으로 보이며, 이의 경제적, 산업적 파급 효과는 엄청날 것으로 생각된다.

본 과제에서 추구하는 선발용 유전자와 내병성 유전자간의 인위적인 유연관계 작성은 전 세계적으로 아직 보고 되고 있지 않기 때문에 국제적인 기술 경쟁력을 확보할 수 있으며 이를 통한 부가가치 창출을 기대할 수 있다. 또한 앞으로 심각한 문제가 될 지적재산권 및 특허료의 국제 협상에서 우리의 협상력을 보다 더 강화하게 될 것으로 보인다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 가지과 작물의 형질전환

본 연구에서는 제초제 저항성 유전자를 형질전환 방법에 의해 가지과 작물인 고추 및 토마토를 대상으로 하여 도입하였다. 제초제 저항성 유전자는 현재 가장 널리 이용되는 *bar* 유전자를 사용하였고, 식물재료는 본 연구의 협동기관인 세미니스 코리아에서 육성한 계통을 사용하였다.

고추는 여러 가지 계통에 형질전환을 수행하여 그 효율이 높은 계통을 골라 본 과제에 적합한 교배조합을 작성하였으며, 그 일대교잡 종자를 이용하여 *bar* 유전자를 형질전환 하였다. 토마토는 7가지 병에 저항성을 가지는 F₁ 품종을 이용하여 재분화 및 형질전환 체계를 확립하였다.

실험 결과 얻어진 형질전환 개체는 분자적 수준에서의 검정(PCR, genomic southern blot analysis, RT-PCR)과 각 개체에 대해 제초제를 직접 살포하는 생물검정도 함께 실시하여 형질전환체임을 확인하였고, 그 체계도 확립하였다.

2. 제초제 저항성 유전자와 병 저항성 유전자가 연관된 개체의 선발

형질전환 개체(T₀)에 대해서는 자가수분을 통하여 후대를 진전하였으며, T₁ 종자를 확보하였다. 또한 이들 T₁ 세대에 대하여 제초제 살포에 의한 생물검정과 병 저항성 검정(위조병, 반신 위조병, TMV 등)을 함께 실시하여 분리비를 관찰하고, 제초제 저항성 유전자와 병 저항성 유전자가 연관된 개체를 찾고자 하였다. Biotest라는 비파괴적인 생물검정 방법을 개발하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서는 가지과 작물의 재분화 및 형질전환 체계, 형질전환체의 분석 및 생물검정에 대한 시스템을 확립하였다.

토마토는 제초제 저항성 유전자가 도입된 60여 개체의 형질전환체를

획득하였으며, 이 개체들을 자가수분 하여 T_1 종자를 각 T_0 당 적게는 1,000립에서 많이는 10,000립까지 얻었으며, T_1 에 대한 병 검정 결과와 제초제 저항성 검정 결과를 확보하였다. 또한 이들 중에서 *bar* gene을 4 copy 가지고 있는 개체는 그 후대에서 제초제 저항성 유전자가 안정적으로 발현되는지 또 분리는 어떻게 일어나는지를 알고자 다시 자가수분 하여 그 후대 T_2 종자를 얻고자 실험을 진행하고 있다.

T_1 에 대한 병 검정 결과와 생물검정 결과를 토대로 병 저항성 유전자와 제초제 저항성 유전자가 연관된 개체를 선발하고자 하였으나 아직 10cM 정도 떨어진 개체는 아직 찾지 못하였다.

주된 연구기관인 서울대에서는 고추 형질전환체를 얻기 위하여 많은 실험을 수행하였으나 아직 확실한 형질전환체를 얻지 못하였다. 그러나 본 연구의 협동기관인 농촌진흥청 생명공학연구원에서는 고추 형질전환에 성공하였다. 고추 역병 및 TMV P(0)에 이병성인 계통에 제초제 저항성 유전자를 도입시킨 형질전환체를 획득하였다. 고추 형질전환은 대단히 난이하다고 알려져 있어서 이를 확실히 확인하기 위하여 T_1 식물체에 0.3% 농도의 바스타 살포한바 고사하지 않은 개체가 있었으며, 이들 개체를 대상으로 southern blot analysis를 하여 제초제 저항성 유전자가 형질전환 되었음을 확인하였다. 제초제 저항성 유전자의 삽입이 확인된 개체들을 자가수정하여 homozygous화 하였고, 이들을 고추 역병 및 TMV 저항성인 CM334와 교배 하여 얻은 F_1 에 대하여 병 검정과 제초제 생물검정을 실시하였다.

본 연구에서 개발된 형질전환 체계를 후에 다른 유용 작물에서도 이용될 수 있을 것으로 보이며, 본 실험의 목적과 같이 제초제 저항성 유전자가 내병성 육종에서 선발 마커로 사용된다면 요즘같이 경쟁이 치열한 분자육종 분야에서 한걸음 더 나아가는 계기가 될 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구의 결과물은 특허 출원이 가능하며, 종묘회사에 분양하여 여러 계통들과의 여교잡을 통해 내병성 육종 재료로 사용된다면 우리나라 종묘회사의 국제 경쟁력을 높이는 데 일조를 할 것으로 사료된다.

SUMMARY

I. Title

Development of new selection methods for disease resistance breeding using biotechnological techniques in *Solanaceae*

II. Purposes and Importance of Study

This study has been conducted to develop a totally new selection system in plant breeding programs for disease resistances using *Agrobacterium*-mediated herbicide-resistant gene(s) as genetic markers. At the beginning, we intended to develop this system for two *Solanaceae* crops, namely hot pepper (*Capsicum annuum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*), as experimental purpose, but this system could be applied to any economical crops if once well established.

The final goal of this research is to replace the currently-using phenotype-dependent screening method in disease resistance breeding programs with a herbicide marker system, in which spraying a specific herbicide (basta in the case of this study) would eliminate the susceptible plants from the segregating populations such as F₂'s and thereafter. To achieve this goal, first we have to introduce the herbicide-resistance gene (*bar* gene in the case of this experiment) to a plant heterozygous for the disease resistance locus (or loci), and after that, we have to find a plant (or plants) having very close genetic linkage between the herbicide-resistance gene(s) and the disease resistance gene(s).

Until now, the plant breeders for disease resistance have to determine the susceptibility (or resistance) of individual plants in segregating populations by phenotypical appearance of disease symptoms, which have been very laborious, time-consuming, and highly technical since plant breeders should prepare disease inoculum, spray it, make decision and finally select out the each of the susceptible individuals. The another serious problem in the current screening method is inevitable occurrence of escapes, which means the misjudgement of susceptible plants as being resistant or vice versa.

Instead, the new technique will be very simple, easy, economical, time-saving and highly free from misjudgement by simply spraying the certain herbicide (basta in this study) on segregating populations such as F₂'s and thereafter, which would kill all the susceptible individuals. And the breeders just harvest the remaining and advance the generations by repeating the same practice until to achieve necessary homozygosity for the disease resistance locus (or loci).

If we would be successful in developing this totally new and revolutionary system, it will greatly help to strengthen the international competitiveness of our seed industry in the coming years.

III. Contents and Range of Study

1. Transformation of herbicide resistance gene into *Solanaceae*

We used F₁ hybrids of both hot peppers and tomatoes for the

Agrobacterium-mediated transformation of the herbicide resistance gene, which should be heterozygous for the disease resistance loci, because it would make possible for selecting plants having the desirable linkage between the disease resistance and herbicide genes at the later generations.

We were highly successful in *Agrobacterium*-mediated transformation of *bar* gene(s) in case of the tomato F₁ hybrid. We were able to establish regeneration as well as transformation system in tomato resulting in having numerous T₀'s and T₁ plants by selfing T₀'s. And we confirmed the insertion of the intended *bar* gene by PCR analysis, Southern blot analysis, RT-PCR and finally the herbicide bioassay.

In case of hot pepper, it has been very difficult to establish the reliable and repeatable transformation system although many different efforts were attempted at the lab. of Seoul National University. However, our co-worker at the National Institute of Agricultural Biotechnology in the Rural Development Administration (RDA) were successful to insert the *bar* gene into a local line of hot pepper susceptible to diseases. The transformed and homozygous plants were given to Seoul National University to make crosses with multiple disease resistant line cv 'CM334'.

2. Selection of plants having close linkage between disease resistance and herbicide resistance gene(s)

For the plants of T₁ generation in term of herbicide-resistance transformation which were F₂'s in term of disease resistance, we conducted two steps-wise screenings, the first screening for the

herbicide resistance and then for the disease resistance for the surviving plants from the previous herbicide screening. By this way, we tried to select the plants having *bar* gene linked with disease resistance gene(s). A simple, rapid and non-destructive bioassay (biotest) was developed for the screening of basta tolerance.

IV. Results of Study and Its Application

Tomato was successfully regenerated and transformed to obtain about 60 T₁ plants and the true insertion of *bar* gene was confirmed by PCR, Southern blot analysis, RT-PCR and bioassay. These T₁ plants were selfed to produce T₂'s with varying number of seeds from 1,000 to 10,000.

Results for the two step-wise screening (first herbicide and next disease resistance) on T₂' populations indicated that we were not able so far to find plant having a close linkage between these two genes. We will continue to search for the plants.

In pepper, the transformants obtained at the National Institute of Agricultural Biotechnology regeneration was given to the lab. of Seoul National University to make crossed with 'CM334', multiple disease resistant line. For the F₂ generation, two steps-wise screening will be conducted.

Although we were not able so far to achieve the final goal of the totally new screening method in the disease resistance breeding programs by finding plants having close genetic linkage between herbicide-resistance and disease-resistance genes, we were able to

develop the meaningful progresses for the final purposes such as importance of using F₁ hybrids for transformation, transformation techniques for tomato and pepper (partially), and necessary screening methods.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction

<i>Section 1. Purposes and Necessities</i>	15
<i>Section 2. Present Condition of Technical Development</i>	17
1. Selection system in plant breeding for disease resistances in <i>Solanaceae</i>	17
2. Transformation of Herbicide Resistance Gene	18
<i>Section 3. Systems and Strategies</i>	21

Chapter 2. Development of New Selection Methods for Disease Resistance Breeding using Biotechnological Techniques in *Solanaceae*

<i>Section 1. Introduction</i>	23
<i>Section 2. Contents</i>	26
1. Inheritance Mode of Disease Resistance Gene	26
2. Establishment of Disease Resistance Screening Methods	27
3. Establishment of Transformation System of <i>Solanaceae</i>	31
4. Selection of Plants having Close linkage between Disease Resistance and Herbicide Resistance Gene(s)	64
<i>Section 3. Summary and Discussion</i>	78

Chapter 3. Improvement of Expression level and Stability of Selectable Marker Gene in Disease Resistance

Breeding System

<i>Section 1. Contents</i>	81
1. Development of Herbicide Resistance Pepper lines	81
2. Materials and Methods	82
3. Results	84
4. Production of Transgenic F ₁ by Test Cross	85
5. Production of Transgenic F ₂ by Selfing	86
6. Transformation of Herbicide Resistance Gene	89
7. Analysis of Herbicide Resistance Gene Expression Pattern in Transgenic F ₁ Generation	93
8. Improvement of Pepper Transformation Methods	94
<i>Section 2. Summary</i>	98

Chapter 4. Development of New Selection System in Plant Breeding Programs for Disease Resistances

<i>Section 1. Introduction</i>	100
<i>Section 2. Purpose</i>	101
<i>Section 3. Results</i>	101
1. Development of New Disease Resistance Lines for Transformation	101
2. Inheritance Mode of Disease Resistance Gene	102
3. Propagation of Transgenic Plants	103

Chapter 5. General Discussion 104

Chapter 6. Reference 107

목 차

제 1 장 서 설

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	15
제 2 절 국내외 기술 개발 현황	17
1. 가지과 작물 육종에서의 내병성 선발 기술	17
2. 제초제 저항성 유전자의 형질전환	18
제 3 절 연구개발 체계 및 전략	21

제 2 장 제초제 저항성 형질전체를 이용한 새로운 내병성 선발 기술 개발

제 1 절 서 론	23
제 2 절 연구개발 내용	26
1. 병 저항성 유전자의 유전양상 연구	26
2. 병 저항성 검정 체계 확립 및 저항성 검정	27
3. 가지과 작물의 형질전환 체계 확립	31
4. 병 저항성 유전자와 제초제 저항성 유전자가 연관된 개체의 선발	64
제 3 절 연구 요약 및 고찰	78

제 3 장 내병성 선발용 표지 유전자의 발현 효율 및 후대 안정성 증진 연구

제 1 절 연구개발 내용	81
1. 제초제 저항성 고추 계통의 개발	81

2. 재료 및 방법	82
3. 연구수행 내용 및 결과	84
4. 정역 교배에 의한 Transgenic F ₁ 의 생산	85
5. 자가수분에 의한 Transgenic F ₂ 생산	86
6. 제초제 저항성 유전자 도입 및 발현양상 확인	89
7. Transgenic F ₁ 에 있어서 제초제 저항성 유전자 발현 양상 분석	93
8. 고추 형질전환 방법 개선	94
제 2 절 연구결과 요약	98
제 4 장 새로운 내병성 선발 기술의 산업화	
제 1 절 서 론	100
제 2 절 연구개발 목표	101
제 3 절 연구내용 및 결과	101
1. 새로운 병 저항성 고추 계통의 도입 임성 검정	101
2. 병 저항성 유전 연구	102
3. 형질전환체 후대 증식	103
제 5 장 종합고찰	104
제 6 장 인용문헌	107

제 1 장 서 설

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

지금 우리 인류는 종자와의, 또는 종자와 관련하여 전쟁을 하고 있다. 가장 치열한 전투가 진행되는 곳은 생명공학을 이용한 분자유종 분야이다. 다국적 거대 기업간의 방대한 물량 공박이 이루어지고 있으며 21세기 산업 주도권과 패권이 이에 달려있다고 생각하고 있다.

전세계는 이미 무한 경쟁시대에 들어섰으며, 이와 같은 상황을 헤쳐 나갈 수 있는 방법은 우리의 실정을 명확히 파악하고 그에 대응할 수 있도록 국가 경쟁력을 높이는 길이다.

21세기 우리나라 농업의 국제경쟁력을 확보를 위해서는 보다 더 많은 농업생명공학 관련 연구가 수행되어야 하는데, 이를 위한 풍토 조성과 일반시민들의 인식 제고에 크게 도움이 될 것이다. 현재 일반인들의 농업생명공학에 대한 인식은 90년대 초반보다는 점차 부정적으로 변해가고 있다. 본 연구가 성공하게 되어 친환경적인 농산물이 실제 일반인의 식탁에 더 많이 올라가게 된다면 이러한 일반인들의 농업생명공학에 대한 부정적인 시각은 상당히 개선될 것이다.

최근 콩, 목화, 옥수수 등의 작물에서 실용화되고 있는 제초제 저항성 유전자는 효과적인 잡초방제라는 측면에서 농업적 이용성이 매우 높지만 일반 식물의 형질전환 과정에서 형질전환체의 선발마커로도 그 중요성이 높게 인정되고 있다.

작물의 내병성 육종에서 있어서 현재까지의 방법은 F₂ 이후 분리 세대의 수많은 개체에 대하여 병원균을 인위적으로 접종한 후 개체별로 저항성 여부를 판정하고 있다. 그러나 이와 같은 방법에는 막대한 시간과 노력 및 대규모 포장이 소요되어 많은 어려움이 따르고 있다.

이에 본 연구에서는 제초제 저항성 유전자를 생명공학적인 방법을 이용하

여 새로운 선발마커로 개발하는 것에 초점을 맞추고 내병성 육종에 있어서 형질전환 방법으로 식물체에 도입하며 병 저항성 유전자와 제초제 저항성 유전자가 연관된 개체를 획득하여 선발과정에서 병 검정대상 식물체에 대해 단순히 제초제를 살포하는 것만으로 병 저항성 개체를 선발하는 것으로, 이를 통해 내병성 육종과정 중 선발단계에서의 용이성을 획기적으로 높이고자 하는 데 초점을 맞추었다. 이 방법은 상업 육종가들이 대면적의 분리세대를 다루는 실제 육종현장에서 저렴한 비용으로 간편하게 사용할 수 있다는 데 가장 큰 장점이 있다.

국내의 경우 도입유전자의 안정적인 유전 및 발현을 위한 기술 개발은 아직까지 연구 역사가 짧고 따라서 상업적인 육종 포장에서의 문제점 해결까지 연계된 연구 활동이 부족한 실정이다. 앞으로 형질전환을 통해 개발될 품종의 잠재력을 감안할 경우 이 분야의 기술개발은 절실하다. 본 연구에서는 도입유전자의 유전 및 발현 양상을 분자 생물학적으로 연구하고, 이를 다시 형질전환에 응용하여 실제 포장에서 안정적으로 발현하는 개체를 얻는 체계적인 연구를 진행할 것이며, 이를 통해 생명공학과 작물 육종의 유기적인 연계를 맺을 수 있을 것으로 생각한다.

결론적으로 본 연구는 세계적으로 독창성이 있는 연구이며, 한국의 식물생명공학과 작물육종 분야를 획기적으로 발전시켜 이 분야에서의 국제경쟁력을 높혀 줄 수 있는 잠재력을 가진 기술이라고 생각한다. 이 기술이 우선 고추와 토마토와 같은 가지과 채소에서 실용화 된다면, 벼를 포함한 모든 작물에로의 원용도 바로 가능할 것으로 보이며, 이의 경제적 산업적 파급 효과는 엄청날 것으로 생각된다.

세계의 종자시장이 업체간의 대규모 인수, 합병에 따라 일부 국가나 기업에 의해 독점화되는 상황에서 국내 종묘기업들의 국제 경쟁력을 강화하기 위해서는 독창적인 생명공학적 신품종을 육성하는 기술 개발이 필요하다. 이런 이유로 유럽 각국에서도 생명공학적 품종의 재배나 반입에는 부정적이면서도 연구나 개발에는 많은 투자를 쏟고 있는 실정이다.

현재까지 국내의 농업생명공학 기술들이 선진국의 기술을 모방하는 수준이기 때문에 이에 따른 특허료 및 기술료 부담 등의 문제점들이 제기되

고 있어 독자적인 기술 개발을 통한 경쟁력 확보가 필요한 실정이다. 본 과제에서 추구하는 선발용 유전자와 내병성 유전자간의 인위적인 유연관계 작성은 전 세계적으로 아직 보고 되고 있지 않기 때문에 국제적인 기술 경쟁력을 확보할 수 있으며 이를 통한 부가가치 창출을 기대할 수 있다. 또한 앞으로 심각한 문제가 될 지적재산권 및 특허료의 국제 협상에서 우리의 협상력을 보다 더 강화하게 될 것이다.

제 2 절 국내외 기술 개발 현황

1. 가지과 작물 육종에서의 내병성 선발 기술

국내 가지과 작물의 내병성 육종에서 가장 큰 어려움은 한정된 포장과 인력을 가지고 대규모의 선발을 진행해야 하는 것에 있다. 또한 각각의 여러 병에 대하여 각기 다른 검정방법을 사용해야 하므로 시간과 노력, 대규모의 포장이 많이 든다는 것과 몇 가지 병에 대해서는 병 검정 기술 수준이 아직도 미흡하다는 점이다.

분자표지(molecular marker)를 개발함으로써 육종분야에서 마커를 통한 간접선발(marker assisted selection, MAS), 특정 우수 형질 관련 유전자의 품종으로의 도입 및 선발, 그리고 계통간의 heterosis의 추정 등에 이용할 수 있다고 보고 되어 있다. 또한 환경의 영향이 커서 표현형만으로는 유전형을 식별하기 어려운 경우에도 효과적인 선발이 가능하고, 육묘기에서 조기 선발함으로써 시간, 경제적, 공간적으로 육종효율성을 대폭 높일 수 있다. 게다가 여러 저항성 유전자들에 대한 분자 표지가 개발된다면 육종가들의 오랜 숙원이었던 gene pyramiding을 이용한 복합 내병성 육종도 가능하게 될 것이다. 아울러 저항성 유전자와 밀접히 연관된 분자 표지를 출발점으로 map-based cloning 방법을 이용한다면 저항성 유전자의 클로닝도 가능하다고 생각된다.

지금까지 여러 작물의 육종 과정에서 선발의 효율을 높이기 위하여 이와 같은 분자표지를 이용하려는 노력이 계속적으로 있어 왔으나 이들 중

대부분은 실제 육종현장에서 사용하기에는 너무 비싸고 복잡하여 숙련된 기술이 필요하여 개발된 분자 표지들 중 실제로 이용중인 것은 전무한 실정이다.

2. 제초제 저항성 유전자의 형질전환

가. 가지과 작물의 형질전환

토마토의 경우에는 이미 재분화 및 형질전환 체계가 확립되어 있으나, 아직 제초제 저항성 유전자가 도입된 형질전환체에 대한 보고는 거의 없으며, 과피 연화 억제 품종인 Flavr Savr(1994)나 endless summer(1996) 등은 이미 상용화 되어 있는 실정이다. 그러나 아직 우리나라에서는 형질전환체를 상용화하기 위한 산학연간의 체계적인 공조체제가 부족한 실정이다.

토마토에 비하여 고추의 형질전환 성공에 관한 보고는 매우 미흡하다. 고추의 형질전환에 대한 보고는 1989년 Satio등이 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환을 통하여 callus 및 shoot가 유도되었다는 결과를 미국식물 생리학회에서 처음 포스터로 발표한 것으로, 그 이후부터 세계 여러나라의 실험실에서 고추 형질전환기술을 확립하기 위해 수많은 노력을 기울여 왔다. 고추는 전 세계적으로 현재까지 고추 형질전환체에 대하여 포장시험이 허가된 것은 세미나스에서 개발한 바이러스 저항성 고추와 DNA Plant Tech.에서 과실연화 지연 유전자가 도입된 고추 등 2종류에 대하여 5건에 불과하여 토마토 573건, 벼 177건에 비하여 아주 적은 수준이다.

이와 같이 고추의 형질전환에 대한 성공 사례가 드문 것은 초기에는 재분화가 다른 작물들에 비해 어려웠고, 그 이후에는 *Agrobacterium*과 함께 공동 배양된 조직으로부터 발생하는 신초의 대부분은 식물체로 유기되지 않는 blind-leaves와 같은 이상한 형태의 잎조직으로 발달하여 생존율도 낮으며 또한 이러한 개체는 escape도 많은 것으로 보고 되고 있다.

우리나라의 주요 작물이면서 세계적으로도 중요한 고추의 생명공학적인 방법을 이용한 육종 체계가 확립되지 않은 것은 국내에서 이러한 기술을

개발할 수 있다면 오히려 우리의 국제 경쟁력을 높일 수 있는 계기가 될 수 있을 것으로 보인다.

나. 제초제 저항성 유전자의 형질전환

1983년 식물에서 형질전환 방법으로 첫 유전자 재조합 실험이 성공한 이래로, 1987년에는 형질전환 계통을 노지에서 재배할 수 있도록 허가되었으며, 그로부터 7년 후에는 실제 농가밭에서의 재배가 허용되었다. 형질전환 품종들이 본격적으로 농가에 보급된 것은 1995년부터인데 그 후 식물 육종 역사상 그 유례가 없을 정도로 신속하게 그리고 광범위하게 보급되었다.

그 중에서 제초제 저항성 유전자가 도입된 작물의 2001년도 총 재배면적은 48.6만 ha로서 세계의 형질전환 작물(GMO, Genetically modified organism) 재배면적의 82%에 이르고 있다. 실제로 Glyphosate계열의 제초제인 근사미에 저항성인 콩 품종(Round-up ready)은 많은 관심을 불러 일으켰으며, 실제로 미국 콩 종자 시장의 60% 이상을 차지하였다.

본 연구에서 사용한 *bar* 유전자는 제초제를 분해하거나 무독화시키는 효소를 통해 저항성을 가지게 되는 경우로, 효소는 주로 미생물에서 발견된다. 이 유전자는 glufosinate의 주성분인 phosphinothricin의 acetyl기를 이동시킴으로써 무독화시키는 효소를 만들어 내는데, 이것은 토양세균인 *Streptomyces hygrosopicus*에서 클로닝 되었다.

