

비타민 A 및 C 강화 형질전환 참다래 개발

Development of promising transgenic kiwifruits with high vitamin A and C contents

주관연구기관	제주대학교
연구책임자	송관정
발행년월	2005-11
주관부처	농림부
사업관리기관	농림수산물기술기획평가원
NDSL URL	http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201400023184
IP/ID	14.49.138.138
이용시간	2017/11/03 15:32:19

저작권 안내

- ① NDSL에서 제공하는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, KISTI는 복제/배포/전송권을 확보하고 있습니다.
- ② NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 상업적 및 기타 영리목적으로 복제/배포/전송할 경우 사전에 KISTI의 허락을 받아야 합니다.
- ③ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 보도, 비평, 교육, 연구 등을 위하여 정당한 범위 안에서 공정한 관행에 합치되게 인용할 수 있습니다.
- ④ NDSL에서 제공하는 콘텐츠를 무단 복제, 전송, 배포 기타 저작권법에 위반되는 방법으로 이용할 경우 저작권법 제136조에 따라 5년 이하의 징역 또는 5천만 원 이하의 벌금에 처해질 수 있습니다.

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “비타민 A 및 C 강화 형질전환 참다래 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 일

주관연구기관명 : 제주대학교
총괄연구책임자 : 송 관 정
세부연구책임자 : 송 관 정
연 구 원 : 김 세 림
세부연구책임자 : 김 찬 식
연 구 원 : 김 인 중
협동연구기관명 : 난지농업연구소
협동연구책임자 : 김 성 철
연 구 원 : 김 천 환
연 구 원 : 장 기 창
연 구 원 : 정 용 환

요 약 문

I. 제 목

비타민 A 및 C 강화 형질전환 참다래 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 과일 소비자들의 건강 기능성에 대한 관심도가 증대함에 따라 참다래 과수 산업의 경쟁력 제고를 위한 기능성 신품종 조기육성이 시급한 실정이다. 교배육종에 의한 신품종 육성은 참다래 식물의 자웅이주, 유년성, 과일 품질관련 형질의 양적유전 등의 특성으로 인하여 오랜 육종기간을 필요로 한다. 또한 비타민 등 기능성 성분의 대사조절에 관한 정보가 부족하여 과수 육종 및 고품질 생산기술 개발에 적용하기가 어려운 실정이다. 그러므로 비타민 대사조절에 영향하는 요인을 구명하고, 관련 유전자를 개발하며, 이들 유전자의 형질전환을 통한 대사구멍과 우량계통의 선발은 기능성 신품종 조기육종을 촉진할 것이다. 따라서 참다래 식물에서의 형질전환 기술을 개발하고, 이를 통한 비타민 대사조절 관련 유전자 전환체를 대량 양성하며, 발현분석을 수행하여 우량계통의 선발 및 대사조절 구멍을 통한 신품종 육종의 기술을 개발코자 본 연구를 수행하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 형질전환 비타민 A 및 C강화 참다래 개발

‘헤이워드’ 품종에 대하여 *Agrobacterium* 이용 고효율 형질전환기술을 개발코자 수행하였다. 재분화에 관여하는 요인으로 성장조절제 농도, 고형물의 종류, 치상방

법 등을 분석하였다. 또한 항생제 선발농도를 평가하였다. 형질전환에 관여하는 요인으로 균 배양농도 및 접종농도, 공동배양 기간, acetosyringone (AS) 농도를 구명하였다. 항생제 대체선발을 검토하기 위하여 sorbitol 대체를 분석하였다. 형질전환체 확인은 PCR 분석과 Southern blot 분석으로 수행하였다.

2. 참다래의 비타민 A 및 C 합성관련 유용 유전자 개발

참다래 식물체의 잎과 과실로부터 cDNA library를 제작하고 database 정보를 활용하여 primer를 제작하여 probe를 합성하여 카로티노이드 및 비타민 C 합성관련 유전자를 클로닝하고 염기서열을 분석하였다.

3. 참다래 과실의 비타민 A 및 C 대사조절 구명

참다래 주요 품종의 당, 산 등의 과실특성은 물론 비타민C 및 카로티노이드, 항산화능을 분석하였다. 또한 ‘헤이워드’와 ‘대홍’의 품종에 대해서는 발육단계별 과실의 카로티노이드 성분을 분석하였다. 시설 및 노지 환경에 따른 과실의 성분 및 비타민C, 카로티노이드 성분 분석을 수행하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 형질전환 비타민 A 및 C강화 참다래 개발

‘헤이워드’ 참다래 재분화 적정조건으로는 agar 고형의 MS 배지에 첨가된 $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 TDZ와 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IBA의 농도가 적당하였다. 항생제 선발 조건은 kanamycin $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 농도가 적당한 것으로 나타났다. 감귤 유래의 *PSY* 또는 *CHX* 유전자를 가지고 있는 pBI121 벡터를 포함하는 LBA4404 strain을 이용하여 형질전환에 영향을 주는 균 배양 및 접종 농도, 공동배양 기간, acetosyringone (AS) 농도 등의 요인을 분석하였다. 균 배양농도는 0.7~1.0, 접종농도는 1.0 OD₆₀₀에서, 공동배양 기간은 3일에서, AS 농도는 20~50 μM 이상에서 가장 높은 형질전환율을 나타내었다. 이들 조건으로부터 형질전환체를 대량 양성하여 순화 육묘하였다.

나. 참다래의 비타민 A 및 C 합성관련 유용 유전자 개발

카로티노이드 합성관련 *Psy*, *Chx*, *Lcy*의 부분 단편을 얻었고, 비타민C 합성관련 *GMPP*, *GDH* 유전자의 full length 염기서열을 분석하였다. 유전자의 상동성

분석결과 *GMPP*는 감자와 담배의 88~89%, *GDH*는 사과와 84%의 상동성을 나타내었다. 이들 유전자들은 pCAMBIA2300 플라스미드를 이용하여 식물발현용 벡터를 제작하였다.

다. 참다래 과실의 비타민 A 및 C 대사조절 구명

‘헤이워드’ 등 주요 품종의 카로티노이드와 비타민 C의 함량분석 결과 유과기에 가장 높았고, 이후 점차 감소하였으며, 수확 후 다시 증가하였다. 성숙과실의 항산화능은 44.3~61.5%로 나타났다. 재배환경에 따른 비타민 C와 카로티노이드의 함량은 시설재배보다 노지재배에서 높은 것으로 나타났다. 형질전환체의 성숙엽내 카로티노이드 중 lutein과 β -carotene의 함량은 대조구보다 2배 정도 높은 것으로 분석되었다.

2. 활용방안

참다래 형질전환 기술이 확립되어 형질전환 신품종 개발 및 유용유전자 개발에 활용이 가능하다. 대량 양성된 형질전환체들은 발현분석 후 교배모본으로의 활용도 예상된다. 참다래 cDNA library는 향후 유전자 개발에 활용가치가 높다. 클로닝된 유전자들은 타작물의 기능성 개발에도 활용이 가능하다. 참다래 과실의