Glufosinate계 제초제는 글루타민 합성 효소를 비가역적으로 억제하여 식물체 내에 암모니아의 축적과 광합성의 억제를 유도하여 식물체를 죽게 만든다고 알려져 있다. 이들은 아미노산 생합성을 억제하기 때문에 그 효과가 크고, 비 선택성인 반면 박테리아로부터 분리한 저항성 유전자들은 드물지 않기 때문에 이를 작물에 전이하여 제초효과를 극대화할 수 있다는 장점이 있다. 아미노산 생합성 저해제에는 glufosinate계 제초제 외에 EPSPS (5-enoyl-pyruvyl shikimic acid 3-phosphate synthase)를 저해하는 glyphosate계 제초제, ALS (acetolactate synthase)를 저해하는 sulphonylurea계 제초제, imidazolinone계 제초제와 triazolopyrimidine계 제

초제, 히스티딘 생합성을 억제하는 aminotriazole 등이 있다.

제초제 저항성 유전자의 식물체로의 도입은 재배기간 중에 발생하는 잡초의 제거에 이용되어 작물의 생산성을 향상시킬 수 있지만 또한 형질전환체의 선발 유전자로 이용되어 당대뿐 아니라 후대개체들에 대하여도 제초제 생물검정이 가능하다.

이러한 잇점을 토대로 한 제초제 저항성 유전자를 이용하여 내병성 개체를 선발하려는 기술은 아직 세계적으로 보고된 바 없는 본 연구진의 독창적인 아이디어로 한국의 식물 생명공학과 작물 육종 분야를 획기적으로 발전시켜 이 분야에서의 국제 경쟁력을 높여줄 수 있는 잠재력을 가진 기술이라고 생각된다.

다. 형질전환을 통한 유전자 도입 연구

세계적으로 형질전환에 관한 연구는 급속히 진행되고 있는데 그 연구를 주제별로 나누어 보면 다음과 같다. 첫째, *Agrobacterium*의 침투성 향상(물리적 혹은 화학적 장벽 극복), 둘째, MAR sequence에 의한 position effect 극복에 관한 문제, 셋째, promoter와 enhancer개발에 관한 연구, 넷째, 식물체의 codon usage 변경을 통한 gene modification, 다섯째, Homologous recombination을 통한 삽입위치의 제어, 여섯째, 거대 DNA 분자의 도입연구 등에 관한 것이다. 국내에서는 명지대학교의 김주곤 교수님 실험실에서 MAR sequence를 이용하여 벼의 형질전환 효율을 향상시킨 바 있다.

후대 유전자의 발현 양상은 methylation과 deacetylation에 관련이 있을 것으로 보고 되고 있다. 1990년대 초를 전후로 도입유전자의 silencing 문제가 대두되기 시작하였는데, 후대에서의 도입 유전자의 silencing에 관한 연구는 다음과 같이 분류하여 연구가 진행되고 있다. 첫째, cis-inactivation으로 여러 개의 유전자가 도입되어 methylation이 일어나는 경우, 둘째, trans-inactivation으로 도입 유전자가 silencer의 역할을 하는 경우, 셋째, co-suppression으로 유전자간의 상동성에 기인한 것 등으로 나눌 수 있다.

작물의 형질전환 기술에 있어서 유전자의 도입과 관련된 문제점들은 여러 가지 대두되고 있는데, 이러한 문제점들은 현재 프로모터의 선정이나 intron sequence의 사용, 형질전환 후 single copy를 갖는 형질전환체의 선발 등의 방법으로 부분적으로 해결하고 있으나, 이들은 매우 소극적이고 수동적인 방법이기 때문에 이러한 현상들에 대한 원인구명 및 적극적인 해결방안이 성공적인 형질전환체 개발에 필수적이다.

이와 더불어 형질전환체에서 상업적인 품종이 나올 수 있도록 분자생물학자와 실제 육종가와의 긴밀하고 유기적인 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

제 3 절 연구개발 체계 및 전략

본 연구에서는 내병성 육종에 있어서 F_2 이후의 수많은 분리 세대들에 대하여 병원균을 인위적으로 접종하지 않고 제초제만을 살포하여 병 저항성 개체를 선발할 수 있도록 제초제 저항성 유전자를 *Agrobacterium*을 통한 형질전환 방법을 이용하여 도입하고, 제초제 저항성 유전자와 병 저항성 유전자가 연관된 개체를 얻고자 하였다.

가지과 작물 중에서 국내외에서 그 중요성이 인정되고 있는 토마토와 고추를 대상으로 하여 제초제 저항성 유전자를 가지고 형질전환 실험을 수행하였다. 제초제 저항성 유전자와 식물의 병 저항성 유전자가 연관된 개체를 얻기 위해서, 병 저항성 유전자를 가지고 있는 저항성 계통과 그렇지 않은 이병성 계통을 교잡한 F_1 개체에 형질전환을 수행하였다. F_1 개체에 형질전환을 수행함으로써 저항성 계통에 형질전환을 하였을 경우에 따르는 노력을 줄이고자 하였다. 즉, 형질전환된 개체 각각마다 이병성 계통을 교잡시켜야 하는 번거로움과 이에 소요되는 시간과 노력을 자가수분 후대에서 검정하는 것으로 대체하였다.

제초제를 살포하여 병 저항성 개체를 선발할 수 있도록 저항성 유전자에 제초제 저항성 유전자를 연관시킬 병은 고추에 있어서는 서울대 박효근

교수 팀에서 검정이 가능한 역병, TMV, PVY를, 토마토에 있어서는 세미니스 코리아에서 검정이 가능한 선충, 반신위조병, 시들음병, 뿌리 시들음병, ToMV를 대상으로 진행하였다. 고추의 경우, 이병성 친으로는 세미니스 코리아에서 보유하고 있는 상용 품종의 부모친을 사용함으로써, 형질전환체를 분양하여 종묘회사가 직접 사용하고자 할 때, 상용 품종 내로 도입하는데 드는 시간과 노력을 최소화하고자 하였다.

고추의 형질전환은 서울대 박효근 교수 팀에서 가지고 있는 형질전환 기술을 바탕으로 진행하면서 체계를 확립하고자 하였으며, 토마토의 형질전환은 농업생명공학원에서 확립한 방법으로 진행하였다. 도입 유전자가 1 copy인 경우 형질전환된 F₁ 개체 (T₀)의 자가수분 후대(T₁)에 대해 제초제 저항성 검정과 병 저항성 검정을 동시에 수행하고 그 분리비를 조사하여 두 유전자가 연관된 개체를 선발하였다. 2 copy 이상 삽입된 것으로 확인된 개체의 경우에도 자가수분 후대에 대해 제초제 저항성 검정과 병 저항성 검정을 수행하였으며, 그 분리비를 관찰하였다.

병 저항성 검정시에는 서울대 박효근 교수 팀에서 개발한 TMV 절취엽 검정법과 같은 비파괴적 검정 방법을 이용하였고, 제초제의 생물검정시에도 같은 실험실에서 개발한 비파괴 생물검정 방법인 biotest와 파괴 생물검정법을 함께 사용하였다. 선발된 제초제 저항성 유전자와 병 저항성 유전자가 연관된 고추와 토마토는 세미니스 코리아에 분양하여, 종묘회사에서 보유하고 있는 계통과의 여교잡을 통해 제초제 저항성과 연관된 병 저항성 유전자를 도입하는 내병성 육종 재료로서 이용하고, 이 과정에서 실제 선발 포장에서 제초제 살포에 의한 병 저항성 개체 선발 기술의 실용성을 검증하고자 하였다.

제 2 장 제초제 저항성 형질전환체를 이용한 새로운 내병성 선발 기술 개발

제 1 절 서 론

고추(*Capsicum annuum* L.)는 아시아를 비롯하여 전 세계적으로 재배되고 있는 작물로 약 1만여 년 전부터 재배되어 왔으며, 원산지는 남미의 불가리아이며, 신대륙 발견 이후 유럽에 전달되었고 이후로 세계 각지에 널리 퍼지게 되었으며, 우리나라에는 1614년에 도입된 것으로 알려져 있다. 고추는 짧은 재배역사에도 불구하고 우리나라의 식생활에서는 없어서는 안 될 중요한 채소작물로 자리잡고 있으며, 우리나라 고추 재배 면적('02)은 7.2만 ha, 생산량은 19.3만톤으로 채소 중 가장 큰 시장을 갖는 품목 중 하나이며, 생산량과 가격에 따른 차이가 있으며 생산액에 있어 1조 500억원으로 경종작물인 쌀 다음의 위치를 차지하고 있다. 따라서 고추는 우리나라에서 식생활은 물론, 농가 경제에 있어서도 가장 중요한 원예작물의 하나이다. 세계적으로도 재배면적과 생산량('01)에 있어서 1,460천 ha, 19,180천 톤에 이르며 현재 생산량과 재배면적에 있어 계속 증가 추세에 있는 세계적으로 중요한 작물이다(농림부 2002).

하지만 WTO 체제로 인해 외국으로부터 M&A 수입, 수입업자에 의한 직접수입 등 수입물량이 증가추세에 있으나 국내 건고추 기준 생산비가 중국 고추 생산비의 5배에 이를 정도로 경쟁력에 있어 열위에 놓여 있는 실정이다.

고추와 같은 가지과에 속하는 토마토(*Lycopersicum esculentum*)는 1년생 채소로서, 비타민(A, B₁, B₂, C), 라이코핀, 루틴, 플라보노이드, 수분, 무기물이 풍부한 원예작물로 세계적으로 재배되는 원예작물이며 먹거리이다. 토마토의 원산지는 남미의 안데스 지역인 페루, 에쿠아도르, 칠레로 기원전 인디안의 이동에 따라 안데스 고원으로부터 중앙아메리카 및 멕시코

로 전파되었고, 16세기 경에 유럽으로 전파된 후 세계적으로 보급되었다.

토마토는 세계적으로 가장 많이 재배되는 채소 중에 하나로 이의 종자 시장은 막대하다. 국내의 토마토 생산량은 2002년 218,485M/T을 생산하고 있으며(농림부, 2003), 시설 하우스 재배가 계속적으로 증가하고 있는 실정이다. 2002년 현재 우리나라의 토마토 종자의 해외 수출은 43.9%나 증가된 800만달러에 이르며, 본 연구가 성공적으로 수행된다면 우리나라 종묘회사의 토마토 육성 국제경쟁력은 획기적으로 높아질 것이다.

고추의 경우, 국내 고추의 가격 경쟁력을 갖추기 위해서는 우량한 내병성 품종의 육종과 함께 생산비를 줄이고자 하는 노력이 함께 요구되고 있다. 현재 이를 위해서 전통육종 방법과 생명공학적인 방법을 통해 내병성, 고품질, 일시수확형(생력화) 등의 유용형질이 도입된 품종을 육성하기 위해 많은 연구들이 이루어지고 있다.

특히 생명공학적인 방법 중의 하나인 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 형질전환 기술은 전통적인 육종방법으로 도입이 어려운 유용 유전자를 유전자 조작을 통하여 원하는 목표로 하는 작물에 도입하여 여러 가지 형질의 품종을 생산할 수 있는 기술로 전통육종의 한계를 극복할 수 있는 새로운 품종 육성의 수단으로 이용되고 있다. 현재까지 이러한 기술을 이용하여 성공한 사례로는 EPSPS 유전자를 도입한 제초제 저항성 품종, Bt 유전자를 이용한 내충성 품종, antisense를 이용한 과실의 성숙방지, 바이러스의 외피 단백질 등을 이용한 바이러스 저항성 품종 등 다양하다.

본 연구는 내병성 육종에 있어서 시간 및 자본을 대폭 줄일 수 있는 새로운 선발 기술을 개발하기 위하여 제초제 저항성 유전자를 형질전환 방법으로 식물체에 도입하며, 병 저항성 유전자와 제초제 저항성 유전자가 연관된 개체를 획득하여 내병성 육종의 분리세대 선발과정에서 병 검정대상 식물체에 대해 단순히 제초제만을 살포하여 병 저항성 개체를 선발하는데 그 목적이 있다. 이 방법은 내병성 육종과정 중 선발단계에서의 용이성을 획기적으로 높일 수 있는 것이며, 이러한 기술을 종묘회사 및 실제 육종가들이 주요 원예작물의 신품종 육성 기술에 도입시킨다면 우수 품종 개발비를 대폭적으로 절감하여 우리 종묘산업계의 국제 경쟁력 강화에 이바

지 할 수 있을 것으로 생각된다. 이로써 종자 생산비가 절감되며, 농민에게는 우수하고 값싼 종자를, 소비자에게는 값싸고 품질 좋은 원예작물을 공급할 수 있어 일석 삼조의 효과를 가져올 수 있다.

제 2 절 연구개발 내용

1. 병 저항성 유전자의 유전 양상 연구

가. 연구 재료 및 방법

1) 식물재료의 준비(토마토)

토마토는 상용 품종 중에서 위조병(Fusarium wilt) 레이스 1, 2, 반신 위조병(Verticillium wilt), 근부 위조병(Fusarium crown and root rot), ToMV, 선충(Nematode), 잎곰팡이병(Leaf mold), 잿빛 반점병(Gray leaf spot) 등 7가지 병에 저항성을 가지는 모모타로 요크(일본 다끼이 사)를 구입하여 자가수분을 실시하고 F₂ 집단을 얻었으며, 이들에 대하여 병 저항성 검정을 실시하였다.

토마토 종자는 25℃ 인큐베이터에서 최야 시킨 후 50공 연결포트에 한 줄씩 띄워서 파종하고, 재배 환경은 최저 온도는 18-20℃ 정도, 최고 온도는 30-35℃ 정도로 하여 유리온실에서 재배하였다.

2) 균주의 증식 및 접종

토마토의 병 저항성 검정을 위하여 세미니스 코리아(구. 흥농종묘)(주)에서 위조병 레이스 1, 2, 반신 위조병 균주를 분양받았으며, PDA 배지상에서 유지 및 증식하였다. 이들에 대한 병 접종 및 저항성 검정 체계도 인수받아 본 실험에 적용하였다.

위조병 레이스 1, 2와 반신 위조병 균주는 PDA 배지에서 3-4주 동안 배양하여 준비하였고, 본엽 2-3엽기에 접종하였다. 문구용 칼을 이용하

여 한 cell 당 가로, 세로로 각각 한번씩 2번 정도 뿌리를 살짝 가해한 후, 여기에 균주 현탁액의 농도가 1×10^5 spore/ml 수준으로 준비된 균주를 5-7ml 정도씩 분주하였다. 접종 한달 후부터 병 저항성 여부를 육안으로 판별하였다.

나. 연구결과

위조병의 경우, 레이스 1과 2에서 모두 저항성 유전자가 단일 우성 유전자로 결과가 나타났으며, 반신 위조병의 경우도 저항성 유전자가 단일 우성인 것을 접종 결과로 알 수 있었다.

2. 병 저항성 검정 체계 확립 및 저항성 검정

가. 연구재료 및 방법

1) 고추

가) 식물재료 준비

병 저항성 검정 대상 계통으로는 세미니스 코리아(구.중앙종묘)(주)로부터 분양받은 현재 시판되는 품종인 청양, 대명, 가락김장 2호의 양친과 시험교배종인 CA시교의 양친 계통과 서울대학교 박효근 교수팀에서 보유하고 있던 계통 중 국내 재래종인 SP209, SP210, SP211, SP239, 병 저항성 계통인 CM334, PI201232, PI201234, PI201238, AC311, PI159236, PI159261, PBC80, PBC81 등 26개 계통을 이용하였고, 이들에 대해 역병, TMV 저항성 검정을 수행하였다.

나) 균주의 증식 및 접종

고추의 TMV P(0), TMV P(2)에 대해서는 각각 절취엽 검정법과 식물체 접종법을 이용하여 그 저항성 여부를 판정하였다. TMV는 서울대학교 농생물학과에서 분양받아 pathotype 테스트 후 서울대학교 원예학과 육

중학 실험실에서 유지, 증식하고 있는 것을 사용하였다. 균주의 유지와 증식에는 *Nicotiana tobacum* cv. Samsun 'nn'을 사용하였다.

TMV가 증식된 담배 잎을 막자사발에 갈아서 0.2M phosphate buffer(pH 7.4)를 넣고 1:10(W/V)으로 희석하여 접종액을 준비하였다.

절취엽 검정법은 고추가 본엽이 3-4매 전개되었을 때 상위엽을 채취한 후 금강사(Carborundum, 600 mesh)를 묻힌 면봉으로 절취엽을 3-4회 문질러 상처를 내고 여기에 바이러스 즙액을 10여 회 정도 문질러 바이러스를 접종하였다. 접종한 잎은 증류수로 닦아낸 후 종이타올에 물기를 닦고 약 1ml의 증류수가 담긴 시험관에 엽병이 잠기도록 넣은 후 알루미늄 호일로 뚜껑을 만들어 수분의 증발을 억제하였다. 접종 후 25℃에서 배양하고 2-3일 후에 국부 병반의 생성여부를 관찰하였다.

식물체 접종법은 고추의 본엽이 2-3매 전개되었을 때 상위엽에 600 mesh 금강사(Carborundum)를 소량 뿌린 뒤 접종액을 면봉에 적셔 10여회 문지르고 이를 다시 증류수로 세척하였다. 1주일 간격으로 2번 접종하였다.

고추 역병 저항성 검정 체계는 지제부 관주법을 사용하였다. 사용된 균주는 경북대학교 원예학과 김병수 교수님 실험실에서 분양 받은 '영양수비' isolate로 균주의 유지, 증식에는 PDA와 V-8 주스 한천 배지를 사용하였다. 계대배양 10일 정도 지난 후 배지 표면에 형성된 유주자낭을 배지에 찬 증류수를 가하면서 시약 스푼으로 긁어내어 채취하였으며, 이를 두 겹의 거즈에 걸러 불순물 및 균사를 제거하였다. 채취된 유주자는 적혈구계수판을 이용하여 농도를 측정하였으며, 10^5 유주자/ml의 농도로 맞추어 접종에 사용하였다. 병원균의 접종방법은 지제부 관주법을 이용하였으며 그 과정은 다음과 같다. 접종 전 128공 포트에 담겨있는 각 개체에 접종 전날 충분히 관수하여 유주자의 활동에 유리한 조건을 만들어 준 후 다음날 오후에 10^5 유주자/ml의 농도로 식물체당 5ml 씩 지제부에 접종하였다. 접종 이후에는 토양이 마르지 않도록 하루에 1-2회씩 관수하였다. 저항성 여부는 접종 후 1주와 3주 후 2회에 나누어 개체별로 조사하였다.

나) 저항성 판별

절취엽 검정법을 이용한 경우, 접종 후 1일 간격으로 5일 동안 육안으로 검정을 실시하였다. 국부병반이 생성된 것을 저항성으로 판별하고 아무 반응도 일어나지 않는 것을 이병성으로 판별하였다.

식물체 접종법의 경우에는 접종엽에 국부 병반(Local lesion, LL)이 형성되는 개체를 저항성으로 판정하였고 접종 2주 후 줄기 괴저가 나타나는 개체는 이병성으로 판별하였다.

역병의 저항성 판별은 병증이 전혀 나타나지 않는 것을 1, 지체부에 병반이 뚜렷이 나타나면서 위조증상이 나타나는 것을 3, 그리고 병반이 위로 번져 나가고 식물체의 정단부까지 위조가 뚜렷이 나타나 완전 고사했다고 판단된 것을 5로 나타내었으며 2와 4는 각 단계의 중간 정도를 나타내었다. 최종적으로 병증을 나타내지 않았던 1번만을 저항성으로 판단하고, 약간의 병증이라도 나타나는 2-5까지를 이병성으로 하였다.

2) 토마토

가) 식물재료 및 방법

토마토는 모모타로 요크(위조병레이스 1, 2, 반신 위조병, 근부 위조병, ToMV, 선충, 잎곰팡이병, 잿빛 반점병 등 7가지 병에 저항성)를 구입하여 자가수분을 실시하고 F₂ 집단을 얻었으며, 이들에 대하여 병 저항성 검정을 실시하였다.

식물재료 및 방법은 2장 2절의 1에서 기술한 것과 같은 방법으로 하였다.

나) 균주의 증식 및 접종

접종 방법은 앞서 기술한 2장 2절의 1과 같은 방법으로 접종 한 후, 저항성을 판별하였다.

나. 연구 결과

1) 고추의 병 저항성 검정 체계 확립 및 저항성 검정

고추의 TMV P(0), TMV P(2)에 대해서 각각 절취엽 검정법과 식물체 접촉법을 이용하여 그 저항성 여부를 판정하였고, 이 두 방법은 대상 계통들에 있어서 일치하는 결과를 보였다. 따라서, 이후 T₁ 이후 세대에서 TMV에 대한 병 저항성 검정은 절취엽 검정법을 이용하기로 하였다.

표 1. 고추 계통별 여러 가지 병에 대한 저항성 검정 결과

Varieties	역병	TMV	TMV	PVY	비고
		P(0)	P(2)		
CM334	R	R	S	R	
PI159236	S	R	R	R	<i>C. chinense</i>
PI159261	-	R	R	R	<i>C. chinense</i>
AC311	R	R	S	-	
PI201232	R	S	S	-	
PI201234	R	S	S	-	
PI201238	R	S	S	-	
청양B	S	S	S	-	
청양C	S	S	S	-	
대명B	S	R	S	-	
대명C	S	R	S	-	
가락B	S	R	S	-	
가락C	S	S	S	-	
시교B	S	R	S	-	
시교C	S	S	S	-	
TAM	-	R	S	-	
veracruz	-	R	S	-	
Tisana	-	S	S	-	
Jupiter	-	S	S	-	
California	-	S	S	-	
wonder	-	S	S	-	
Tabasco	-	R	S	-	<i>C. frutescens</i>
SP209	-	S	S	-	
SP210	-	S	S	-	
SP211	-	S	S	-	
SP239	S	S	S	S	
PBC80	-	R	R	-	<i>C. baccatum</i>
PBC81	-	R	R	-	<i>C. baccatum</i>

3. 가지과 작물의 형질전환 체계 확립

가. 연구 재료 및 방법

1) 제초제 저항성 형질전환에 이용할 효율적인 벡터의 제작

명지대학교 김주곤 교수 팀과 함께 제초제 저항성 유전자인 *bar*와 여러 유용 유전자가 도입되어 있는 고추 및 토마토 형질전환용 vector를 제작하여, 이 중 pSBG-700M, pSBG-700, pSB-RTGM 등을 형질전환에 사용하였다. pSB-700을 제외한 모든 벡터에 MAR sequence를 도입하여 형질전환체 내에서의 도입유전자의 발현 안정성을 도모하고자 하였으며, 제초제 저항성 유전자로는 *bar*를 이용하였다. Plasmid rescue에 사용할 수 있는 pMJ-UA, pMJ-SA, pMJ-21도 함께 제작하였으며, 이것은 병 저항성 유전자와 이병성 유전자를 모두 가지고 있는 일대 교잡종에 이용할 예정이고, 이를 통해 병 저항성 유전자와 가깝게 연관된 개체를 선발하는데 이용할 것이다.

2) 가지과 작물의 형질전환 체계 확립

가) 토마토 형질전환

형질전환 재료로는 모모따로 요크로 F₁ 품종을 사용하였고, 종자는 MS(Murashige & Skoog) 기본 배지에서 무균발아 시켰다. 배양환경은 5000 lux, 온도 25℃, 16/8의 일장조건에서 배양하였다. 발아 후 10일 정도 된 유식물체의 자엽과 하배축을 절편체로 이용하여 전처리 배지(MS salt 4.43g/l, B5 vt., glucose 40g/l, gerlite 2.3g/l, zeatin 2mg/l, acetosyringone 100mM, pH 5.8)에 앞뒷면이 배지에 닿도록 치상하여 하루 동안 배양한 후, *Agrobacterium*을 접종하였다.

Agrobacterium 균주는 tetracycline과 spectinomycin이 첨가된 YEP 액체 배지(Peptone 10g/l, yeast extract 10g/l, NaCl 5g/l, pH 7.0)에서 배양 조건을 180 rpm, 28℃, 암상태로 하여 2일 동안 배양한 후(OD 0.8,

600nm), 원심분리하여 상등액을 제거하고 pallet은 Acetosyringon이 100mM로 첨가된 1/2 MS 액체배지로 희석하여 사용하였다.

Agrobacterium 현탁액에 절편체를 넣고 5-10분 정도 접종 후, 여분의 균액은 멸균 휴지를 이용하여 제거하였고, 접종된 절편체는 전처리 배지(MS 4.43g/l, B5 vt., glucose 40g/l, gerlite 2.3g/l, zeatin 2mg/l, acetosyringone 100mM, pH 5.8)에 잎뒷면이 배지에 닿도록 하여 치상하고 3일 동안 배양하였다.

공동 배양 후 절편체는 timentin(500mg/l)이 첨가된 MS 액체 배지로 10분 정도씩 2번 washing 하고, 멸균 휴지위에서 여분의 균물을 제거하고 적당히 말린 후 신초 유기배지(MS 4.43g/l, B5 vt., glucose 40g/l, gerlite 2.5g/l, zeatin 1mg/l, IAA 0.1mg/l, timentin 500mg/l, phosphinotricin 550 mg/l, pH 5.8)에 치상하였다. 배양조건은 온도 25℃, 16/8의 일장조건으로 하여 배양하였다. 4-8주 사이에 유기된 신초는 발근 유도 배지(MS salt 4.43g/l, sucrose 30g/l, agar 8g/l, IAA 0.1mg/l, pH 5.8)에 옮겨 발근을 유도하였다. 약 2주 후 뿌리가 유기되면 멸균된 상토에 이식하여 습도 100%, 온도 25℃ 항온조건에서 2주정도 순화시킨 후 온실로 이식하였다.

나) 고추 형질전환

세미니스 코리아(주)로부터 분양받은 청양, 대명, 가락김장 2호, CA 시교의 모친 계통과 가락김장 2호의 부친 계통, 국내 재래종인 SP209, SP210, SP211, SP239, 병 저항성 계통인 CM334, PI159236, PBC80, PBC81 등 13개 계통에 대하여 형질전환을 수행하였다.

종자는 70% 에탄올로 30초간, 시판 유한락스(유효염소 4%)를 2%로 희석하여 10분간 침지하여 표면 살균하고 멸균수로 3-5회 세척한 후 MS(Murashige & Skoog) 기본 배지에 치상하여 무균발아 시켰다. 배양환경은 2000 lux, 16/8의 일장조건에서 배양하였으며, 온도는 25℃로 항온조건으로 하였다. 발아 후 9-10일 정도 된 유식물체의 자엽과 하배축을 절편체로 이용하였다.

자엽은 엽병이 포함되지 않도록 양끝을 자르고 전처리 배지(MS salt 4.43 g/l, sucrose 30 g/l, gerlite 2.5 g/l, zeatin 5 mg/l, IAA 0.1 mg/l, pH 5.8)에 잎뒷면이 배지에 닿도록 치상하여 2일 동안 배양한 후, *Agrobacterium*을 접종하였다. *Agrobacterium*은 준비 및 접종은 토마토 형질전환 실험과 동일하게 하였다.

공동 배양 후 절편체는 carbenicillin(500 mg/l)이 첨가된 MS 액체 배지로 10분 정도 washing 하고, 멸균 휴지위에서 여분의 균물을 제거하고 적당히 말린 후 신초유지 배지(MS salt 4.43g/l, sucrose 30 g/l, gerlite 2.5 g/l, AgNO₃ 10 mg/l, zeatin 5 mg/l, IAA 0.1 mg/l, carbenicillin 500 mg/l, phosphinotricin 550 mg/l, pH 5.8)에 치상하였다. 배양조건은 앞에서 언급한 배양환경과 동일하다. 배양 한달 정도 후 유기된 신초 조직은 신초 신장배지(MS salt 4.43 g/l, sucrose 30 g/l, gerlite 2.5 g/l, AgNO₃ 10mg/l, zeatin 5 mg/l, carbenicillin 500 mg/l, phosphinotricin 550 mg/l, pH 5.8)로 옮겨 stem을 유기하였으며, 신장된 신초의 기부는 발근 유도 배지(MS salt 4.43 g/l, sucrose 30 g/l, agar 8 g/l, IAA 0.1 mg/l, pH 5.8)에 옮겨 발근을 유도하였다. 약 2주 후 뿌리가 유기되면 멸균된 상토에 이식하여 습도 100%, 온도 25°C 항온조건에서 2주정도 순화시킨 후 온실로 이식하였다.

다) 다양한 처리에 따른 고추 형질전환 효율의 영향

본 실험의 고추 형질전환 재료인 F₁ 품종을 만들기 위한 기초 실험으로 여러 가지 genotype에 따른 형질전환 효율을 비교하였다. 또한 이러한 형질전환 효율에 영향을 미치는 요인들을 알아보기 위하여 여러 가지 실험을 수행하였다.

생장조절물질인 옥신과 사이토키닌류의 32개 조합(IAA와 2ip, BA, zeatin의 혼용 처리)의 반응에 따른 genotype의 신초 유기율을 살펴 보았다.

형질전환 과정 중 공동배양시 상처처리는 acetosyringone이나 hydroxy-acetosyringone 등의 페놀류 화합물을 분비시켜 재분화율과 형질전환 효율을 향상시키는 것으로 알려져 있는데, 본 실험에서도 이러한

처리가 여러 genotype의 신초유기율에 있어 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 자엽을 한쪽만 절단하는 일반처리 조건과 메스로 일반처리의 자엽에 작은 상처를 준 것과 침을 사용하여 상처를 준 것 등 3가지로 나누어 실험을 수행하였다.

L-cysteine은 anti-necrotic 물질로 상처부위 세포의 괴사를 막아 재분화와 형질전환 효율을 크게 향상시키는 것으로 알려져 있다. 이에 본 실험에서도 이를 고려하여 신초유기배지에 0, 200, 400, 800, 1600 mg/l 농도로 각각 L-cysteine을 처리하고, 여러 genotype 에 있어 신초유기율과 재분화율에 미치는 결과를 알아보았다.

PVP는 난, 할미꽃 등의 조직배양에서 절편체의 절단면으로부터 유출된 페놀화합물을 제거하여 재분화를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 배지내의 페놀 화합물은 산화되어 퀴논으로 변하고 조직 내 효소활동을 억제시켜 배양체를 고사시키는 것으로 알려져 있는데, 이를 제거하기 위하여 신초유기 배지에 PVP를 0, 0.1, 3, 10, 100, 1000 mg/L 농도로 각각 처리하였다.

선발배지에서의 PPT의 적정 선발 농도를 알고자 PPT를 0, 100, 300, 500, 700, 1000, 1500 mg/L 농도로 처리하여 genotype간의 lethal dosage차를 살펴보았다.

라) 캘러스 형성을 위한 고추 재분화 실험

고추 형질전환에 관한 여러 다른 실험실의 결과들을 참고해 본 결과 고추는 절단면에서의 직접적인 신초 유기보다는 캘러스를 통한 간접적인 신초유기가 더욱 바람직한 것으로 고려되었으며, 이에 여러 가지 type의 캘러스를 유기하고자 고농도의 auxin을 처리하여 그 결과를 보았다. 호르몬 조성은 Zeatin(1, 2 mg/l)과 IAA(1, 2, 3, 4, 5 mg/l), NAA(0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 mg/l)를 각각 혼용처리하여 캘러스 발생 및 형태를 관찰하였다.

마) *Agrobacterium strain*에 따른 반응 검정

고추의 형질전환에 있어서 여러 가지 문제점 중에서 infection 단계에서의 문제를 해결해 보고자 감염력이 큰 *Agrobacterium strain*을 사용하여 보았다. 기존의 실험실에서 사용하던 *Agrobacterium*과는 다른 *strain*을 고추 절편체에 접종하고 그 양상을 살펴보았다. 사용 strain은 C58로 A208, A28, control로 A136을 사용하였으며, 이들은 각기 다른 type의 plasmid를 가지고 있다.

3) 형질 전환체 분석

가) 토마토

발근된 소식물체는 온실로 옮겨 형질전환체 분석에 이용하였다. 형질전환체 분석에는 PCR, Southern blot, RT-PCR 등의 방법을 사용하여 *Agrobacterium*의 T-DNA가 식물체의 genome 내로 삽입되었는지의 여부를 조사하였다.

PCR 분석을 위한 DNA 추출 방법은 다음과 같다. 먼저 DNA를 추출하기 위해 토마토의 어린잎 0.1 g을 채취하여 1.5 ml microtube에 넣고 deep freezer (-70°C)에 얼려 두었다가 사용하였다. 잎 시료는 액체 질소에 넣고 곱게 갈아 Extraction buffer (1.4 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 0.5% SDS, 65°C) 1 ml, PVP 0.05 g, β-mercaptoethanol 12.5 μl를 넣고 잘 섞어 준 후 65°C에서 1시간 동안 반응시켰고 Chloroform: isoamylalcohol (24:1)을 동량 넣고 40분간 inverting하였다. 이것을 4°C, 12000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 따서 1 volume의 isopropyl alcohol을 넣고 -20°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 4°C, 12000 rpm에서 5분간 원심분리하여 pellet을 70% Ethanol로 10분씩 두 번 세척하고 spin down시킨 후 pellet은 37°C에서 1시간 정도 건조시킨 후 100-200 μl의 TDW로 녹였다.

PCR 분석에 이용한 primer의 sequence는 sense
5'-GTACCGGCAGGCTGAAGTC-3', antisense

5'-TCGTCAACCACTACATCGAGAC-3'이다. PCR 분석에 이용된 Taq polymerase는 TaKaRa사의 TaqTM을 사용하였고, PCR 반응에 의해 증폭된 DNA들은 1% agarose ethidium bromide gel에서 전기영동한 후 ultraviolet 하에서 관찰하였다.

Southern 분석을 위한 DNA 추출은 변형된 CTAB법을 이용하였다. 잘 전개된 어린 토마토 잎을 약 5 g을 채취하여 액체 질소가 들어있는 막자사발에 넣고 곱게 간 후, Buffer mix를 시료양에 따라 5-10 ml 정도로 첨가한다. Buffer mix는 1 volume DNA ext. buffer (sorbitol 63.75 g/l, Tris base 12.1 g/l, EDTA-Na₂ 1.68 g/l) : 1 volume Nuclei lysis buffer (CTAB 20 g/l, 1M Tris HCl 200 ml(pH 8.0), 0.25M EDTA 200 ml, 5M NaCl 400 ml) : 0.4 volume 5% sarkosyl을 20 : 20 : 8 비율로 섞고 Na bisulfite는 적당량 첨가한다. 시료는 Inversion 후 65°C에 30분 정도 두었다가 5 ml의 chloroform : isopropanol (24 : 1)을 첨가한 후 3분 정도 shaking 한 후 3,500 rpm, 15분 동안 원심분리 하고 상등액은 새로운 tube에 떠낸다. 차가운 isopropanol을 5 ml 첨가하여 DNA가 엉기면 새 tube에 건지고 70% EtOH로 두 번 정도 세척하고 spin down시킨 후 pellet은 상온에서 하루 정도 건조시킨 후 적당량의 TDW로 녹여 사용하였다.

제한효소로 절단한 genomic DNA는 1% agarose gel에 전기영동한 후, gel을 EtBr로 염색(20분)하고 수돗물로 세척, 다시 0.25 N HCl 용액으로 10분간 depurination 시킨 후 수돗물로 세척하고 0.4 N NaOH로 중화시킨 후, 모세관 현상을 이용하여 nylon membrane에 blotting 하였다.

Membrane은 65°C의 hybridization 용액(0.5 M Na₂PO₄, pH 7.2, 1% BSA (Fraction v), 7% SDS, 100 ml 변성된 salmon-sperm DNA)에서 적어도 4시간 이상 pre-hybridization 한 후, 같은 온도에서 probe labeling kit의 방법에 따라 준비된 radio active probe(*bar*)를 이용하여 하루 이상 hybridization 하였다. 2X SSC로 membrane을 세척하고 65°C에서 2X SSC, 0.1% SDS, 1X SSC, 0.1% SDS 용액으로 각각 10분 간 washing 하고 membrane은 X-ray film에 일주일 정도 감광시켰다.

RT-PCR을 위한 RNA 추출은 Tri-reagent()를 이용하여 total RNA를

추출하였고, RT-PCR은 Promega 사의 Access RT-PCR system을 이용하였다.

나) 고추

형질전환 실험에 의해 얻어진 재분화 개체에 대하여는 PCR을 실시하였으며, PCR 분석을 위한 DNA의 추출은 위에 기술한 토마토의 DNA 추출 방법과 같은 방법으로 추출하였다.

4) 제초제 살포에 의한 형질전환체 생물 검정

형질전환 실험에 의해 확보된 많은 재분화 개체들에 대해 분자적 검정을 통하여 확인하는 경우는 시간 및 노력이 많이 소요됨으로, 제초제 저항성 개체를 선발하기 위해서는 생물검정이 보다 확실하다고 생각되어 생물검정에 의한 제초제 저항성 검정방법을 확립하였다.

가) 토마토 및 고추

형질전환 실험에 의한 재분화 개체들은 발근 후 순화되어 온실에서 유지되었으며, 이들에 대해 형질전환체를 선발하기 위한 생물검정을 실시하였다. 보통 과수원에서 사용하는 농도로 하여 시판 바스타 용액을 0.3%의 농도로 살포하였으며, 5일 후부터 제초제 저항성 개체와 감수성 개체를 구별하였다.

5) 고추 병 저항성 계통과 이병성 계통간의 일대교잡세대 작성 및 형질 전환

병 저항성 검정 결과와 앞에서 진행된 여러 genotype에 대한 실험수행 결과에 의한 고추 병 저항성 계통과 이병성 계통간의 일대교잡세대를 작성하고자 하였으며, 이에 이들 F₁에 실험을 수행하면서 여러 가지 요인들(L-cystein, acetosyringone, cutting 방법, AgNO₃ 첨가)에 대한 실험도 함께 수행하였다.

표 2. 고추와 토마토의 형질전환을 위해 제작한 벡터의 특성

벡터 명	특성
pSBG-700M	<i>Act1</i> promoter-GFP 유전자- <i>pin II</i> terminator CaMV35S promoter- <i>bar-nos</i> terminator MAR sequence
pSBG-700	<i>Act1</i> promoter-GFP 유전자- <i>pin II</i> terminator CaMV35S promoter- <i>bar-nos</i> terminator MAR sequence
pSB-RTGM	<i>rbcS</i> promoter-TP-sGFP gene- <i>pin II</i> terminator CaMV35S promoter- <i>bar-nos</i> terminator MAR sequence
pSB-SGM	CaMV35S promoter-sGFP- <i>pin II</i> terminator CaMV35S promoter- <i>bar-nos</i> terminator MAR sequence
pMJ-SA	amp-ori-sen1 promoter-ubi intron-ABF-1 gene- <i>pin II</i> terminator CaMV35S promoter- <i>bar-nos</i> terminator MAR sequence
pMJ-UA	amp-ori-maize ubiquitin promoter-maize <i>adh1</i> intron-ABF-1 gene- <i>pin II</i> terminator CaMV35S promoter- <i>bar-nos</i> terminator MAR sequence
pMJ-21	amp-ori- <i>pin II</i> terminator CaMV35S promoter- <i>bar-nos</i> terminator MAR sequence

도된 신초는 다시 신초 신장배지로 옮겨서 신초를 신장시킨 후 발근배지로 옮겨졌었는데, 새로운 방법에서는 신초신장배지로 옮기지 않고 바로 발근배지로 옮겨 1-2주의 시간을 절약할 수 있었다.

그림 2는 자엽과 하배축을 절편체로 사용하여 신초 유기배지에서 형성되어 나온 신초의 모습을 나타낸 것이다. 이렇게 재분화된 신초는 캘러스로부터 분리하여 발근배지로 옮겨 발근을 유도하였다.

표 3. 모모타로 요크 품종에 맞추어 개선한 토마토 형질전환 체계

배지 종류	변경 전	변경 후
전처리	3% sucrose+0.4% gelrite+0.5mg/l IAA, +4mg/l Kinetin	B5 vt.+4% glucose+0.23% gelrite+1mg/l Zeatin+100μM Acetosyringone
접종액	bacterial sol'n+ 1/2 liquid MS	bacterial sol'n+1/2 liquid MS+100μM Acetosyringone
공동배양	3% sucrose+0.4% gelrite+0.5mg/l IAA +4mg/l Kinetin	B5 vt.+4% glucose+0.23% gelrite+1mg/l Zeatin+100μM Acetosyringone
신초유기	3% sucrose+0.4% gelrite+0.5mg/l IAA +4mg/l Kinetin+500mg/l cb+75mg/l km	B5 vt.+4% glucose+0.25% gelrite+0.5mg/l Zeatin+0.01mg/l IAA+150mg/l tm+550mg/l ppt
신초신장	3% sucrose+0.4% gelrite+0.5mg/l IAA +4mg/l Kinetin+500mg/l cb+75mg/l km	▪
발근	MS+3% sucrose+0.4% gelrite+0.05 mg/l IAA+500mg/l cb+75mg/l km	1/2MS+B5 vt.+3% sucrose +0.8% Agar+0.03mg/l IAA+ 200mg/l ppt

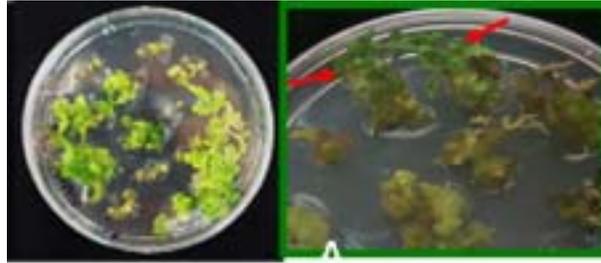


그림 2. 신초 유기배지에서 재분화된 신초의 모습

표 4는 신초유기배지에서 모모따로 요크의 자엽과 하배측에서의 캘러스 및 신초 형성율을 나타낸 것이다. 하배측에서의 캘러스 형성율은 자엽과 비슷하였으나 신초 형성율은 훨씬 떨어지는 것을 알 수 있었다.

표 4. 토마토 모모타로 요크의 Callus 형성율 및 재분화율

	Callus formation (%)	Shooting ratio (%)
자엽	82	52
하배측	88	14

본 실험에 있어서 토마토는 재분화되는 개체에 비해 형질전환체는 상대적으로 낮은 양상을 나타내었는데, 이것은 escape율이 높다는 것을 나타낸다. 선발표지인 PPT 내성 실험 결과, gelrite의 경우 550 mg/l, agar의 경우 650 mg/l를 첨가하는 것이 적정농도로 결정되었지만, 신초 유기배지 위에서 캘러스가 형성되고 여기서 신초가 형성될 때 캘러스 덩어리가 크거나 캘러스가 배지에 닿지 않는 면에서 신초가 재분화 될 경우에는 escape이 많아지는 것으로 사료된다. 큰 캘러스 덩어리는 상대적으로 선발표지인 PPT에 대해 내성이 커지는 것으로 생각되며 캘러스나 신초가 형성될 때에는 절편체로부터 빨리 분리하고 캘러스를 잘게 나누어 새로운 배지에 자주 계대배양 하여 escape의 수를 줄이고 효율적인 실험이 수행될 수 있도록 하여야 할 것이다.

그림 3은 재분화 개체를 순화시키고 후대진진을 위해 온실에서 재배하고 있는 전경을 나타낸 것이다.



그림 3. 형질전환체가 유지되는 온실 전경

나) 고추의 형질전환

청양, 대명, 가락김장 2호, CA시교의 모친 계통과 가락김장 2호의 부친 계통, 국내 재래종인 SP209, SP210, SP211, SP239, 병 저항성 계통인 CM334, PI159236, PBC80, PBC81 등 13개 계통에 대하여 형질전환 수행한 결과는 표 5과 같다.

본 실험에서 가장 형질전환 효율이 좋았던 가락김장 2호의 회복친(가락C)를 CM334와 교배하여 얻은 F₁을 이후의 형질전환 재료로 사용하기로 하였다.

표 5. 계통에 따른 형질전환 효율 검정 결과

계통	Shooting ratio (%)	계통	Shooting ratio (%)
가락B	34.6	SP209	1.4
대명B	56.7	SP210	8.1
시교B	0	SP211	20
청양B	22	SP239	0
가락C	57.5	CM334	0
California Wonder	68.6	PBC81	0
Tisana	94.3	PBC80	0
Jupiter	32.6	PI159236	0
TAM veracruz	0		

다) 다양한 처리에 따른 고추 형질전환 효율의 비교

병 저항성 계통인 CM334, PI159236, PBC80, PBC81은 형질전환 효율이 극히 저조하여 본 과제를 진행하는 데 있어 어려움이 있었으며, 이를 개선하기 위해 여러 가지 시도를 수행하였다.

여러 호르몬 조합에 따른 신초 유기율을 살펴 보기 위하여 IAA와 Zip, BA, zeatin을 혼용 처리하여 그 결과를 보았다. 사이토키닌류 중에서 Zip가 전반적으로 반응이 좋지 않았고 다음이 BA, TDZ순 이였으며, 여러 호르몬 조합 중 가장 좋은 효과를 보인 것은 zeatin 이였다(그림 4, 5, 6).

이와 같은 결과는 각 genotype의 최적호르몬과 이에 따른 적정농도는 각기 다르며, 이것은 각기의 유전형이 가지는 특징으로 생각되어진다. Sweet pepper와 SP210, 대명B, 청양B, 시교B 등에 있어서는 신초의 유기율이 다른 것에 비해 상대적으로 좋았지만 정상적인 stem을 형성하는 shoot의 빈도는 낮았다.

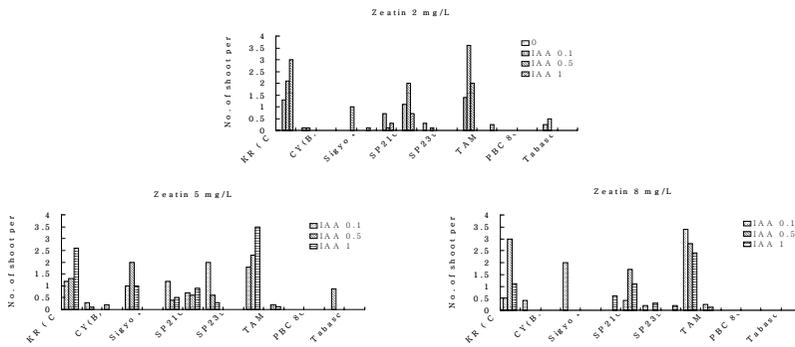


그림 4. Zeatin과 IAA 조합이 신태 형성에 미치는 영향

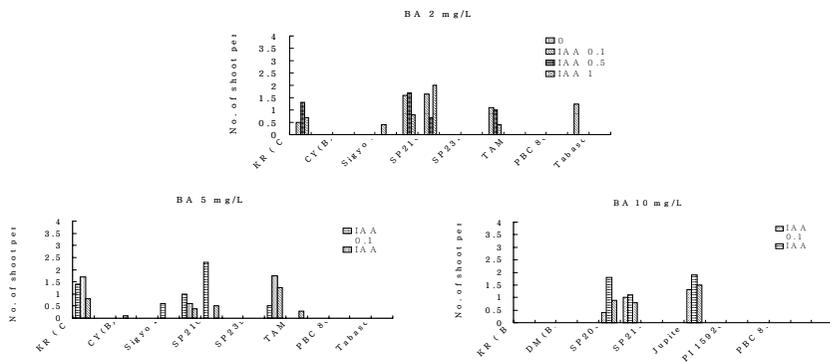


그림 5. BA와 IAA 조합이 신태 형성에 미치는 영향

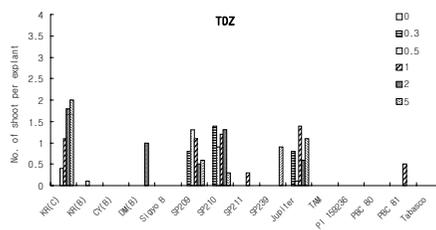


그림 6. 신태 형성에 미치는 TDZ 농도의 영향

는 침에 의한 상처처리가 메스를 이용한 상처처리보다 재분화를 억제시킴을 알 수 있었다(표 7). 가락김장C, Jupiter, CM334, SP209의 경우 상처처리에 의해 신초 유기율이 떨어졌는데, 이는 genotype, 배지성분, 배양환경 등의 요인들이 복합적으로 작용한 것으로 추정되어진다.

표 7. 상처방법이 신초 형성에 미치는 영향

Genotype	Wounding method	No. of explant cultured (A)	No. of explant Regenerated	No. of shoot Regenerated (B)	B/A
KR (C)	control	50	24	52	1.04
	blade	48	31	52	1.08
	needle	58	10	13	0.22
Jupiter	control	30	21	27	0.90
	blade	30	7	15	0.50
	needle	34	9	16	0.47
CM 334	control	30	8	12	0.40
	blade	30	5	11	0.37
	needle	30	4	7	0.18
SP209	control	32	12	27	0.84
	blade	30	4	5	0.17
	needle	29	5	9	0.31

L-cysteine이 고추 재분화에 미치는 영향에 대하여 실험한 결과는 다음과 같다. L-cysteine을 처리할 경우, 고추 자엽은 처리하지 않은 대조구보다 짙은 녹색을 띠었고, 재분화되는 shoot 역시 대조구보다 많았다. 특히 메스로 상처를 준 부위의 초반기 일시적 갈변이 L-cysteine 처리구에서 보다 적게 나타나 상처로 인한 초기 피해가 대조구에 비하여 적은 것처럼 보였다. 신초유기배지에 0, 200, 400, 800, 1600 mg/l 농도로 각각 L-cysteine을 처리했을 때 genotype 별 신초유기율은 다음과 같다(표 8, 그림 7).

L-cystein 처리에 따른 genotype 반응은 가락김장C와 SP209의 경우 400 mg/l, CM334는 200 mg/l, Jupiter 1600 mg/l의 농도에서 자엽의 상태와 신초유기율이 높은 것으로 나타났다. 본 실험에서는 L-cystein의 처리

로 여러 genotype에 따른 신초유기율과 재분화율에 있어 향상된 결과를 얻을 수 있었다.

표 8. 신초형성에 미치는 L-cystein의 영향

Genotype	L - Cystein (mg/L)	No. of explant cultured (A)	No. of explant regenerated	No. of shoot induced (B)	B/A
KR (C)	0	30	7	17	0.57
	200	30	9	19	0.63
	400	30	10	28	0.93
	800	30	9	23	0.77
	1600	30	9	26	0.87
Jupiter	0	30	4	12	0.40
	200	26	9	29	1.10
	400	24	7	25	1.04
	800	21	3	25	1.19
	1600	24	4	36	1.50
CM 334	0	30	2	2	0.07
	200	30	4	8	0.27
	400	30	2	3	0.10
	800	30	4	6	0.20
	1600	30	5	5	0.17
SP 209	0	30	3	5	0.17
	200	30	6	12	0.40
	400	30	16	32	1.06
	800	30	16	26	0.86
	1600	30	10	20	0.67

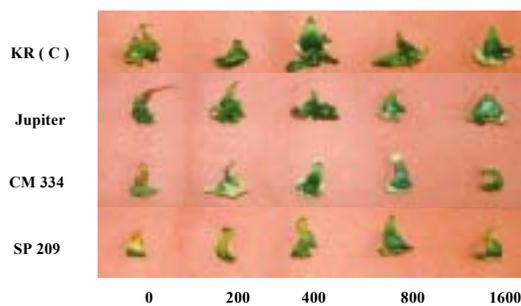


그림 7. 신초형성에 미치는 L-cystein의 영향

신초유기 배지에 PVP를 0, 0.1, 3, 10, 100, 1000 mg/L 농도로 각각 처리하고 그 신초유기율을 조사하였다. 전반적으로 L-cystein 처리에 비해서는 효과는 좋지 않았지만, genotype에 따라 가락김장C는 100 mg/l, CM334 3 mg/l, SP209 0.1 mg/l, Jupiter 10 mg/l의 농도에서 신초유기율이 향상되어진 것으로 나타났다. 그러나 PVP 처리 농도에 따라 신초의 적정 유기율이 다른 것으로 보아 고추 형질전환 과정의 재분화율을 높이기 위해서는 작물과 품종에 따른 적정처리조건을 규명하는 일이 필요함을 알 수 있었다(그림 8).

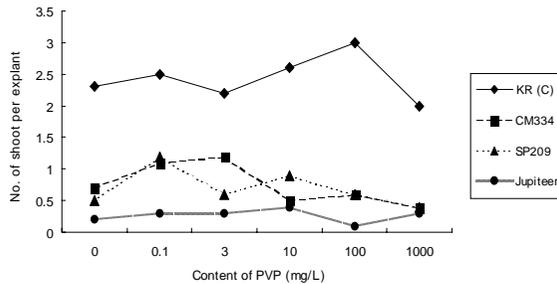


그림 8. 신초유기에 미치는 PVP의 영향

표 9는 선발배지에 PPT를 0, 100, 300, 500, 700, 1000, 1500 mg/l의 수준으로 처리하였을 때 그에 따른 genotype 간 lethal dosage 차이를 나타낸 것이다. 표의 수치는 치상한 자엽의 수치에 대해 일정기간 후 생존한 자엽의 수치를 나타낸 것이다. PPT 처리 후 4-5주 후 반응을 살펴보면, Sweet pepper의 경우 두껍고 질은 엽조직의 특성과 유전형에 따른 특성으로 다른 genotype들에 비해 높은 농도에서도 자엽의 황화 및 고사가 상대적으로 낮았지만, 국내 재래종인 SP209, SP210, SP211, SP239에 있어서는 상대적으로 PPT 500 mg/l의 농도에서 자엽이 황화 고사하여 이들의 조직 배양시에는 PPT의 처리 농도를 낮게 할 필요가 있음을 알 수 있었다. *Capsicum baccatum*인 PBC80, PBC81, *Capsicum frutescence*인 Tabasco는 급격히 자엽의 색깔이 탈색되어 황화가 진행되었지만 *Capsicum*

*chinense*인 I159236과 TAM은 PPT 500 mg/l이상의 농도에서도 다른 genotype에 비해 상태가 양호함을 알 수 있었다(표 9).

그림 9는 CM334의 재분화에 미치는 PPT의 영향을 나타낸 것이다.

표 9. 여러 가지 고추 속에서의 PPT의 lethal dosage의 차이

Species	Variety	PPT concentration (mg/L)						
		0	100	300	500	700	1,00	1,500
<i>C. annuum</i>	KR (C)	1.00	1.00	0.78	0.39	0.17	0.06	0.06
	Tisana	1.00	1.00	1.00	0.67	0.61	0.50	0.11
	California wonder	1.00	1.00	1.00	0.71	0.65	0.35	0.18
	Jupiter	1.00	1.00	1.00	0.60	0.47	0.33	0.07
	Chungyang B	1.00	1.00	0.72	0.17	0.06	0	0
	Daemyung B	1.00	0.94	0.67	0.28	0.17	0	0
	KR (B)	1.00	1.00	0.89	0.44	0.06	0	0
	Sigyo (B)	0.89	0.83	0.56	0.22	0	0	0
	CM334	1.00	0.72	0.33	0.13	0.06	0	0
	SP209	1.00	1.00	0.83	0.17	0.08	0	0
	SP210	1.00	1.00	0.75	0.25	0.06	0	0
	SP211	1.00	0.94	0.75	0.38	0.13	0	0
	SP239	0.88	0.75	0.38	0.25	0.13	0	0
<i>C. chinense</i>	PI159236	1.00	0.88	0.88	0.63	0.19	0	0
<i>C. baccatum</i>	PBC80	0.38	0	0	0	0	0	0
	PBC81	1.00	1.00	0.44	0.06	0	0	0
<i>C. frutescence</i>	Tabasco	0.75	0.75	0.42	0.25	0	0	0

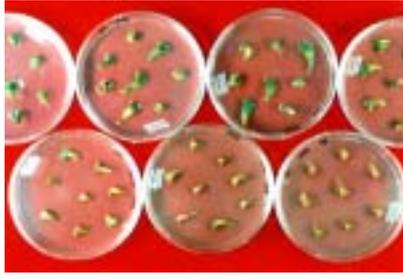


그림 9. CM334의 재분화에 미치는 PPT의 영향(상단 왼쪽부터 0 mg/l, 0.1 mg/l, 0.3 mg/l, 0.5 mg/l, 하단 왼쪽부터 0.7 mg/l, 1.0 mg/l, 1.5 mg/l. 사진은 치상후 3주에 촬영한 것이며, 0.5 mg/l 이상에서는 이후 자엽이 모두 고사하였음)

라) 캘러스 형성을 위한 고추 재분화 실험

농도의 Auxin과 cytokinin을 혼용처리하여 재분화 능력이 높은 캘러스를 유도하고자 하였다. 본 실험실에서 사용하는 고추 형질전환 방법은 직접적으로 신초를 유기하는 것으로 최근의 보고에 의하면 캘러스를 통한 간접적인 신초 형성인 경우 형질전환체일 가능성이 높다고 하였다. 이에 본 실험을 실시하였으며, 호르몬 조합은 Zeatin(1, 2 mg/l)과 IAA(1, 2, 3, 4, 5 mg/l), NAA(0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 mg/l)를 혼용하였다. 그 결과 Zeatin 2 mg/l과 IAA 5 mg/l로 처리한 경우와 Zeatin 1 mg/l과 NAA 0.3 mg/l로 처리한 경우에서 우유빛을 띠며 수분을 많이 포함하지 않고 단단해 보이는 캘러스가 형성되었다(그림 10). 이러한 캘러스는 다른 연구실에서 보고한 바 있는 재분화 능력이 있는 캘러스와 비슷한 양상을 띄고 있음을 알 수 있었다. 비록 아직 이 캘러스에서 재분화 개체를 얻지는 못하였으나 조만간 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

앞으로 이러한 캘러스 형성을 통한 고추 형질전환 실험은 좀 더 깊이 있게 이루어져야 할 것으로 생각된다.

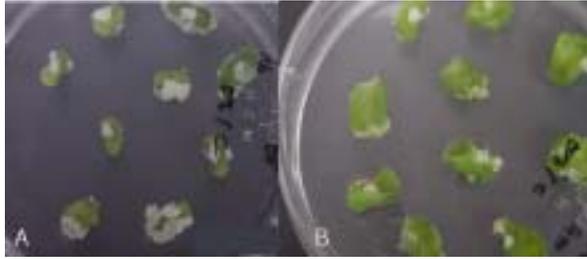


그림 10. 자엽 절편체에서의 캘러스 형성

(A, Zeatin 1 mg/l과 NAA 0.3 mg/l; B, Zeatin 2 mg/l과 IAA 5 mg/l)

마) *Agrobacterium strain*에 따른 반응 검정

고추 절편체를 감염력이 강한 strain C58을 modify 시킨 A208(GV3101), A281(EHA105)로 접종하고 *Agrobacterium*이 절편체의 표면에 붙어있는 모양을 SEM(Scanning electronic microscope)을 이용하여 촬영하였다.

그림 11을 보면 A208(GV3101)이 A281(EHA105)에 비해 절편체의 표면에 많은 *Agrobacterium*이 붙어있는 것을 관찰할 수 있었다. 보통 EHA105가 감염력이 크다고 알려져 있었으나, 수비초를 절편체로 이용한 본 실험에서는 GV3101의 감염력이 더 좋은 것으로 확인되었다. 아직 이 실험을 통한 재분화 개체를 얻지 못하였고 지속적인 실험을 해보아야 하겠지만 이러한 결과로 볼 때, 감염력이 큰 strain을 사용한다면 고추의 형질전환 효율을 좀 더 향상시킬 수 있을 것으로 사료되었다.

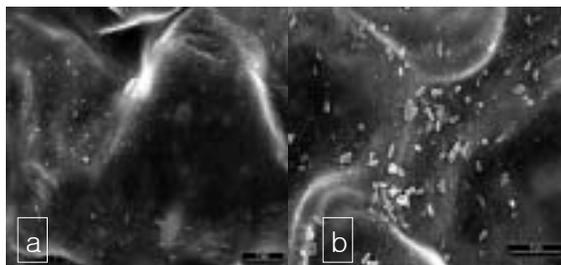


그림 11. *Agrobacterium* infection 단계의 SEM 사진

3) 형질전환체 분자적 검정

가) 토마토 형질전환체의 분자적 검정(PCR, Southern, RT-PCR)

최초로 얻은 몇 개의 형질전환체에 대한 PCR 검정을 수행한 결과 *bar* primer에 의한 PCR 증폭 산물은 450 bp정도에서 14개체가 PCR positive(그림 12) 결과를 나타내었으며, 이 결과로 선발된 식물체내로 원하는 유전자가 성공적으로 도입되었음을 확인할 수 있었다. 또한 이렇게 PCR을 통하여 형질전환 개체를 선발하기 위한 조건에 대해 반복적으로 실험한 결과 다음 표 10과 같은 PCR 분석을 위한 profile을 확립하였다.

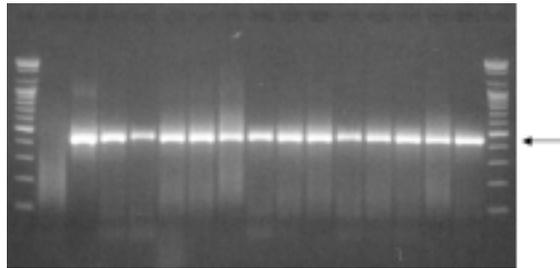


그림 12. 재분화 개체의 제초제 저항성 유전자 *bar*에 대한 PCR 검정 결과 (lane 1, negative control; lane 2, positive control; lane 3-15 형질전환체)

표 10. 모모따로 요크의 형질전환체 분석을 위한 PCR 반응 조건

Step	Cycle	Temperature (°C)	Time (sec)
First denaturation	1	94	300
Denaturation		94	45
Annealing	45	60	45
Extension		72	45
Last extension	1	72	600
Soaking	Forever		

PCR에 의해 확인된 개체에 대해서는 RT-PCR(그림 13)을 실시하였으며 동일한 결과를 얻을 수 있었다. RT-PCR에 대한 profile은 다음 표 11에 명시하였다.



그림 13. 재분화 개체의 제초제 저항성 유전자인 *bar*에 대한 RT-PCR (M, marker; C, cont.; 1-4, 형질전환체)

표 11. 모모따로 요크의 형질전환체를 선발하기 위한 RT-PCR 조건

Step	Cycle	Temperature (°C)	Time (min)
Revers transcription	1	48	45
RNA/cDNA denaturation	1	94	2
Denaturation		94	1
Annealing	45	56	1
Extension		68	2
Last extension	1	68	7
Soaking	Forever	4	

토마토의 T₁ 식물체에 대하여 Genomic southern blot analysis를 실시하여 제초제 저항성 유전자(*bar*)가 식물체 genome 안에 안정적으로 삽입되었는지의 여부를 확인 하고자 하였으며, 그림 14과 같은 결과를 획득하였다. *Eco*R1으로 자른 총 7개체 중 4개체에서 band를 나타냈으며, 비형질전환체에서는 어떤 band도 나타나지 않았다. 이 결과 이들 유전자가 목적 식물체에 삽입되었음을 확인할 수 있었다.

각 genome에 삽입된 제초제 저항성 유전자의 copy 수를 알아보기 위하여 적당한 enzyme으로 처리한 후 southern blot analysis를 실시한 결과를 나타내면 그림 14와 같다.

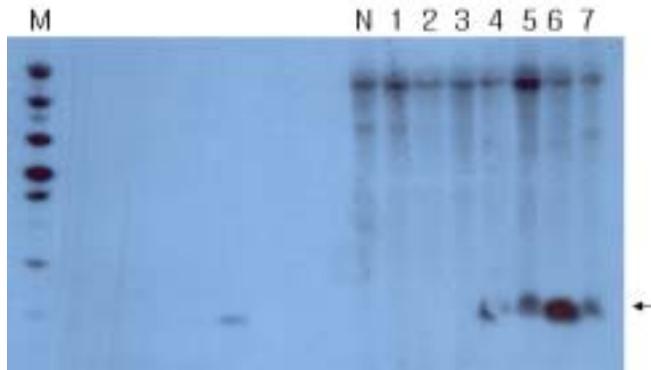


그림 14. 재분화 개체의 제초제 저항성 유전자 *bar*에 대한 southern blot (M, marker; N, negative control; lane 1-3, 비형질전환체; lane 4-7 형질전환체)

이 결과를 토대로 하여 형질전환체에 대한 *bar* 유전자의 삽입 copy 수에 대한 정보를 얻을 수 있었다(표 12).

총 25개체들 중에서 1 copy로 삽입된 개체가 14개로 대략 60% 정도이고, 2 copy인 개체가 5, 3 copy인 개체가 4개로 각각 20% 정도이고, 4 copy인 것은 1개체 있었다. 더 많은 개체에 대하여 copy 수에 대한 southern을 실시(그림 15)하였으나 여러 가지 실험적인 요인들에 의하여

결과가 잘 나오지 않은 것들도 있었다.

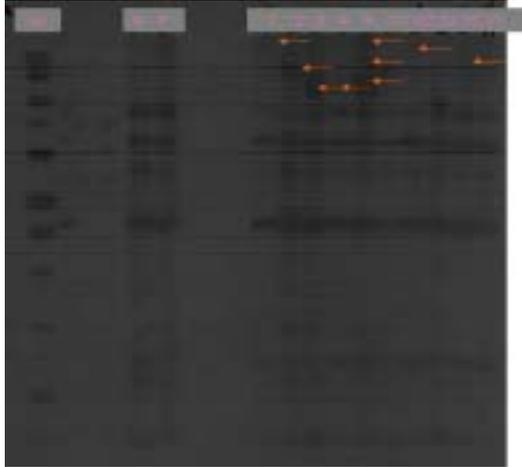


그림 15. 형질전환체에 대한 copy 수 southern 결과
(M, marker; N, negative cont.; P, positive cont.; lane 1-10, 형질전환체)

표 12. 토마토 T₀ 개체에 대한 copy 수 검정

형질전환체 번호	copy 수	형질전환체 번호	copy 수
1	1	22	1
2	1	23	3
3	1	24	2
4	1	25	1
5	3	26	3
10	1	29	1
11	2	30	1
13	2	31	1
15	2	32	1
19	1	33	1
20	1	35	3
21	4	36	2
		37	

*Agrobacterium*을 이용하여 형질전환을 수행하는 경우에는 particle bombardment 보다 목적 유전자가 1 copy로 삽입되는 확률이 높다고 하였는데, 본 실험에서도 비슷한 결과를 보여주었다.

나) 고추 형질전환체의 분자적 검정

고추의 13개 계통에 대하여 형질전환을 수행하였으며, 여기에서 얻어진 재분화 개체에 대하여 목적 유전자인 *bar* 유전자가 제대로 옮겨졌는지 알아보기 위하여 PCR 검정을 실시하였고 양성 반응을 보인 5개체를 확보하였다(그림 16). Lane 4, 5, 7, 8, 9, 10의 개체에서 목적 유전자인 대략 450 bp 크기의 *bar*가 도입되었음을 알 수 있었다.

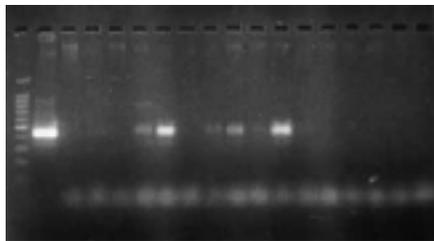


그림 16. 고추 재분화 개체(가락 김장C)에 대한 PCR

4) 형질전환체의 생물검정

가) 토마토

제초제 저항성 개체를 선발하기 위한 생물검정 방법을 개발하였다. 바스타의 처리 농도는 실제 농민들이 과수원에 뿌리는 농도인 0.3%로 하였다.

실험 초기에는 재분화된 개체들을 모두 기내에서 발근시키고 발근된 개체들을 온실에서 순화를 시킨 후 바스타를 처리하였지만, 실험 후반에서는 1차적으로 shoot induction 배지에 ppt가 포함된 배지에서 선발된 개체들을 발근 배지에 옮기고, 발근 10여 일 후 기내에서 0.3% 농도로 바스타

를 직접 뿌려서 2차로 선발하였으며, 여기에서 살아남은 개체들은 온실로 옮겨 순화시키고 다시 0.3%의 바스타를 처리하여 선발하였다. 이렇게 기내에서 한번 더 선발을 하는 것은 비 형질전환체일지도 모르는 식물체를 순화시키는 수고를 덜어줌으로 일의 양을 줄일 수 있어서 좋았다.

그러나 기내 발근 배지에서 발근 시킨 후 바스타를 처리하고 살아남은 개체들을 다시 온실에서 순화 후 바스타를 처리한 결과는 일치하지 않는 경우도 있었다. 즉, 기내에서 실제 과수원에서 뿌리는 농도인 0.3%의 바스타를 처리하였음에도 불구하고 다시 한번 기외 조건에서 같은 농도로 바스타를 처리하였을 때 죽는 개체들이 있었다. 이와 같은 이유는 기내에서의 광의 강도도 자연광과는 다르고 또 다른 환경들이 아무래도 기외의 환경보다는 훨씬 좋기 때문에 escape이 생기는 것이 아닌가 생각된다. 이러한 면에서 볼 때, 기내의 발근된 상태에서 확실하게 제초제 저항성인 개체들만을 선발하고자 할 때에는 바스타의 처리 농도를 달리하거나 배양병의 뚜껑을 열거나 하는 등의 실험을 차후에 실시하여 보아야 할 것으로 사료된다.

그림 17은 0.3%의 바스타 살포에 의한 형질전환체와 비 형질전환체의 생물검정 결과이다. 비 형질전환체는 바스타 살포 3일이 지나면 잎이 연녹색으로 변하고 잎의 끝부분부터 갈색으로 타면서 바깥쪽으로 말리면서 6일 후에는 완전히 고사하였다. 반면 형질전환체의 경우, 바스타 살포전이나 후에도 거의 똑같이 잎의 모양이나 색깔에서 차이가 전혀 없었다.



그림 17. 바스타 0.3% 처리에 의해 선발된 형질전환체 T₀(왼쪽)와 비 형질전환체(오른쪽)의 모습

나) 고추

생물검정법에 의해 형질전환체를 선발하기 위해 토마토와 같은 방법으로 바스타를 살포하였다. 그러나 고추의 재분화 개체들은 거의 모두 바스타에 대해 감수성인 것으로 나타났으며, PCR 분석 결과 positive로 나왔던 개체들도 모두 살포 5일후 부터 잎끝이 누렇게 뜨면서 모두 고사하였다.

5) 고추 병 저항성 계통과 이병성 계통간의 일대교잡세대 작성 및 형질 전환

병 저항성 검정 결과와 형질전환 효율 검정 결과를 토대로 하여 표 13과 같이 교배 조합을 작성하였으며, 주 교배 조합은 CM334와 가락C, PI159236과 대명B로 하여 교배를 계속 진행하였다.

표 13. 제초제 저항성 유전자 형질전환 재료 육성을 위한 교배 조합

이병성 계통 \ 저항성 계통	CM334	HNPC
	청양 C	TMV P(0), 역병 저항성
대명 C	역병 저항성	TMV P(3) 저항성
가락 C	TMV P(0), 역병 저항성	TMV P(3) 저항성
시교 C	TMV P(0), 역병 저항성	TMV P(3) 저항성

PI159236의 TMV P(2) 저항성 유전자는 유전 양상이 명확하지 않았고, 또한 중간 교잡을 통해서 일대교잡세대를 작성하여야 했으므로 그 일대 교잡 종자를 얻는 것이 비효율적이었으며, 그렇게 얻은 일대교잡세대는 임성이 낮아서 F₂를 얻을 수 없는 난점이 있었다. 따라서 본 과제에서 PI159236을 병 저항성 재료로 사용할 경우 후대에서 병 저항성 유전자와 제초제 저항성 유전자의 연관 정도를 확인하는 데 난항을 겪을 것으로 예상되어 본래의 계획에서 제외하였다.

역병과 TMV P(0), PVY에 대한 재료로 사용할 CM334와 국내 이병성 계통 간의 교배를 진행하여 표 14와 같은 결과를 얻었으며, 형질전환을 수행할 수 있는 종자를 확보하였다.

표 14. 국내 이병성 계통과 CM334 계통과의 교잡을 통한 일대교잡세대 확보 결과

조 합	결합률	과당 평균 종자수	확보된 종자수
청양C × CM334	80%	59	11839
대명C × CM334	53%	72	433
가락C × CM334	45%	85	2538
시교C × CM334	60%	71	1923

이 중에서 청양C와 CM334와의 교배에서 얻은 일대교잡종자를 이용하여 형질전환을 수행하였으며, 세미니스 코리아(주)로부터 분양받은 TMV에 대한 병 저항성 유전자를 가지는 상용품종 명성을 분양 받아서 함께 형질전환을 수행하였다. 그 결과 여기에서 multiple shoot를 얻었으며 후의 분석을 위하여 발근 및 신장을 유도하였다(그림 18).



그림 18. 청양C와 CM334와의 일대교잡세대에서 얻은 형질전환 shoot

또한 여러 요인들이 형질전환에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 진행하였다. 절편체의 절단방법이 형질전환 시 신초형성에 미치는 영향에 대하여 알아보하고자 한쪽 및 양쪽을 절단하여 실험을 실시하였다. 청양 R × CM334이나 명성 모두 자엽과 하배측에서 두가지의 절단방법이 큰 차이를 나타내지는 않았다(표 15).

표 15. 절편체의 절단방법이 형질전환 효율에 미치는 영향

절편체	Shooting ratio (%)	
	청양 R × CM334	명 성
	자엽	자엽
한쪽만 절단	55.9	37.5
양쪽 절단	59.4	45.8

L-cystein의 첨가는 고추의 여러 genotype 간의 실험에서 긍정적인 효과를 보인바 있으며, 청양 R × CM334과 명성을 대상으로 실험한 결과는 자엽에서는 청양 R × CM334는 400, 명성은 1000 mg/l를 첨가하였을 때 각각 좋았으며, 하배측은 오히려 무첨가가 더 좋았다(표 16).

표 16. L-cystein의 첨가가 형질전환 효율에 미치는 영향

L-cystein (mg/ℓ)	Shooting ratio (%)			
	청양 R × CM334		명 성	
	자엽	하배측	자엽	하배측
0	37.5	18.5	38.5	16.7
400	72.1	0	63	8.9
1000	79.5	0	25.9	0

Phenolic compound로서 *agrobacterium* 침입 시 virulence 유전자를 활성화시키는 acetosyringone이 형질전환에 미치는 효과를 살펴본 결

과, 청양 R × CM334은 자엽에서는 50 $\mu\text{m}/\text{l}$ 첨가가, 하배축에서는 무첨가가 효과적이었으며, 명성은 자엽 및 하배축 모두 50 $\mu\text{m}/\text{l}$ 첨가가 효과적이었다(표 17).

표 17. Acetosyringone이 형질전환 효율에 미치는 영향

Acetosyringone ($\mu\text{m}/\text{l}$)	Shooting ratio (%)			
	청양 R × CM334		명	성
	자엽	하배축	자엽	하배축
0	25	26.7	3.5	0
50	37.5	4	37.8	7.4

기존의 protocol에서는 preculture, co-culture, shoot induction 배지에 AgNO_3 를 첨가하였는데, AgNO_3 가 에틸렌 저해제로서의 역할 뿐 아니라 bacteria의 성장을 저해함으로써 형질전환 실험에서 co-culture 후에 항생제로 대응할 수 있다는 보고가 있었다. 이에 기존에 co-culture 배지에 10 mg/l을 첨가한 것과 무첨가 시의 형질전환에 미치는 영향에 대하여 알아본 결과 청양 R × CM334와 명성의 자엽과 하배축 모두에서 AgNO_3 를 첨가하지 않았을 때가 더 효과적이었다(표 18).

표 18. AgNO_3 가 형질전환 효율에 미치는 영향

AgNO_3 (mg/l)	Shooting ratio (%)			
	청양 R × CM334		명	성
	자엽	하배축	자엽	하배축
0	64.4	8	54.2	60.8
10	54.4	0	20.8	19.2

표 19은 공동배양 시 pH 정도가 형질전환에 영향을 미친다는 보고 등에 의해 공동배양 배지의 pH를 4.0-6.5까지 다양하게 처리하여 보았을

때의 결과이며, 이때 재분화 배지의 ppt 농도는 750 mg/l로 처리하였다. 재분화 배지의 ppt 농도를 750 mg/l로 올린 결과 재분화되는 신초수는 상당히 많이 줄어든 것을 보였으며, 전체적으로는 처리간에 큰 차이는 보이지 않았다. 정상적으로 발근까지 이루어진 신초는 pH 4.0과 5.0에서 생성되었으며, 생물검정 결과 비 형질전환체로 밝혀졌다.

표 19. 공동배양 배지의 pH가 형질전환 효율에 미치는 영향

pH	Shooting ratio (%)			
	명성		청양 R×CM 334	
	자엽	하배축	자엽	하배축
4.0	0.28	0	0.14	0.3
4.5	0.31	0	0.14	0.3
5.0	0.31	0.4	0.35	0.33
5.5	0.2	0	0.11	0
6.0	0.33	0	0.04	0.2
6.5	0.28	0	0.19	0.22

위와 같이 실험한 결과에 의해 수정된 기본 protocol은 다음의 표 20과 같이 수정되었다.

표 20. 몇가지 변경된 고추 형질전환 체계

배지 종류	변경 전	변경 후
전처리	3% sucrose+0.4% gelrite+5mg/1 Zeatin+0.1mg/1 IAA+10mg/1AgNO ₃ ,	3% sucrose+0.25% gelrite+5mg/1 Zeatin+0.1mg/1 IAA+50μM Acetosyringone+400mg/1 L-cystein,
접종용액	bacterial sol'n+liquid MS	bacterial sol'n+1/2 liquid MS+50μM Acetosyringone
공동배양	3% sucrose+0.4% gelrite+5mg/1 Zeatin+0.1mg/1 IAA+10mg/1 AgNO ₃ ,	3% sucrose+0.25% gelrite+5mg/1 Zeatin+0.1mg/1 IAA+50μM Acetosyringon
신초유기	3% sucrose+0.4% gelrite+5mg/1 Zeatin+0.1mg/1 IAA +10mg/1AgNO ₃ +500mg/1 cb+0.5mg/1 ppt	3% sucrose+0.25% gelrite+5mg/1 Zeatin+0.1mg/1 IAA+10mg/1AgNO ₃ +500mg/1 cb+750mg/1 ppt
신초신장	3% sucrose+0.4% gelrite+5mg/1 Zeatin+10mg/1AgNO ₃ +500mg/1 cb+0.5mg/1 ppt	3% sucrose+0.25% gelrite+5mg/1 Zeatin+10mg/1 AgNO ₃ +500mg/1 cb+750mg/1 ppt
발근	3% sucrose+0.4% gelrite+0.5 mg/1 IAA+250mg/1 cb	1/2MS+1.5% sucrose+0.8% Agar+0.5mg/1 IAA

4. 병 저항성 유전자와 제초제 저항성 유전자가 연관된 개체의 선발

가. 연구 재료 및 방법

병 저항성 유전자와 제초제 저항성 유전자가 연관된 개체를 선발하기 위한 본 과제의 실험 수행방법은 다음과 같다. 먼저 예비실험을 통해 T_1 세대에서 *bar* 유전자에 대해 대략 3:1로 분리하는 개체(*bar* 유전자가 one copy로 삽입)를 찾고, 이러한 T_1 세대를 각각의 병에 대해 대략 150-200여립 정도씩 파종하고 본엽이 2-3매 정도 전개되었을 때 DNA를 sampling 한 후, 0.3%의 바스타로 생물검정을 실시하고, 이 후 살아남은 개체에 대해서는 각각의 병을 인위적으로 접종하고 만들어진 데이터에 의해 연관거리를 구하고자 하였다.

1) 생물검정

가) 토마토($T_1=F_2$ 세대)

1차 년도에 생물검정을 통해 확인된 형질전환체 22개체(T_0)와 2차년도에 생물검정으로 확인된 20개체(T_0), 3차년도에 생물검정에 의해 확인된 11개체는 온실에서 각각 자가수분하여 후대를 진전시키고 종자를 계속적으로 수확하였다. 각 개체들은 유리온실에서 유지하면서, 적계는 200립에서 1,000여립 정도에 이르는 T_1 종자를 수확하였으며, 이렇게 수확한 T_1 종자는 T_1 세대에서의 병 저항성 유전자 및 제초제 저항성 유전자가 함께 분리되는 집단을 찾기 위한 재료로 실험에 사용되었다.

먼저 종자가 1,000립 이상 확보된 T_1 에 대해서는 제초제에 대해 저항성과 이병성인 개체가 3:1로 분리(single copy 삽입)하는 것을 찾기 위하여, T_1 종자를 25°C에서 최아시킨 후, 대략 50여립 정도씩 50공 연결포트에 파종하여 식물체가 본엽 2-3매 정도씩 전개하였을 때 바스타를 0.3%로 하여 생물검정을 실시하였다.

나) 고추($T_2=F_2$ 세대)

농업생명공학원에서 획득한 형질전환체(수비초) -제초제 저항성 유전자가 homo 상태-와 서울대학교 원예육종학 실험실에서 분양한 CM334를 교배하여 얻은 F_1 개체(11개) 종자를 분양받았으며(표 21), 분양받은 F_1 종자는 25°C 인큐베이터에서 최아 시킨 후 50공 연결포트에 파종하였다가 지름 12cm 포트에 이식하고, 유리 온실에서 유지하면서 자가 수분하여 F_2 종자를 수확하였다. 수확한 F_2 종자는 다시 50공 연결포트에 파종하고 본엽 4매시에 0.3% 상용 바스타 용액으로 살포하여 생물검정 하였다.

표 21. 고추 형질전환체와 CM334의 교배조합

형질전환체 번호	교배조합
T_1-1	Bp4-11-8×CM334
T_1-2	Bp5-17-1×CM334
T_1-3	Bp5-17-1×CM334
T_1-4	Bp5-17-1×CM334
T_1-5	Bp5-17-1×CM334
T_1-6	CM334×Bp4-11-8
T_1-7	CM334×Bp4-11-8
T_1-8	CM334×Bp5-17-1
T_1-9	CM334×Bp5-17-1
T_1-10	CM334×Bp5-17-1
T_1-11	CM334×Bp5-17-1

2) 병 저항성 검정

가) 토마토($T_1=F_2$ 세대)

제조체에 대한 분리비 예비실험 결과에서 저항성과 감수성의 분리비가 3:1 정도로 결과가 나온 T_1 세대(single copy로 삽입된 것이 확인된 것)는 그 종자들을 다시 최아시킨 후 50공 연결포트에 한 줄 건너 한 줄 씩 200립 정도 파종하고, 본엽 2매시에 바스타를 0.3%로 처리하여 생물검정을 실시하였고, 살아남은 개체들에 대하여는 병 저항성 여부(위조병 race 1, 2, 반신 위조병)를 확인하였다.

병원 균주의 유지 및 증식과 병원균 접종은 앞서 서술한 제2절의 2와 같은 방법으로 하였다.

위조병 race 1, 2, 반신 위조병은 접종 한 달 이후부터 부정근의 발생 유무, 지체부의 변색, 도관의 변색 등을 지표로 하여 저항성을 판별하였다.

나) 고추($T_2=F_2$ 세대)

TMV P(0)는 서울대학교 농생물학과에서 분양받아 서울대학교 원예학과 육종학 실험실에서 유지, 증식하고 있는 것을 사용하였다. 균주의 유지와 증식에는 *Nicotiana tabacum* cv. Samsun 'nn'을 사용하였다.

TMV P(0)가 증식된 담배 잎을 막자사발에 갈고 0.2M phosphate buffer(pH 7.4)를 넣은 후 1:10(W/V)으로 희석하여 접종액을 준비하였다. 절취엽 검정법은 제2절의 3과 같은 방법으로 실시하였으며, 접종 후 25°C에서 배양하고 2-3일 후에 국부 병반의 생성여부를 관찰하였다.

3) 비파괴 생물검정 방법 개발

가) 토마토

연관거리를 작성하기 위해서 Mapmaker를 이용하는 경우, 병에 대한 저항성 및 이병성 여부, 제조체에 대한 저항성 및 이병성 여부를 확실

하게 알아야 한다. 그러나 제초제를 먼저 살포하고 병 검정을 실시하는 경우나 인위적인 병 접종을 먼저 실시한 후 제초제를 처리하는 경우, 제초제에 감수성인 개체나 또는 병에 이병성인 개체에 대해서는 각각 병에 대한 저항성 및 이병성 여부와 제초제에 대한 저항성 및 감수성 여부를 알 수 없다. 따라서 인위적인 병 접종이나 생물검정 이 둘 중의 한 가지는 비파괴적인 방법을 사용하여야만 한다. 이에 제초제 저항성 여부를 비파괴적인 방법을 실시하여 판별하고자 다음과 같은 3가지 방법에 대하여 조사하였다.

제초제 저항성 유전자의 삽입여부는 첫째 PCR에 의해 *bar* 유전자의 삽입 여부를 확인하는 방법, 둘째 painting에 의한 생물검정 방법, 셋째 biotest로 나눌 수 있다. 이러한 3가지의 방법 중에서 가장 간단하고 결과가 정확한 방법을 찾고자 하였다.

이 실험을 수행하기 위해 우선적으로 생물검정 결과와 PCR에 의한 *bar* gene의 확인 결과, painting에 의한 생물검정 결과, biotest에 의한 결과가 각각 일치하는 지를 알아보기 위하여 T₁ 세대에 대하여 제초제 저항성 유전자의 삽입 여부를 위의 3가지 방법을 함께 사용하여 그 결과가 생물검정 결과와 일치하는 방법을 찾고자 실험을 수행하였다.

PCR을 위한 DNA 추출은 2장 2절의 3과 같은 방법으로 수행하였다. T₁ 개체들은 200립 정도씩 과종하여 본엽이 2-3매일 때 DNA를 sampling을 한 후, 0.3% 바스타를 살포하였다.

Painting에 의한 생물검정법은 토마토의 본엽이 2-3매 정도 되었을 때, 새로 전개된 엽에 엽맥을 중심으로 반은 0.3%의 바스타 용액을 바르고 반은 그대로 두었다. 바스타를 처리하지 않은 잎에는 처리한 잎과 혼동되지 않도록 시판되는 화이트를 이용하여 표시하고 이를 4-5일 후에 판별하였다.

Biotest는 본엽이 2-3매 되었을 때, 상위엽을 채취하여 cork borer를 이용하여 leaf disc(지름 6mm)를 만들고, 이것을 0.005%의 바스타 용액을 적신 filter paper를 넣은 페트리디쉬(지름 5cm) 위에 두고 밀봉하였다. 배양 조건은 온도 25℃, 16/8 일장조건으로 하였으며, 5일 정도 후에

판별하였다. Biotest에 적합한 바스타 농도를 찾기 위해 0.001, 0.0025, 0.005, 0.0075, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1%의 9가지 농도로 실험하였으며, 제초제에 대한 저항성 및 감수성을 판별할 수 있는 농도를 찾고자 하였다.

나) 고추

토마토와 같은 목적으로 비파괴 생물검정 방법을 찾고자 하였으며, 생물검정과 biotest와의 결과 일치율을 확인하기 위하여 두 가지의 생물검정을 실시하였다.

4) 제초제 및 병 저항성 유전자가 연관된 개체의 선발

획득한 형질전환체에서 제초제 저항성 유전자와 병 저항성 유전자와의 연관거리를 알아보기 위하여 Mapmaker/EXP(version 3.0b)를 사용하였다.

나. 연구결과

1) 생물검정 (T_1 - F_2 세대)

가) 토마토

확보된 T_1 종자를 대략 50-100여 립 정도씩 파종하여 식물체가 본엽 2-3매 정도 전개하였을 때 상용 바스타를 0.3%로 살포하여 생물검정을 실시한 결과는 다음의 표 22와 같다.

T_0 -14의 T_1 개체들은 전체 158개체들로 이루어진 각각 3개의 집단(위조병 레이스 1, 2, 반신 위조병 접종용) 중에서 평균적으로 대략 30여 개체가 albino 현상을 보였으나, 이러한 albino 개체들이 실험을 수행하는데 있어서는 별 다른 영향을 주지는 않았다.

그림 19는 형질전환체 T_0 7의 T_1 135개체를 바스타 0.3%로 처리하고 일주일후의 모습이다. 저항성 개체들은 바스타에 의해 전혀 해를 입지 않고 진한 녹색을 나타냈으며, 감수성 개체들은 빠르면 3일 후부터, 늦어

표 22. 토마토 T₁ 세대에서의 제초제에 대한 분리비 검정

T ₁ 번호	Basta에 저항성 개체	Basta에 감수성 개체	발아 갯수	분리비율
T ₁ - 1	86	5	91	
	31	0	31	
T ₁ - 2	69	22	91	약 3 : 1
	65	33	98	
T ₁ - 3	28	8	36	약 3 : 1
T ₁ - 4	17	6	23	
T ₁ - 5	37	4	41	
	19	11	30	
T ₁ - 6	35	10	45	약 3 : 1
T ₁ - 7	39	16	55	약 3 : 1
T ₁ - 8	29	9	38	약 3 : 1
T ₁ - 9	34	13	47	약 3 : 1
T ₁ - 10	79	21	100	약 3 : 1
	65	27	92	약 3 : 1
T ₁ - 11	27	2	29	
	34	2	36	
T ₁ - 13	68	22	90	
T ₁ - 14				
T ₁ - 15	38	12	50	약 3 : 1
T ₁ - 16	69	27	96	
T ₁ - 17	162	13	175	
T ₁ - 18	95	40	135	
	95	38	133	
T ₁ - 19	70	30	100	
T ₁ - 20	68	27	95	약 3 : 1
T ₁ - 21	38	6	44	
	165	9	174	
T ₁ - 22	61	35	96	약 3 : 1
	148	52	200	
T ₁ - 24	34	8	56	
T ₁ - 26	56	0	56	
T ₁ - 34	39	0	39	
T ₁ - 35	72	0	72	
T ₁ - 36	42	14	56	약 3 : 1
T ₁ - 37	34	3	37	

도 5일 후부터는 잎이 연두색으로 변색되었다가 결국에는 누렇게 고사하였다.

제초제 저항성 개체로 살아남은 식물체가 153개, 감수성개체로 죽은 식물체가 50개로, 대략 3 : 1로 분리하여 예비실험의 결과와 일치하였으며, 제초제 저항성 유전자가 single copy로 삽입되었음을 알 수 있었다.



그림 19. 형질전환체 T₀ 7의 T₁ 세대를 바스타 0.3%로 처리한 모습

나) 고추

T₁ 종자를 대략 100여 립 정도씩 파종하여 식물체가 본엽 2-3매 정도 전개하였을 때 바스타를 0.3% 농도로 살포하여 생물검정을 실시한 결과는 다음의 표 23과 같다.

표 23. T₁ 세대에서의 제초제에 대한 분리비 검정(50-200 립 파종)

T ₁ 번호	Basta에	Basta에	발아 갯수	분리비율
	저항성 개체	감수성 개체		
4	72	22	94	약 3:1
5	63	25	88	약 3:1
9	70	17	87	약 3:1
10	82	27	109	약 3:1

형질전환 재료로 사용된 수비초는 *bar* 유전자가 one copy 들어간 것으로 이것이 세대진전을 하였어도 그 다음세대(T₁)에서도 안정적으로 발현하는 것을 알 수 있다.



그림 20. 형질전환체 T₁ 세대를 바스타 0.6%로 처리한 모습

2) 병 저항성 검정(T₁=F₂세대)

가) 토마토

T₁ 집단에서의 토마토 병 저항성 검정을 위하여 세미니스 코리아(주)에서 위조병 레이스 1, 2, 반신 위조병의 병원 균주를 분양받았으며, 이들을 계속적으로 유지하며 병 접종에 사용하였다. 또한 이들에 대한 병 접종 및 저항성 검정 체계도 인수받아 본 실험에 적용하였다.

생물검정을 실시한 후 살아남은 개체들에 대하여 위조병 레이스 2, 반신 위조병을 접종하였으며 그 결과는 표 24와 같다.

시들음병의 경우, 병의 진전이 느려 병을 판별하는데 한달에서 늦게는 2달 정도까지 걸리는 것도 있었다. 그림 21은 제초제를 뿌리고 살아남은 개체에 병(위조병 race 1, 2, 반신 위조병)을 접종한 후의 모습이다.



그림 21. 제초제 처리 후 병 접종한 모습(T₁-14).

왼쪽, 위조병 race 1; 가운데, 위조병 race 2; 오른쪽, 반신 위조병

표 24. 세대의 위조병 레이스 2, 반신 위조병 검정 결과

T ₁ no.	생물검정		위조병 2		생물검정		반신 위조병	
	총	갯수 분리비	총갯수	분리비	총	갯수 분리비	총갯수	분리비
1	190	178:12	178	34:144				
2	160	120:40	120	65:55				
3	158	116:42	116	92:20				
5	168	140:28	140	93:47	173	163:10	163	141:22
6	152	135:17	200	152:48				
7	135	110:49	110	22:88	135	99:36	99	29:70
11	148	138:10	138	31:107				
14	159	110:49	110	22:88	158	113:45	113	11:102
15	187	150:37	150	111:39	188	131:57	131	74:57
17	175	162:13	162	83:79				
18	135	95:40	95	83:12	133	95:38	95	46:49
20	199	155:44	155	143:12				
21	177	168:9	168	143:25	174	165:9	165	85:80
22	200	148:52	148	125:23				

나) 고추

고추의 경우, 세대 진전을 통하여 제일 먼저 T₂ 종자가 확보된 것은 T₀ 9로, 이것에 대하여 TMV P(0)를 절취엽 검정법(그림 22)을 이용하여 접종하고 접종한 다음날부터 1주 동안 병징을 관찰한 결과는 표 25와 같다. TMV P(0)에 대한 저항성의 판별은 국부 병반(Local lesion, LL)이 형성되는 개체를 저항성으로 판정하였고 모자이크 증상을 나타내는 개체는 이병성으로 판단하였다. 그러나 4개체의 경우 아무런 증상을 나타내지 않았는데, 이것은 이 개체가 바이러스에 대하여 완전 immune이거나 이병성일 때에 이러한 증상을 나타낸다는 하였다.



그림 22. T₁ 세대의 TMV P(0)에 대한 절취엽 검정법

표 25. T₁ 세대의 생물검정, 바이러스 저항성 검사

T ₁ no.	생물검정		TMV P(0)	
	총 갯수	분리비	총갯수	분리비
9	87	70:17	86	54:28

3) 비파괴 생물검정 방법 개발

가) 토마토

제초제 저항성 유전자의 삽입여부를 PCR, painting, biotest 3가지로 나누어서 실험을 수행하였다.

PCR에 의한 *bar gene*의 삽입여부 결과는 정확하게 생물검정 결과와 일치하였다. 표 26 (표 26은 실제 data를 조사할 때 편리하게 하기 위하여 128공 육묘용 tray에 한 줄 건너 한 줄 씩 유묘가 심겨져 있던 상태를 그대로 표시한 것임)과 그림 23은 T₁-7에 대한 생물검정 결과와 PCR 결과를 각각 나타낸 것으로 일치하는 것을 알 수 있다. 그러나 PCR을 이용하는 경우, DNA 추출을 위한 sampling과 DNA 추출 및 실험 수행에 노동력과 돈이 많이 들고, sample 수가 많은 경우에는 DNA를 뽑는 과정이 오래 걸리는 단점이 있다. 즉, 본 실험과 같이 대량으로 제조제 저항성 여부를 검정해야 하는 경우에는 적당하지 않은 것으로 판정되었다.

표 26. T₁-7에 대한 생물검정 결과

no. B ^z	no. B						
1 ○	9 ○	17 ×	25 ○	33 ○	41 ○	49 ○	57 ○
2 ×	10 ○	18 ○	26 ○	34 ○	42 ○	50 ○	58 ○
3 ○	11 ○	19 ○	27 ○	35 ○	43 ×	51 ○	59 ○
4 ○	12 ○	20 ○	28 ×	36 ○	44 ○	52 ○	60 ○
5 ○	13 ○	21 ×	29 ○	37 ×	45 ×	53 ×	61 ○
6 ○	14 ○	22 ○	30 ○	38 ○	46 ×	54 ×	62 ○
7 ×	15 ×	23 ○	31 ○	39 ○	47 ○	55 ○	63 ○
8 ○	16 ○	24 ○	32 ×	40 ○	48 ×	56 ×	64 ×

no. B ^z	no. B						
65 ○	73 ○	81 ×	89 ○	97 ○	105 ○	113 ○	121 ○
66 ○	74 ×	82 ○	90 ○	98 ○	106 ×	114 ○	122 ○
67 ○	75 ×	83 ○	91 ○	99 ○	107 ×	115 ×	123 ○
68 ○	76 ○	84 ○	92 ○	100 ○	108 ○	116 ○	124 ×
69 ○	77 ○	85 ×	93 ○	101 ○	109 ○	117 ○	125 ×
70 ○	78 ×	86 ○	94 ○	102 ×	110 ○	118 ○	126 ○
71 ×	79 ○	87 ○	95 ○	103 ○	111 ○	119 ×	127 ○
72 ×	80 ○	88 ○	96 ×	104 ×	112 ○	120 ×	128 ○

no.	B ^z	no.	B												
129	○	137	○	145	○	153	×	161	○	169	×	177	×	185	○
130	×	138	×	146	○	154	○	162	○	170	×	178	○	186	○
131	○	139	×	147	○	155	○	163	○	171	○	179	×	187	×
132	○	140	○	148	○	156	○	164	○	172	○	180	○	188	○
133	○	141	○	149	○	157	○	165	○	173	○	181	○	189	○
134	×	142	×	150	○	158	×	166	○	174	○	182	○	190	○
135	○	143	○	151	○	159	○	167	○	175	×	183	○	191	○
136	○	144	○	152	○	160	○	168	○	176	×	184	○	192	

no.	B ^z	no.	B
193	×	201	○
194	○	202	○
195	×	203	○
196	○		
197	×		
198	○		
199	○		
200	○		

^z:생물검정(0.3% 바스타); ○, 제초제 저항성 개체; ×, 제초제 감수성 개체

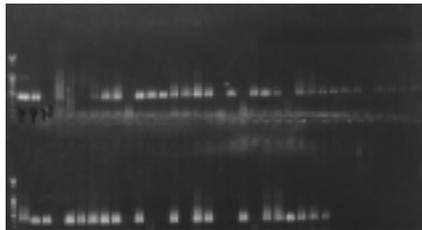


그림 23. T₁ 7에 대한 PCR 검정 결과(bar)

(위)M, maker; lane 1-2, positive cont.; lane 3, negative cont.; lane 4-34, transgenic 1-31; lane 35, transgenic 33; (아래) M, maker; lane 2-16, transgenic 34-48; lane 17, transgenic 50; lane 18-28, transgenic 52-64.

Painting에 의한 결과도 생물검정 결과와 일치하였다. 그러나 이 경우, 좁은 50공 연결포트에서 작업할 때 painting 한 앞에서 바스타 용액이 흘러 다른 잎에 묻거나 또는 잎이 서로 겹쳐져서 바스타 용액이 다른 잎에 묻는 경우가 많았다. 또한 잎에 painting을 할 때에는 잎 뒷면을 받쳐주어야 했으며 이때 바스타 용액이 반대쪽(control 부분)에 묻는 경우도 있었다. 이러한 잎의 반만 painting 하는 방법은 토마토의 잎처럼 차지하는 면적이 넓은 것보다는 고추 잎의 경우에 더 맞는 것으로 사려 되었다.

농업생명공학원의 경우에는 실제 고추 형질전환체를 선발할 때, 바스타를 0.6% 농도로 하여 painting의 방법으로 선발하였다. 결과적으로 좁은 공간에서 대량으로 식물체를 유지하면서 painting의 방법을 사용하는 것은 적절하지 않은 것으로 생각된다.

세 번째 방법인 Biotest에 의해 제초제 저항성 유전자의 삽입여부를 판별한 결과도 다른 2가지 방법과 마찬가지로 생물검정 결과와 일치함을 보여 주었다. 제초제에 대하여 저항성인지 감수성인지를 판별할 수 있는 농도는 여러 처리 농도 중에서 0.005%가 적당한 것으로 확인되었다(그림 24). 감수성인 경우는 바스타 용액의 농도가 0.001%일 때에도 연두색으로 되었다가 바로 탈색되는 것을 확인할 수 있었다.

Biotest는 비교적 간단한 방법이나 cork borer를 이용하여 leaf disc를 만드는 것에 노동력이 많이 필요하였다. 이에 single leaf을 따서 직접 이용하는 것과 leaf disc를 만들어서 이용하는 것의 Biotest 결과가 일치하는 지를 알아보았고, 그 결과가 일치하는 것을 확인하였다.

Biotest는 여러 사람이 한꺼번에 실험을 하였을 경우에도 사람 손에 의한 차이가 없었으며, 3가지 중에서 본 실험의 목적인 대량의 제초제 저항성 검정에 이용할 만한 비파괴 방법으로 생각되었다.

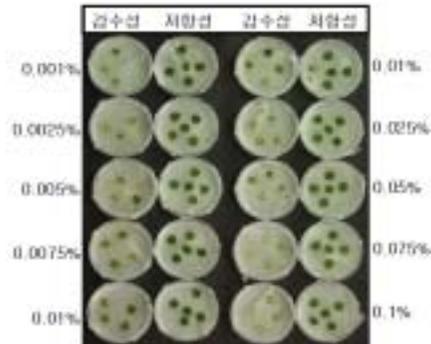


그림 24. 제초제 저항성과 감수성을 구별하기 위한 바스타 농도 test

나) 고추

생물검정을 대신할 수 있는 비파괴 생물검정법을 알아보려고 하였으며 토마토 결과와 마찬가지로 biotest의 결과와 생물검정 결과가 둘 다 정확하게 일치하는 것이 확인되었다.

4) 제초제 및 병 저항성 유전자가 연관된 개체의 선발

고추의 T₁ 9에 대하여 TMV P(0) 접종 결과와 biotest에 의한 생물검정 결과를 가지고 Mapmaker/EXP(version 3.0b) 프로그램을 이용하였으며, 결과는 바이러스 저항성 유전자와 제초제 저항성 유전자가 연관되지 않은 것으로 확인되었다.

제 3 절 연구요약 및 고찰

본 연구는 제초제 저항성 유전자를 형질전환 방법으로 가지과 작물에 도입하고 이를 내병성 육종에 있어서 F₂의 분리세대에 제초제를 살포하여 병 저항성 개체를 얻고자 하는 것을 그 목표로 하였다. 즉, 제초제 저항성 유전자와 병 저항성 유전자가 가깝게 연관된 개체를 선발하여 이것을 종묘 회사의 계통에 여교잡 하고 이를 이용하여 새로운 내병성 육종 선발 기술을 개발하고자 함이다.

이를 위하여 가지과 작물의 형질전환을 수행하였다. 토마토의 경우에는 많은 형질전환체를 생산하였는데, 토마토 형질전환에서 특히 문제가 되었던 것은 재분화되는 신초의 유리화에 의한 것이다. 이러한 개체들은 완전한 신초의 모습을 갖추었으나 발근하지 못하고 그대로 죽어버리는 경우가 대부분으로 정상적인 식물체로 회복되는 경우는 거의 드물었다. 이는 gelling agent의 종류 및 농도, 배양기 내의 환경 조건(가스, 수분, 광, 습도 등), 배지내의 탄소원의 종류 및 농도 등 여러 가지 조건들에 의한 것이라고 알려져 있다.

그러나 배양기내의 미세환경을 조절하기는 매우 어렵다고 알려져 있는데, 본 연구에서는 이 중에서 gelling agent에 대한 실험으로 유리화되는 신초의 비율을 상당히 낮출 수 있었다. 처음 3주 동안에는 신초 유기배지에 gelrite를 2.3 g/l 수준으로 첨가하고, 그 후에는 2.5 g/l로 첨가하였으며, gelrite를 agar로 대체하여 유리화의 비율을 줄일 수 있었다.

이외에도 acetosyringone의 첨가나 선발 배지내 ppt 농도의 수정 등 다른 요인들에 의해서 좀 더 향상된 토마토 형질전환 protocol을 얻을 수 있었으며, 이렇게 하여 얻은 형질전환체의 후대를 진전시켜 T₁(F₂)을 얻었다. 또 이에 대한 병 검정 및 제초제 저항성 검정 체계를 확립하였으며, 60여 개체의 T₁ 세대를 이용하여 병 검정 및 제초제 저항성 검정을 실시하여

병 저항성 유전자와 제초제 저항성 유전자가 연관된 개체를 찾고자 하였으나 아직 10cM으로 연관된 개체는 찾지 못하였다.

고추의 경우, 1차년도 연구 결과로 얻어진 일대 교잡세대와 상용품종인 명성을 이용하여 대량으로 형질전환 실험을 수행하였으나 원하는 결과를 얻을 수 없었다.

다른 여러 가지과 작물들 중에서 고추는 상대적으로 형질전환 실험이 어려운 작물로 알려져 있으며, 여러 다른 실험실에서도 고추의 형질전환 문제로 비슷한 고민들을 하고 있다. 여러 차례의 학회, 형질전환 연구회 등에서 토론되었듯이, 고추는 PCR 등에 의해 유전자가 삽입되었음을 알 수 있었으나 세대를 내려 후대에서 이러한 검정을 해본 결과 삽입된 유전자가 없는 것으로 나타났다고 하였다. 또한 이러한 개체들을 얻었던 실험 방법으로 같은 실험을 진행하였을 때에도 같은 결과가 나오지 않았다고 하였다. 이러한 이유로 이제까지 후대가 진전된 것은 보고 되지 않고 있는 실정이다.

고추의 형질전환에 대한 성공 사례의 보고가 많지 않은 것은 초기의 실험에서는 재분화가 다른 작물들에 비하여 어려웠고, 그 이후에는 *Agrobacterium*과 함께 공동배양 후 재분화 되는 신초가 형질전환이 되지 않은 세포에서 발생하는 비율이 높거나, 공동배양 된 조직으로부터 발생하는 신초의 대부분은 식물체로 유기되지 않는 blind-leaves와 같은 이상한 형태의 잎조직으로 발달하여 생존율이 낮고 또한 이러한 개체는 escape도 많기 때문인 것으로 보고 있다.

본 연구에서는 고추 형질전환 체계를 세우기 위하여 여러 가지 처리에 의한 실험(호르몬, 상처 처리, L-cystein, acetosyringone, AgNO₃, PVP 첨가, PPT 적정 농도 선별)을 수행하였으며, 몇 개의 재분화 개체를 얻었고 PCR에 의해 확인하였으나, 제초제 검정에서는 모두 고사하여 결과적으로 아직 형질전환체는 얻지 못하였다.

그러나 최근 다른 연구실에서 고추 형질전환에 성공했다는 보고가 있었으며, 본 연구에서도 농업생명공학원에서 제초제 저항성 고추 형질전환체를 분양받아 실험을 수행하였다. 즉, *bar* gene에 대해 homo화 되었다고 생

각되는 T_0 와 본 실험실이 보유하고 있는 병 저항성 line과 교배를 수행하여 얻은 $T_1(F_1)$ 을 다시 후대를 진전시켜 $T_2(F_2)$ 을 얻고, 이에 대한 병 검정 및 제초제 저항성 검정 체계를 확립하였으며, 현재 T_2 세대를 이용하여 병 검정 및 제초제 저항성 검정을 실시하여 병 저항성 유전자와 제초제 저항성 유전자가 연관된 개체를 찾고 있다.

본 연구에서 획득하는 고추 및 토마토 형질전환체를 이용하면 T-DNA를 이용한 유전자 클로닝과 분자 지도 작성이 가능할 것이라 기대되며, 이것은 고추·토마토 등의 가지과 작물에서의 연구 수준과 신품종 육성 기술 수준을 세계적 수준으로 올릴 수 있는 계기가 될 것이다. 고추의 경우에는 수비초와 CM334 사이의 F_2 집단을 이용하여 이미 서울대학교 분자생물학 연구실에서 CM334와 칠성초 사이에서 개발해 놓은 분자 표지 지도를 이용해 도입된 제초제 저항성 유전자가 삽입된 위치에 대한 정보를 얻을 예정에 있다.

본 연구에서는 위에서와 같이 토마토 및 고추의 형질전환을 수행하였으며, 이들에 대하여 후대를 진전하여 T_2 세대를 얻었고, 앞으로 이들 개체들에 대해 병 저항성 유전자와 제초제 저항성 유전자가 연관된 개체를 찾기 위해 계속적으로 연구를 진행할 것이다. 또한 종묘회사의 계통들과의 여교잡을 통하여 병 저항성 유전자 근처의 제초제 저항성 유전자를 도입할 것이며, 이것은 내병성 육종에서 재료로 사용되어 새로운 내병성 선발 기술 개발에 이바지 할 것으로 사료된다.

제 3 장 내병성 선발용 표지 유전자의 발현 효율 및 후대 안정성 증진 연구

제 1 절 연구개발 내용

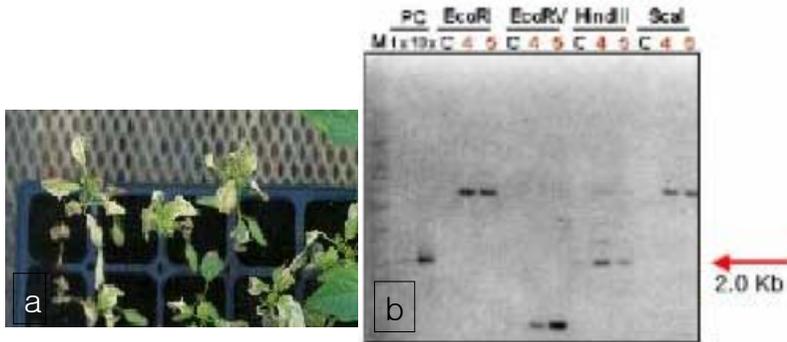
제초제(바스타) 저항성 고추 계통과 병 저항성 고추의 교배육종을 통한 상호연관 계통을 개발하고자 하였다.

1. 제초제 저항성 고추 계통의 개발

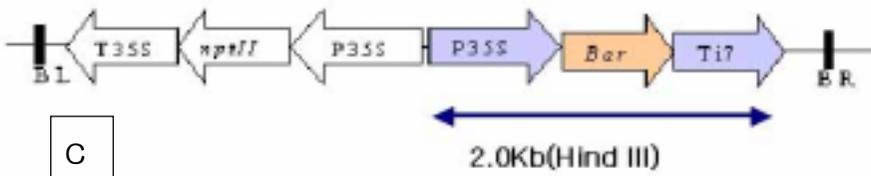
경북 영양지역의 재래종으로부터 유래된 집단 순계 계통을 재료로 하여 *Agrobacterium* 형질전환법을 이용하여 아래(그림 1)의 유전자 운반체가 형질전환 및 발현되는 제초제(바스타) 저항성 고추 식물체를 개발하였다.

제초제 저항성 유전자에 대한 삽입 확인은 genomic southern hybridization으로 도입유전자의 삽입을 확인하였으며, 0.6% 농도의 바스타 살포를 통한 생물검정으로 제초제에 대한 저항성을 확인하였다.

제초제 저항성 고추 식물체는 *Bar* 유전자가 염색체 상에 한 카피 삽입되어 있으며, 멘델의 유전양식을 따르고 있다. 또한 본 연구에 사용한 계통은 T₁, T₂ 세대에서 제초제 저항성 유전자 분리비를 확인 및 선발하여 제초제 저항성 유전자의 발현이 고정된 계통으로 농업생명공학연구원 유전자 제어공학과에서 개발하였다.



- a) 형질전환 고추(T₁)에 대한 제초제저항성 생물검정 결과(바스타 0.6%), 제초제 저항성과 감수성이 분리됨을 확인함.
- b) 형질전환 고추(T₀)에 genomic southern hybridization: 유전자의 도입확인



- c) Agrobacterium 형질전환용 제초제저항성 유전자운반체(binary vector).

그림 1. 제초제저항성 유전자운반체(pCKBar) 형질전환에 의한 형질전환 고추

2. 재료 및 방법

공시재료로는 제초제 저항성 고추 (T₃ lines ; 수비초) 7계통을 사용하였으며, 그것은 BP4-11-4 외 2계통, BP5-17-1 외 3계통, 내병성 계통 (CM334, 명성 2계통) 등이다.

정역교배(test cross)에 의한 Transgenic F₁ 생산은 제초제 저항성 고추 계통(♀) x 내병성(♂), 내병성(♀) x 제초제 저항성 고추 계통(♂)을 이용하였다.

우선 채종한 Transgenic F₁은 제 1세대부과제로 분양하여 세대를 축진하여 Transgenic F₂를 생산하도록 하였다(계통별 100립 이상). 추가적으로 수확된 계통들은 본원에서 전개하여 제초제 생물검정과 도입유전자에 대한 분석을 수행하였다.

자가수분에 의한 Transgenic F₂ 생산은 제초제 생물검정은 바스타라는 상품명으로 시판되는 것을 0.6% 농도로 하여 살포하였으며, 살포 5일 후에 저항성과 감수성을 판별하였다.

바이러스의 내병성 검정은 TMV strain P(0) strain을 이용하여 검정하였다.

제초제 저항성 유전자의 도입 및 발현 확인은 분자적으로는 PCR 및 RT-PCR, Genomic southern hybridization을 실시하였으며, PCR, RT-PCR은 Redasoft Visual Cloning 2000 program 이용하여 Bar gene, NPTII gene, 35S promoter 부분을 검출하였고, Genomic southern hybridization의 Probe는 Bar 단편(P³²)으로 하였다.

고추 형질전환 방법 개선으로 고추 공동배양용 *Agrobacterium* 균주의 형질전환 효율 검정과 floral dipping method를 사용하였다. *Agrobacterium tumefaciens*의 strain은 LBA4404와 EHA105를 이용하였다.

Floral dipping method는 개화 초기의 꽃이 있는 고추 유묘를 목적 유전자가 전환된 *Agrobacterium* 배양액에 일정시간 동안 담가 균을 감염시키고, 이것을 습도가 일정하게 유지되는 곳에서 일정기간 동안 공동배양시킨 다음, 다시 정상적으로 재배하여 공동배양 된 꽃으로부터 결실된 과실을 수확하여 그 후대를 다시 파종하고 형질전환체를 선발하는 방법이다.

3. 연구수행 내용 및 결과

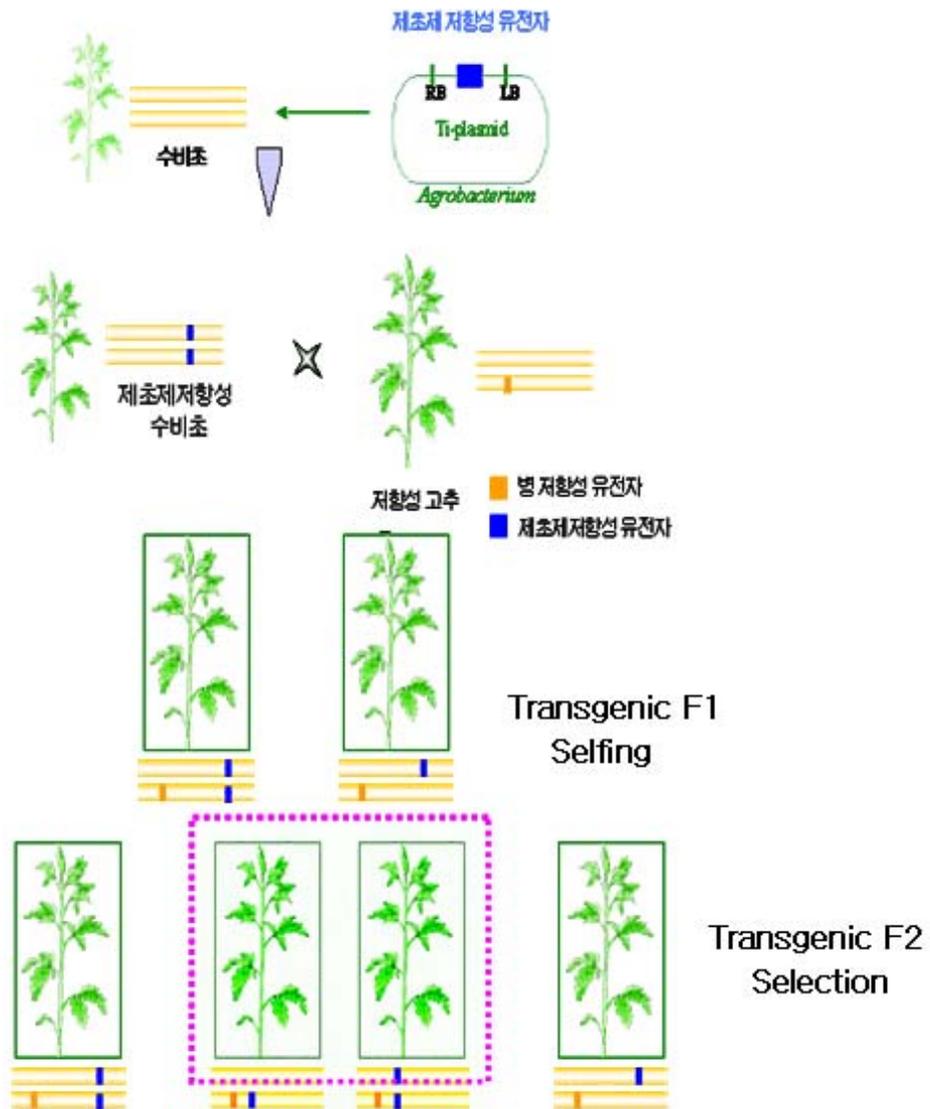


그림 2. 제초제 저항성 유전자와 내병성 유전자가 연관된 개체 선발의 모식도

제초제 저항성 고추(수비초)와 내병성 고추(CM334, 명성)을 정역교배(test cross) 하여 transgenic F₁을 얻었으며, 다시 자식하여 transgenic F₂를 획득하였으며, 제초제 저항성의 생물검정과 내병성 검정을 실시하여 관련 두유전자의 연관개체를 선발하고자 하였으며, 현재 내병성은 검정 중에 있다.

4. 정역교배(test cross)에 의한 Transgenic F₁의 생산



그림 3. 계통교잡에 의한 제초제 저항성 Transgenic F₁ 생산 및 분석

- 내병성 계통인 CM331(우)에 제초제 저항성 계통 수분실시
- Transgenic F₁과 모본(CM331) 표현형 비교 : 수비초 유래의 길어진 과와 엽장 그리고 모본유래의 솜털있는 줄기를 가짐(Transgenic F₁)
- 수비초의 숙과와 제초제 저항성x내병성 계통의 숙과형 비교 : Transgenic F₁이 과경이 굵어지고 과장이 짧아짐.

제초제 저항성 고추 계통 간 변이를 줄이기 위하여 한 주(株)의 내병성 계통만을 이용하여 계통 당 5-10과에 Test cross를 실시하였으며, 교배효율은 CM331을 모본으로 하였을 경우에는 80%이상을 보였지만 부분으로 실시하였을 경우에는 50% 이하의 교배효율을 나타내었다.

교배 계통들에 있어서 생산된 Transgenic F₁은 모본의 표현형을 나타내어 제초제 저항성 계통들에 있어서는 재료로 사용된 수비초의 표현형을 따랐으며, CM331의 경우에는 줄기의 표피와 과형에 있어서 유사하였다.

초기에 수확된 각각의 계통들에 있어서 우선적으로 수확된 계통들은 제1세부과제에 분양하여 Transgenic F₂의 생산과 내병성 검정에 이용하였으며 추후에 수확된 계통들은 본원에서 분석하였다(표 1).

5. 자가수분에 의한 Transgenic F₂ 생산

보다 많은 염색체가 재조합된 계통을 선발하기 위하여 Transgenic F₁의 계통수는 조합별로 1-2개 정도로 작게 설계하였고, Transgenic F₂ 단계에서는 채종 종자(F₁)을 모두 과중·전개하여 연관개체 선발에 이용하고자 하였다.

제초제 저항성과 내병성 유전자를 가진 계통들을 교배에 의하여 두 유전자가 연관된 계통을 육성하기 위하여 얻어진 transgenic F₁에 대하여 제초제 생물검정을 실시하여 자식이 된 계통이나 transgenic이 도입되지 않은 F₁은 제거하였다(내병성 계통이 모본인 경우).



그림 4. 제초제 저항성::내병성 교배계통(Transgenic F₁, F₂)에 대한 제초제 저항성 유전자의 안정 발현 확인을 위한 제초제 저항성 생물검정

- a) 제초제 저항성계통 x 내병성 계통(BP4-11-8 x CM331) 교배 및 생물검정
- b) 내병성 계통 x 제초제 저항성 계통(명성 x BP4-11-8)의 교배 및 생물검정

세대를 단축하기 위하여 50공 연결 육묘판에서 재배하였으나 결실율이 떨어지고 식물체의 형질이 너무 열악해져서 큰 화분(φ 20cm)에 4주식 밀식재배 하면서 화기마다 황산지 봉투를 씌워서 자식을 유도하여, 각 계통별로 3-4과씩 수확하였다. 또한 계통별로 수확된 Transgenic F₂는 50공 육묘포트에 파종하고 제 3-4분엽이 출현할 때 0.6% 바스타로 제초제 생물검정을 실시한 결과는 표1과 같다.

표 1. 제초제 저항성 계통과 내병성 계통간 교배 및 제초제 처리 결과

모본(母本)	부본(父本)	Transgenic F ₁		진행상황		X ² value (0.5<P<0.95)
		제1 과제	제2 과제	제초제 저항성 R(저) / S(감)	병 저항성	
BP4-11-4	CM331		○	38 / 12		0.027
BP4-11-8			○	48 / 15		0.048
BP4-13-4			○	52 / 9		3.415
BP5-17-1						
BP5-17-2						
BP5-22-2						
BP5-22-8				○	38 / 14	
CM331	BP4-11-4		○	45 / 19		0.75
	BP4-11-8					
	BP4-13-4					
	BP5-17-1		○	44 / 14		0.023
	BP5-17-2					
	BP5-22-2					
	BP5-22-8		○	47 / 16		0.005
명성	BP4-11-4		○	88 / 29		0.003 (0.5<P<0.95)
	BP4-11-8		○	108 / 37		0.021
	BP4-13-4		○	18 / 2		2.4

본원에서 수확한 10계통 13과에 대한 0.6% 농도의 제초제 생물검정을 실시한 결과, 8계통 11과는 하나의 우성 유전자 발현에 의한 제초제 저항성과 감수성의 분리비에 대한 카이자승 검정 결과 0.5<P<0.95 구간에서 3 : 1로 분리됨을 확인하였다. 그러나 BP4-13-4을 명성과 CM331에 대하여 모본과 부분으로 사용하여 수확한 Transgenic F₂의 경우에는 5 : 1 또는 9 : 1의 결과를 나타내어 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

이상에서 제초제 저항성 고추로부터 내병성 계통으로 제초제 저항성 유전자가 안정적으로 전달 및 발현되어 단인자 우성 유전자로서 작용함을 확인하였다.

현재 내병성검정을 위하여 제1 세부과제팀으로부터 TMV P(0) strain을 분양받아 멘델의 유전 양식을 따르는 Transgenic F₂에 대하여 내병성 검정을 수행하고 있으며, 또한 이상적인 분리비를 보이는 BP4-13-4이 사용된 교배 조합에서는 재시험을 수행할 예정이다.

6. 제초제저항성 유전자 도입 및 발현양상 확인

GMO detection strip (SDI trait Co. USA)을 이용하여 PAT 유전자의 단백질 발현을 확인한 결과 제초제 저항성 계통에서는 strip 상부의 정상 발현 확인용 대조반응과 하부의 PAT 단백질의 발현 반응을 확인할 수 있었다.

제초제 저항성계통 x 내병성계통(BP4-11-8 x CM331)에 대하여 실시하였으며, 방법 및 반응 시간은 식물체 잎(2x2cm)을 유리봉으로 마쇄하여 500ul의 증류수를 넣고 5-10분간 반응시켰다.

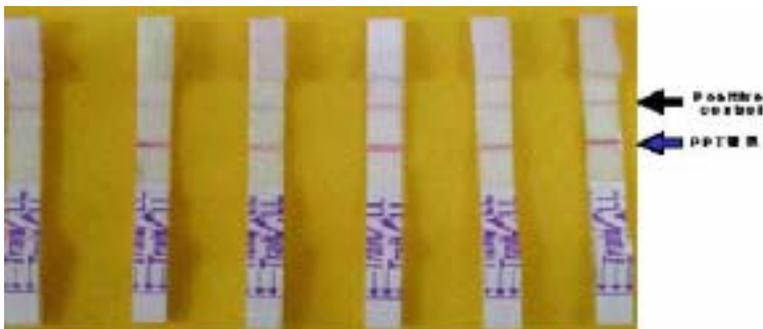


그림 5. 제초제 저항성 ::내병성 교배 계통(Transgenic F₁, F₂)에 대한 제초제 저항성 유전자의 발현 확인을 위한 단백질 수준 검정

유전자 도입 확인용 프라이머 합성은 *Bar* primer set는 5'-CCGTACCGAGCGCAGGAACC-3' (20 mer), 5'-GGCAGCCCCGATGACAGCGACCAC-3' (23 mer)으로 최종산물이 279bp 이다.

35S *Bar* primer set는 5'-GACCCCCACCCACGAGGAGCATC-3' (23 mer), 5'-AGCAGGTGGGTGTAGAGCGTGGAG-3' (24 mer)이며 최종산물은 533bp 이다.

NPTII primer의 최종산물은 500bp 이고, set는 5'-GCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTG-3' (24 mer), 5'-GCATCGCCTTTATCGCCTTCTTG-3' (23 mer) 이다.

내병성 선발용 표지 유전자 발현 효율 및 후대 안정성 증진 연구를 위하여 형질전환체 내의 유전자 삽입 copy 수와 이들의 발현 양과의 상관관계에 대한 분석이 필수적이거나, 고추의 경우 genomic southern blot에 문제점이 있는 것으로 알려져 있으므로 이에 대한 개선 시도와 아울러 대규모 형질전환 집단에 대한 효율적이고 재현성이 있는 PCR용 primer 설계 및 예비실험을 실시하였다.

대량 형질전환에 의한 재분화 개체들에 대한 유전자의 도입을 확인하기 위하여 NPTII, *Bar* 그리고 35S promoter에 대하여 단독 혹은 복수검출용 프라이머를 Redasoft Visual Cloning 2000을 이용하여 설계하였으며 60-65°C 내외의 annealing 온도에서 반응하도록 하였다(그림 6).

56°C의 경우 control과 재분화 고추 모두에서 많은 bands가 형성되었으나, 온도를 증대시킴에 따라 61°C 이상에서는 일부 재분화 고추에서만 목표 PCR 산물이 특이적으로 형성되어 재현성있게 도입 유전자의 발현 분석용 형질전환체 선발에 이용할 수 있음을 확인하였다.

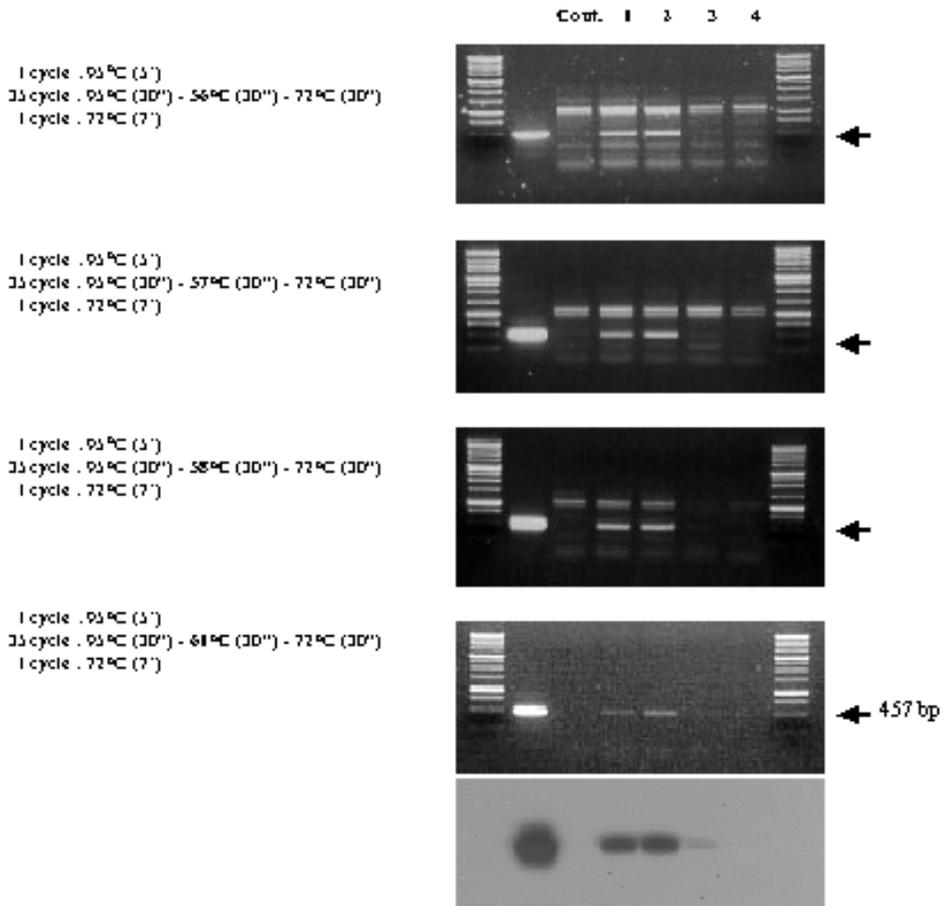


그림 6. 고추 재분화 개체들에 대한 annealing 온도별 PCR.

온도를 증대시킴에 따라 background가 사라지고, 설계한 61°C에서는 3개의 재분화 개체에서만 특이적으로 PCR 산물이 확인됨.

합성되는 최종산물의 길이가 서로 다른 *Bar* 유전자와 NPTII 유전자 단편을 동시에 확인할 수 있는 dual PCR 실시하여 279bp 크기의 *Bar* 단편과 534bp 크기의 NPTII 단편을 동시에 합성하고 유전자의 도입을 확인하였다.

당 PCR은 annealing 온도를 65°C로서 비상동적인 결합을 방지할 수 있는 고온에서 실시한 바 PCR 결과 합성되는 두 종류의 단편은 *Bar*와 NPTII 단편임을 확인할 수 있었다.

PCR 수행에 있어서 최초 사이클에서 고추 genomic DNA를 denaturation시 94°C에서 5분간 실시한 경우에는 비특이적인 단편이 생산되었으나, 95°C에서 7분 동안 실시한 경우에는 특이적인 단편들이 생산되었다. 이것은 타 식물체에 비하여 고추 염색체의 크기가 큰 것에 기인하는 것으로 사료된다.

기본적인 PCR 수행조건은 (5(30")-65°C(30")-72°C(30")으로 35회 반복조건 이었다.

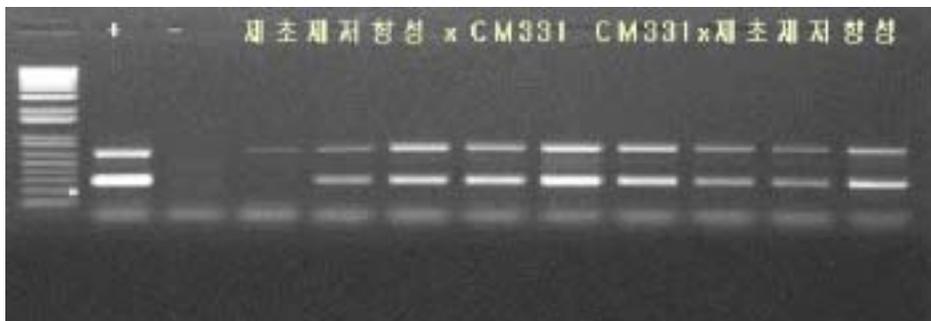


그림 7. 제초제 저항성 고추(Transgenic F₁)에 대한 *Bar*, NPTII 유전자 도입 확인 dual PCR 결과

(UP : NPTII 단편 - 500bp, down : Bar 단편 - 279bp)

제초제 저항성과 CM331 계통의 Transgenic F₁ 계통 일부로부터 RNA를 분리하여 전사단계에서의 상호간 전이되는 transgene(35S-P::*Bar* primer set: 533bp)의 안정적인 도입을 RT-PCR을 이용하여 확인하였다.

RT-PCR 조건은 iNtron사의 One step RT-PCR PreMix kit를 사용하였으며 RNA합성을 위하여 45°C(30')-94°C(15') 1회 반복에 이어 (5(30")-63°C(30")-72°C(30")으로 35회 반복조건 이었다

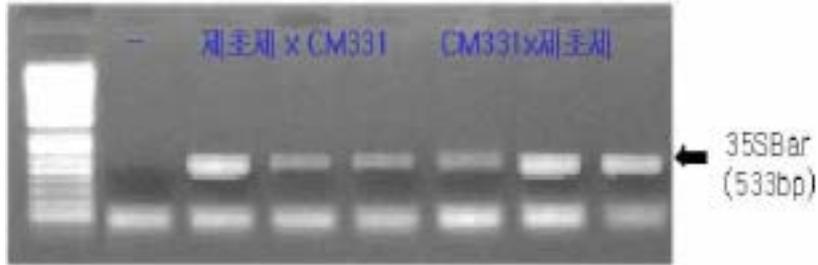


그림 8. 제초제 저항성 유전자와 35S 프로모터 부분을 이용한 제초제 저항성 고추(Transgenic F₁)에 대한 *Bar* 유전자 RT-PCR

(Up : 35SBar 단편, 533bp Down : primer dimer)

7. Transgenic F₁에 있어서 제초제 저항성 유전자 발현 양상 분석

고추 염색체로 도입된 제초제 저항성 유전자의 삽입정도를 확인하기 위하여 positive control로 사용한 유전자 운반체(pCKBar)를 동일한 효소(Hind III)로 절단하여 genomic DNA 30 μ g 당 1 copy(1x) 및 10 copy(10x) 해당 량에 대한 발현량 분석을 실시한 결과 그림 9에서와 같이 검출되었다.

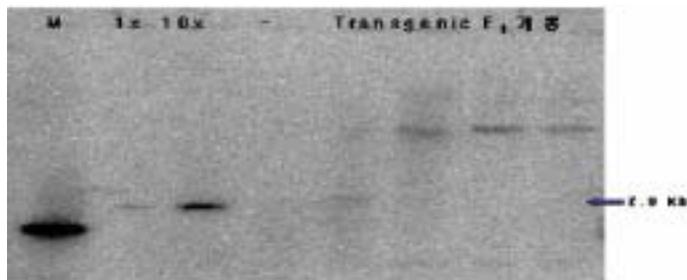


그림 9. 교배계통(Transgenic F₁)에 대한 제초제 저항성 유전자 삽입 양상 확인

총 genomic DNA 양은 30 μ g, 제한효소 HindIII O/N 절단 그리고 *Bar* primer PCR로부터 얻어진 279bp의 단편을 probe(P³²)로 사용함.

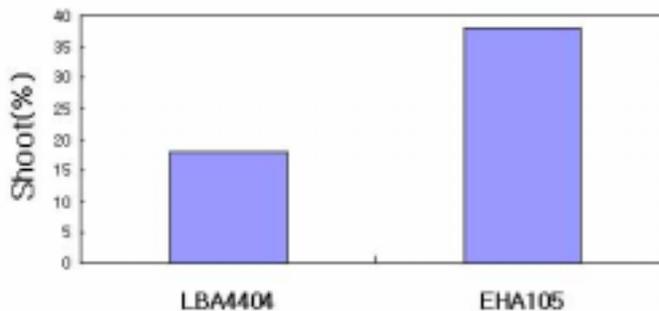
(M : Molecular Marker, 1x, 10x :positive control, - : negative control;
subicho, Transgenic F₁ : 제초제 저항성::내병성 고추)

그림 9에서 보는 바와 같이 2.0 Kb 상위에서 나타난 단편은 그림 1
에서와 같은 양상으로 되는 것으로 보아, genomic DNA가 완전하게 절
단되지 않아서 발생하는 것으로 사료된다.

유전자 운반체를 이용한 copy수 측정 및 제초제 저항성과 감수성의
분리비로부터 내병성 개체로 전이된 제초제 저항성 유전자는 한 copy
로서 단인자 우성으로서 발현됨을 확인할 수 있었다.

8. 고추 형질전환 방법개선

고추의 형질전환 효율 증대를 위하여 사용 균주에 대한 예비실험 결과,
LBA4404 균주를 사용한 경우 신초유기율이 18 % 이었으나 EHA105 균주
에서는 37 %의 높은 신초 유기율을 나타내어 EHA105 균주가 고추 형질
전환에 적합한 것으로 분석되었다.



화분을 이용한 형질전환법을 통한 고추 형질전환 연구는 Floral dipping
방법을 위하여 고추 약으로부터 채취한 화분에 목적 유전자가 도입된
*Agrobacterium*을 표면 처리하였다. 화분의 표면 처리에는 삼투압 조절을
위한 3% sucrose와 여러 가지 농도의 전착제를 처리하여 제웅한 꽃에 인

위수분하여 주었다.

GUS 유전자(pIG121)이 도입된 *Agrobacterium* EHA105를 이용하여 화분에 대한 GUS 일시발현 검정 결과 그림 11과 같이 대조구에 비하여 표면처리구에서 화분세포 전체에 걸쳐서 GUS 유전자가 발현되는 것을 확인하였다.

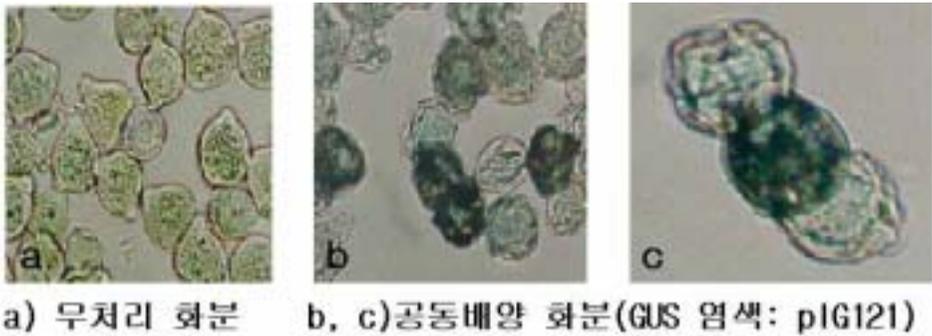


그림 11. 고추 화분에 대한 *Agrobacterium* 표면처리 효과.

화분의 표면처리에 사용한 전착제 농도 효과는 0.05% 농도로 처리한 것이 열배농도(0.5%)로 처리한 것보다 결실시에 과실이 크고 채종량이 25% 증가하였다.

Floral dipping method를 이용하여 결실된 열매는 대조품종과 비교한 결과 기본적인 특성은 동일하였지만 과실의 표면이 고르지 못한 표현형을 보여주었다(그림 12).

또한 채종한 후대종자에 대하여 제초제 생물검정을 실시하였으나 저항성 개체는 획득하지 못하였다.

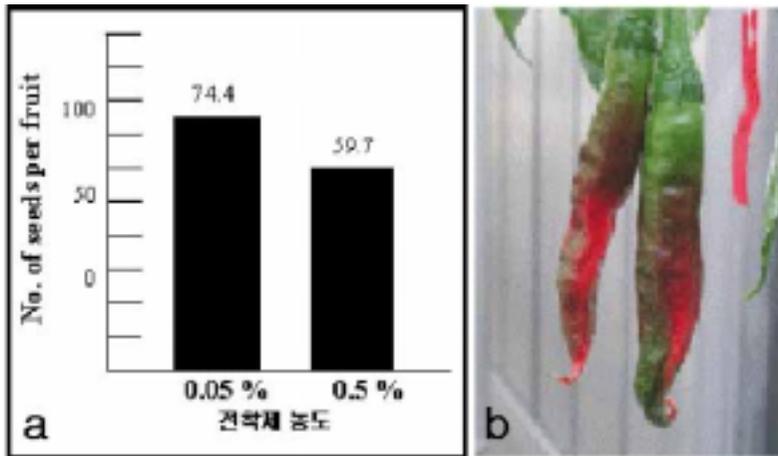


그림 12. Floral dipping method를 위한 고추 화분에 대한 표면처리 첨가제(전착제) 효과 및 처리에 의한 결실 고추

- a) 전착제 농도별 처리효과 : 0.05 % 처리구가 결실 및 채중량이 많다.
- b) Dipping 처리한 고추의 이상 외형

Floral dipping 방법의 개선 방안은 다음과 같다. 인위수분에 의한 방법에 의한 처리에서 형질전환 개체를 얻지 못한 바, 꽃이 핀 유묘 식물체를 이용하여 꽃에 직접적으로 *Agrobacterium* 배양액을 처리하고 진공을 걸어 균의 침투율을 높여 실시하였다.

형질전환 재료준비는 수비초 종자를 50공 연결 육묘포트에 파종하여 30일된 고추 유묘를 개별포트로 잘라내어 밀폐 가능한 플라스틱 통에 집어넣었다.

*Agrobacterium*의 배양은 T₁ 단계에서 제초제 선발이 가능하도록 pCAMBIA3301 (bar selection vector)이 전환된 EHA105 균주를 이용하여 OD₆₀₀ = 0.8 수준으로 배양하였다.



그림 11. Flowal dipping method를 이용한 고추 형질전환 연구

- a) 형질전환 단계 : 균주를 감염시킨 후 진공 용기에 넣음
- b) 공동배양 단계 : 감염된 식물체를 비닐자루에 넣고 배양기 공동배양 (24h)
- c) 식물생육 단계 : 공동배양한 식물체를 온실에서 재배하고 결실 유도
- d) 제초제생물검정 : 후대식물체(T_1)에 대한 0.3% 바스타 생물검정

감염 및 공동배양은 고추 유묘를 거꾸로 들어 *Agrobacterium* 배양액에 30초간 담근 다음 꺼내어 준비한 플라스틱 통에 다시 넣고 진공펌프로 2분간 진공(700mmHg) 상태로 만들어 균의 감염을 도모하였다. 강제감염이 끝난 식물체는 용기에서 꺼내어 검은 비닐자루에 담아 25°C 배양기에 24시간 공동배양 하였다.

재배 및 후대분석은 온실에서 생육시키면서 초기에 열리는 1-2개의 열매를 수확하고 채종하여 T_1 종자를 모두 파종하였다. 초기상태의 유묘에 대하여 0.3% 바스타 용액을 살포하여 제초제 저항성 개체를 선발하였으며

고사되는 시기는 차이가 있었으나, 10일 이내에 모두 고사하였다.

제 2 절 연구결과 요약

1. 제초제 저항성 및 내병성 고추 계통 교배에 의한 Transgenic F₁ 계통 생산 : 7계통의 제초제 저항성 고추와 2 품종의 내병성 고추 계통에 대하여 Test cross에 의한 후대 생산 및 제초제 생물검정 실시하였으며, 또한 이를 제1 세부과제팀에 계통을 분양하였다.

2. Transgenic F₂ 계통 선발 : 차후 선발된 Transgenic F₁ 자식에 의한 후대 생산 및 제초제 생물검정에 의한 제초제 저항성 계통을 선발하고 제초제 저항성과 감수성의 분리비를 확인하였으며, TMV P(0) strain에 대한 내병성 검정은 실시 중에 있다.

3. Transgenic F₁ 계통에 대한 도입유전자의 확인 : 3종의 도입유전자 검출용 프라이머를 이용하여 PCR과 RT-PCR로서 DNA와 RNA수준에서 도입유전자의 삽입을 확인하였으며 또한 대량개체에 대한 간편선발을 위하여 *Bar* 유전자와 NPTII 유전자를 동시에 확인할 수 있는 dual-PCR 방법을 확립하고 후대 계통에 있어서 두유전자가 안정적으로 발현되어 유전하고 있음을 확인하였다.

고추 Genomic southern hybridization을 실시한 바 계통별 30ug의 DNA와 279bp의 PCR 산물을 이용한 *Bar* probe(P³²)를 이용하여 교배계통에 있어서 *Bar* 유전자가 삽입되었음을 확인하였다.

4. 고추 형질전환 방법 개선 : 자엽과 하배축을 재료로 하는 기존의 방법과는 다른 floral dipping method를 이용하여 형질전환 고추를 개발하고자 하였다. 화분이나 꽃에 *Agrobacterium*을 직접 처리하여 수분하거나 또는 공동배양을 실시하여 열매를 채종하였고, 이에 대한 생물검정을 실시한

결과 형질전환 개체를 획득하지는 못하였지만 화분에서는 GUS 양성반응을 나타내는 것을 확인하였음에 충분히 가능성 있는 방법으로 사료되는 바 계속적으로 수행할 예정에 있다.

제 4 장 새로운 내병성 기술의 산업화

제 1 절 서 론

지금까지 식물육종은 인류를 기아로부터 해방시키는 일등 공신의 역할을 하였다. 1980년대 유전자 공학(생명공학)이 초기 이론 연구 수준을 벗어나 응용 및 개발 과정으로 가면서 식물 육종 분야가 크게 각광을 받게 되었다. 여기에 식물육종은 형질전환이라는 완전히 새로운 날개를 달게 되었고, 이에 형질전환에 대한 관심이 증가하면서 이에 대한 많은 연구가 수행되고 있다.

국내의 경우 형질전환 방법에 의한 많은 실험들이 수행되고 있으나 실제 품종의 개발이나 이의 응용실례가 거의 없는 실정이다. 이의 원인에 대해서는 여러 측면에서 검토가 필요하다고 생각되나, 형질전환 연구를 수행하는 연구자들의 식물체 순화 및 유지 증식 실용화에 대한 이해와 경험이 부족하여 후속 연구의 수행이 미진해지는 데 큰 요인이 있는 것으로 판단된다.

본 과제에서는 작물의 순화, 고정, 유지, 증식, 실용화에 대한 많은 경험과 다양한 유전자원 및 실용 계통을 확보하고 있는 세미니스 코리아(주)에서 작물에 형질전환용 계통을 육성하여 서울대학교 형질전환 팀에 공급하고, 병 저항성 유전자와 제초제 저항성 유전자가 연관된 형질전환 개체를 인수받아 순화한 후 종묘회사에서 보유하고 있는 계통과의 여교잡을 통해 제초제 저항성과 연관된 병 저항성 유전자를 도입하여 내병성 육종 재료로서 이용한다. 이 과정에서 실제 선발 포장에서 제초제 살포에 의한 병 저항성 개체 선발 기술의 실용성을 검증한다.

이러한 선발 기술의 실용성이 검증되어 다른 주요 작물들의 실제 내병성 육종에서 이용될 수 있다면 우리나라는 유전공학 분야에서 확실한 주도권의 확보할 수 있을 것이라 사료된다.

제 2 절 연구개발 목표

가지과 작물 중에서 고추는 형질전환에 사용할 계통을 분양하였으며, 토마토는 이병성 check line으로 사용할 BP-8, cardinal 등을 육성하여 증식 및 공급하였으며, 서울대학교에서 형질전환 실험에 의해 확보한 병 저항성 유전자와 제초제 저항성 유전자가 연관된 형질전환 개체를 인수받아 순화한 후 세미니스 코리아(주)에서 보유하고 있는 계통과의 여교잡을 통해 제초제 저항성과 연관된 병 저항성 유전자를 도입하고 내병성 육종 육종 재료로 사용하고자 하였다.

먼저 유용한 병 저항성 유전자를 탐색하여 고추의 형질전환 실험에 이용할 계통을 육성하였으며 육성된 계통들은 증식하여 서울대학교 형질전환 팀에 공급하였다. 이 후 서울대학교에서 획득한 고추 및 토마토 형질전환 개체를 인수받아서 후대를 진전시키고 병 검정과 제초제에 대한 저항성 발현을 검정하였다. 병 저항성 유전자와 제초제 저항성 유전자가 연관된 개체를 선발하고 종묘회사에서 보유하고 있는 계통에 여교잡하여 제초제 저항성 유전자와 연관된 병 저항성 유전자를 도입하고 내병성 육종의 실제 선발 포장에서 제초제 살포에 의한 병 저항성 개체 선발의 가능성을 검증하고자 한다.

제 3 절 연구내용 및 결과

1. 새로운 병 저항성 고추 계통의 도입 및 임성 검정

PI159236으로부터 L³유전자가 도입된 *C. annuum*계통을 서울대학교에 분양하기 위해 증식하였으며, 일대교잡세대 육성에 소요되는 노동력을 줄이기 위해 이 계통에 옹성불임을 도입하기 위하여 옹성불임친과의 교잡을 진행하였다. 서울대학교에서 고추 형질전환 재료로 사용하고 있는 일대교잡

세대의 모·부친인 청양 R, CM334와 L³ 유전자가 도입된 상용품종 명성을 분양하였다.

본 회사의 상용품종의 모·부친계통인 청양B, 청양C, 대명B, 대명C, 가락B, 가락C, 그리고 시험교배종의 모·부친 계통인 시교B, 시교C 계통을 서울대학교 형질전환 팀에 분양하였으며, 이들에 대한 정보를 제공함과 동시에 이들 계통의 형질전환 효율 검정에 쓰일 종자도 증식하여 분양하였다.

2. 병 저항성 유전 연구

가. 고추

1) 연구 재료 및 방법

식물재료는 TMV P(2)와 PVY에 저항성인 PI159236과 TMV P(0), PVY와 역병에 저항성인 CM334를 이병성인 재래종 수비초 계통과 교배하여 얻은 F₂ 세대를 저항성 유전자의 유전 양상 연구에 사용하였다. 종자는 25℃ 암실에서 최아한 후 128공 연결포트에 파종하고, 접종할 때까지 온실에서 재배하였다. 재배 기간 동안의 최저 온도는 15-18℃였고, 최고 온도는 28-32℃였다.

TMV, PVY, 역병 등 균주의 증식과 접종은 서울대학교 원예학과 육종학 실험실에서 유지, 증식하고 있는 것을 분양받아 사용하였으며, 바이러스의 경우 식물체 검정법을, 역병은 지체부 관주법을 사용하였다. 병 접종 후 저항성도 서울대학교의 판별 방법에 의하여 저항성 및 이병성으로 결정하였다.

2) 연구 결과

CM334의 PVY 저항성 유전자는 단일 우성 유전자로 밝혀졌으며, 이 계통의 TMV P(0) 저항성 유전자도 단일 우성 유전자임을 알 수 있었다.

TMV의 경우, P(0) pathotype에 대한 저항성 유전자는 단일우성인 것으로

로 밝힌 바 있으나 P(2)에 대한 저항성 유전자의 유전 양상은 해석하는 데 어려움이 있는 것으로 나타났다. 따라서, P(2) 저항성 유전자를 이용한 과제 진행에는 무리가 있을 것으로 사료되었다.

나. 토마토

토마토는 병 저항성 검정을 위한 이병성 check line으로 BP-8(Fusarium wilt race 1, 2), cardinal(Verticillium wilt, ToMV) 등을 본 회사에서 증식하여 서울대학교에 분양하였으며, 이에 대한 정보 및 종자를 계속적으로 분양하여 원활한 실험 수행을 도왔다.

또한 서울대학교에서 위조병 race 1, 2(Fusarium wilt race 1, 2)와 반신 위조병(Verticillium wilt, ToMV) 검정을 위한 병 접종 방법을 확립하는데 있어서 필요한 균주를 증식하여 분양하였으며, 접종 방법 및 환경에 관한 모든 정보를 제공하였다.

3. 형질전환체의 후대 증식

토마토의 경우, 서울대학교에서 제초제 저항성 유전자가 도입된 형질전환체를 분양받아 그 후대를 진진시켜 F₂ 종자를 확보하고 이것을 다시 서울대학교에 분양하였다. 몇 개체의 T₀ 세대에 대해서는 위조병과 반신 위조병에 관한 접종을 실시하고 제초제를 살포하여 그 분리비를 서울대학교와 공유하였다.

고추는 형질전환체를 얻지 못하여 후대 진진 실험은 이루어지지 못했으나 후에 생명공학원에서 획득한 형질전환체와 CM334 사이의 F₁에 대하여 후대를 진진하여 F₂ 종자를 서울대학교에 분양하였다.

제 5 장 종합 고찰

본 연구의 목표는 국내 뿐 아니라 해외에서도 중요한 채소 작물인 가지 과 작물을 대상으로 하여 제초제 저항성 유전자를 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 형질전환 방법으로 도입하여 기존의 병 저항성 유전자 근처에 제초제 저항성 유전자를 연관시키고 이러한 개체를 내병성 육종의 분리 세대에 있어서 제초제만을 살포하여 병 저항성 개체를 선발하는 기술을 개발하는 것이다.

본 연구의 결과로서 토마토의 효율적인 재분화 체계와 형질전환 체계를 확립하였으며, 세계적으로도 형질전환체에 대한 보고가 거의 없는 고추의 경우 비록 F₁ 품종을 이용한 형질전환 실험에서는 그 개체를 얻지는 못하였지만 이병성 친에 제초제 저항성 유전자가 도입된 형질전환체를 얻을 수 있었으며, 이것을 저항성 친과 교배하여 그 후대를 진전시킬 수 있었다. 이러한 형질전환 기술을 토대로 하여 유전자를 조작하고 이를 목표로 하는 작물에 도입하여 여러 가지 형질의 품종을 생산할 수 있으며, 이것은 전통육종의 한계를 극복할 수 있는 새로운 품종 육성의 수단으로 이용될 수 있을 것이며, 앞으로의 다가오는 종자전쟁 시대에 대비할 수 있는 소중한 자원이 될 것이다.

본 연구에서는 F₁ 개체를 이용하여 형질전환을 수행하였는데, 이는 저항성 계통에 형질전환을 하였을 경우에 따르는 노력을 줄이고자 한 것으로서, F₁ 개체에 형질전환을 수행함으로써 형질전환된 개체 각각마다 이병성 계통과 교잡을 시켜야 하는 번거로움과 또 이에 따라 소요되는 시간과 노력을 형질전환체의 자가수분 후대의 분리세대에서 검정하는 것으로 대체하였다.

과제 전체의 결과로 보았을 때 애초에 이루고자 하였던 제초제 저항성 유전자와 병 저항성 유전자가 연관된 개체를 얻는 결과는 이루지 못하였다. 그러나 토마토의 경우에는 제초제 저항성 유전자가 삽입된 개체를 확

특하였고 이것을 PCR과 southern blot analysis 등의 분자적 수준의 검정과 bioassay의 방법을 통하여 확인할 수 있었다. 또한 T1 분리세대에서 제초제 저항성 유전자가 확실하게 발현된 것으로 보아 후대에서도 안정적인 내병성 육종의 분리포장에서도 확실하게 병 저항성 개체와 이병성 개체를 구별할 수 있어 이 연구가 곧바로 실용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

고추의 경우, 많은 형질전환체를 얻을 수는 없었지만 대량의 형질전환체를 만들어 낼 수 있는 가능성과 이제까지 진짜 형질전환체를 만들 수 있는지에 대한 의문도 풀리는 계기가 되었다. 즉, 제초제 저항성 유전자가 확실하게 삽입된 개체는 상용 바스타 농도의 2배를 살포하더라도 약간의 해는 입지만 고사하지 않았으며, 분자적 검정에서도 확실하게 southern blot analysis 결과를 얻을 수 있었다. 이것은 고추도 역시 토마토와 마찬가지로 제초제 저항성 유전자가 병 저항성 유전자와 연관만 된다면 대규모의 실제 내병성 육종의 분리세대에서도 확실하게 병 저항성 개체를 선발해낼 수 있음을 제시하였다. 또한 고추의 형질전환은 indirect에 의한 재분화 시스템이 형질전환체를 얻는데 유리하다는 것도 알 수 있었다.

결론적으로 본 연구에서 획득한 가지과 작물의 재분화 및 형질전환 체계는 다른 유용한 유전자를 도입하는데 쓰이는 한 편, 또 나아가 이러한 아이디어는 다른 중요한 원예작물의 내병성 육종에서의 선발 기술로서 활용될 수 있으며, Chitinase, glucosidase, RIP 등의 내병성 유전자와 선발마커(bar)가 도입된 벡터를 제작하여 이를 종묘회사의 우수한 계통으로 형질전환하여 새로운 내병성 육종소재를 개발하는 데에 유용하게 이용될 수 있으리라 사료된다.

본 연구를 좀 더 진행하여 이러한 연관 개체를 찾는다면 특허 출원 등의 계획을 가지고 있으며, 본 연구에서 얻어진 토마토 및 고추 형질전환 계통들은 후에는 종묘회사가 보유하고 있는 여러 계통들과의 여교잡을 통해 내병성 육종 재료로 사용될 것이며, 종묘회사의 국제 경쟁력을 높이는

데 일조를 할 것으로 사료된다.

제 6 장 인 용 문 헌

- Baulcombe D. 1999. Arch Virol Suppl 15:189-201
- Bhalla PL, Swoboda I, Singh MB. 1999. PNAS 96(20):11676-80
- Blount JW, Korth KL, Masoud SA, Rasmussen S, Lamb C, Dixon RA. 2000. Plant Physiology 122(1):107-116
- Brigneti, G., J. Garciamas, and D.C. Baulcombe. 1997. Molecular mapping of the potato virus Y resistance gene *Ry_{sto}* in potato. Theor. Appl. Genet. 94(2): 198-203.
- Chen WY, Townes TM. 2000. PNAS 97(1):377-82
- Chen, D.H., M. dela Vina, T. Inukai, D.J. Mackill, P.C. Ronald, and R.J. Nelson. 1999. Molecular mapping of the blast resistance gene, *Pi44(t)*, in a line derived from a durably resistant rice cultivar. Theoretical & Applied Genetics 98(6-7):1046-1053.
- Cogoni C, Macino G. 1999 Curr Opin Microbiol 2(6):657-62
- Crete P, Vaucheret H 1999 Plant Mol Biol 41(1):105-14
- Das, S., J. Rajagopal, S. Bhatia, P.S. Srivastava, and M. Lakshmikumaran. 1999. Assessment of genetic variation within *Brassica campestris* cultivars using amplified fragment length polymorphism and random amplification of polymorphic DNA markers. Journal of Biosciences 24(4):433-440.
- Datta, S.K., K.V. Thara, L. Wang, S.K. Datta, W. Panbangred, and S. Muthukrishnan. 1999. Inheritance, expression, and silencing of a chitinase transgene in rice. Theor. Appl Genet 98:371-378.
- Dejong, W., A. Forsyth, D. Leister, C. Gebhardt, and D.C. Baulcombe. 1997. A potato hypersensitive resistance gene against potato virus x

- maps to a resistance gene cluster on chromosome 5. *Theoretical & Applied Genetics* 95(1-2):246-252.
- Dong, C.Z., C.X. Jiang, and L.X. Feng. 1995. Transgenic tomato and pepper plants containing CMV sat-RNA cDNA. *Acta horticulturae*. 402:78-86.
- Finnegan, J. and D. McElroy. 1994. Transgene inactivation: Plants Fight Back!. *Bio/Technology* 12: 883-888
- Francastel C, Walter MC, Groudine M, Martin DI. 1999. *Cell* 99(3):259-69
- Fuks F, Burger WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. 2000. *Nat Genet* 24(1): 88-91
- Haley, S.D., L.K. Afanador, and J.D. Kelly. 1994(a) Identification and application of a random amplified polymorphic DNA marker for the *I* gene (potyvirus resistance) in common bean. *Phytopathology* 84(2):157-160.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC .1999. *Science* 286(5441):950-2
- Han SJ, Cho HS, You Js, Nam YW, Shin JS, Paek KH.1999. *Mol Cells* 9(4): 376-83
- Han, K.H. 1997. Matrix attachment regions(MARs) as a transformation booster in recalcitrant plant species. *Korean J. Plant Tissue Culture* 24(4):225-231.
- Harper, B.K., S.A. Mabon, S.M. Leffel, M.D. Halfhill, H.A. Richards, K.A. Moyer, and C. N. Stewart, Jr. 1999. Green fluorescent protein as a marker for expression of a second gene in transgenic plants. *Nature Biotechnology* 17: 1125-1129
- Hartl, L., V. Mohler, F.J. Zeller, S.L.K. Hsam, and Schweizer, G. 1999. Identification of AFLP markers closely linked to the powdery mildew

resistance genes *Pm1c* and *Pm4a* in common wheat (*Triticum aestivum* L.) Genome 42(2):322-329.

Hittalmani, S., M.R. Foolad, T. Mew, R.L. Rodriguez, and N. Huang. 1995. Development of a PCR-based marker to identify rice blast resistance gene, *Pi-2(t)*, in a segregating population. Theor. Appl. Genet. 91 (1): 9-14.

Hobe S, Niemeier H, Bender A, Paulsen H. 2000. Eur. J. Biochem. 267 (2):616-624

Horvath, D.P., L.S. Dahleen, J.A. Stebbing, and G. Penner. 1995. A co-dominant PCR-based marker for assisted selection of durable stem rust resistance in barley. Crop Science 35(5):1445-1450.

Hui Shan Guo, Maria Teresa Cervera, Juan antonio Garcia 1998 Gene 206:263-272

Internet Web Site : www.oecd.org/ehs/service.htm

Jacobs JJ, Sanders M, Bots M, Andriessen M,1999 Plant J 20(2)143-152

James C. Global Status of Transgenic Crops in 1997. ISAAA Briefs No. 5-1997.

Jayashanker S., Bagga S., and Phillips G. C. 1997. Hort. Science 32:454(Abstract)

Jean Finnegan and David McElroy. 1994. Biotechnology 12:883-880

Johnes L, Hamilton AT, Voinnet O, Thomas CL.1999. Plant Cell 11(12)2291-2302

Jones PL, Wolffe AP 1999.Semin Cancer Biol 9(5):339-47

Kang G.Q., Azzimonti M.T., Marino R., and Nervo G. 1998. Abstract of Xth EUCARPIA on genetics and breeding of Capsicum & eggplants

pp:220

Kasuga, T., S.S. Salimath, J.R. Shi, M. Gijzen, R.I. Buzzell, and Bhattacharyya, M.K. 1997. High resolution genetic and physical mapping of molecular markers linked to the phytophthora resistance gene *rps1-k* in soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10(9):1035-1044.

Kim, S.J., S.J. Lee, B.D. Kim, and K.H. Paek. 1997. Satellite-RNA-mediated resistance to cucumber mosaic virus in transgenic plants of hot pepper (*Capsicum annuum* cv. Golden Tower). *Plant Cell Reports* 16: 825-830.

Kinoshita T, Yadegari R, Harada JJ Goldberg RB, Fischer RL 1999 *Plant Cell* 11(10)1945-52

Kritchevsky SB 2000. *J Nutr* 130:5-8

Kumapatla, SP, Hall TC 1999 *JUMAB Life* 48(4):459-467

Lee, S.J., B.D. Kim, and K.H. Paek. 1993. *In vitro* plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation from cotyledon explants of hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Golden Tower). *Korean J. plant Tissue culture* 20: 289-294.

Litiere K, van Eldik GJ, Jacobs JJ, Van Montagu M, Cornelissen M. 1999. *RNA* 5(10):1364-73

Liu W., Parrott. W.A., Hildebrand. D.F., Collins G.B., Williams E.G. 1990. *Plant Cell Reports*. 9:360-364

Lu, Z.X., K. Sossey-Alaoui, G.L. Reighard, W.V. Baird, and Abbott, A.G. 1998. Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance, and its application to peach rootstock breeding. *Theoretical & Applied Genetics* 99(1-2):115-122.

Manoharan M., Sreevidya C. S., and Lakshmisita G. 1998. *Plant Science* 131: 77-83

- Marjori A. Matze and Antonius J.M.Matzke 1995.Plant Physiol 107:679–685
- Matzke, M.A. and A.J.M. Matzke. 1995. How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? Plant Physiol. 107:679–685.
- Meyer, P. 1995. Understanding and controlling transgen expression. TIBTECH 13: 332–337.
- Mihalka, V., Szasz A., Fari M., Nagy I.1998. Abstract of Xth EUCARPIA on genetics and breeding of Capsicum & eggplants pp.209–211
- Mlynárová L, A. Loonen, J. Heldens, R.C. Jansen, P. Keizer, W.J. Stiekema, and J.-P. Nap. 1994. Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix-associated region. The Plant Cell 6:417–426.
- Moreau, P., P. Thoquet, J. Olivier, H. Laterrot, and Grimsley, N. 1998. Genetic mapping of *Ph-2*, a single locus controlling partial resistance to *Phytophthora infestans* in tomato. Molecular Plant–Microbe Interactions 11(4):259–269.
- Oberhagemann, P., C. Chatot–Balandras, R. Schafer–Pregl, D. Wegener, C. Palomino, F. Salamini, E. Bonnel, and Gebhardt, C. 1999. A genetic analysis of quantitative resistance to late blight in potato: towards marker–assisted selection. Molecular Breeding 5(5):399–415.
- Panavas T, Weir J, Walker EL 1999.Genetics 153(2)979–91
- Patent No. EP249432 : Transformation and foreign gene expression with plant species. 1989.
- Qi, X., R.E. Niks, P. Stam, and Lindhout, P. 1998. Identification of QTLs for partial resistance to leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley. Theoretical & Applied Genetics 96(8):1205–1215.

- R.E. Voorrips, M.C. Jongerius, and Kanne, H.J. 1997. Mapping of two genes for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in a population of doubled haploid lines of *Brassica oleracea* by means of RFLP and AFLP markers. *Theoretical & Applied Genetics* 94(1):75-82.
- Saito et al.(1989) Annual Meeting of Am. Soc. of Plant Physiology Abstract 77
- Simons, G., J. Groenendijk, J. Wijbrandi, M. Reijans, J. Groenen, P. Diergaarde, T. Van der Lee, M. Bleeker, J. Onstenk, M. de Both, M. Haring, J. Mes, B. Cornelissen, M. Zabeau, and Vos, P. 1998. Dissection of the *Fusarium I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *Plant Cell* 10(6):1055-1068.
- Siva P. Kumpatla, Mahesh B. Chandrasekharan, Lakshminarayan. 1998. *Trends in Plant Science* 3:97-104
- Spiker, S. and W.F. Thompson. 1996. Nuclear matrix attachment regions and transgene expression in plants. *Plant Physiol* 110:15-21.
- Strauss E 1999 *Science* 286(5541):886
- Sun FL, Elgin SC.1999 *Cell* 99(5):459-62
- Tai, T., D. Dahlbeck, R.E. Stall, J. Peleman, and Staskawicz, B.J. 1999. High-resolution genetic and physical mapping of the region containing the *Bs2* resistance gene of pepper. *Theoretical & Applied Genetics* 99(7-8):1201-1206.
- Thomas Thykaer, Jorgen Finnemann 1997 *Plant molecular Biology* 35:523-530
- United States Patent Number 5262316 : Genetically Transformed Pepper Plants and Methods for their Production. 1993.
- van der Voort, J.R., K. Kanyuka, E. van der Vossen, A. Bendahmane, P. Mooijman, R. Klein-Lankhorst, W. Stiekema, D. Baulcombe, and

Bakker, J. 1999. Tight physical linkage of the nematode resistance gene *Gpa2* and the virus resistance gene *Rx* on a single segment introgressed from the wild species *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* CPC1673 into cultivated potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12(3):197-206.

van der Voort, J.R., W. Lindeman, R. Folkertsma, R. Hutten, H. Overmars, E. van der Vossen, E. Jacobsen, and Bakker, J. 1998. A QTL for broad-spectrum resistance to cyst nematode species (*Globodera spp.*) maps to a resistance gene cluster in potato. *Theoretical & Applied Genetics* 96(5):654-661.

Voinnet O, Pinto YM, Blaulcombe DC 1999 *PNAS* 96(24):14147-52

Vos, P., G. Simons, T. Jesse, J. Wijbrandi, L. Heinen, R. Hogers, A. Frijters, J. Groenendijk, P. Diergaarde, M. Reijans, J. Fierens-Onstenk, M. de Both, J. Peleman, T. Liharska, J. Hontelez, and Zabeau, M. 1998. The tomato *Mi-1* gene confers resistance to both root-knot nematodes and potato aphids. *Nature Biotechnology* 16(13):1365-1369.

Wang Y. W., Yang M. Z., Pan N. S., and Chen Z. L. 1991. *Acta Bot Sin.* 33: 780-786

Ye X, Al-Babili S, Kloti A, Zhang J, Lucca P 2000 *Science* 287(5451):303-305

Zhu Y. X., Ou-Yang W. J., Zhang Y. F. and Chen Z. L. 1996. *Plant Cell reports* 16: 71-75

대한민국 특허 출원번호 10-1999-0007458 : 아그로박테리움에 의한 형질전환 고추의 제조방법 및 그에 의해 생산된 고추. 1999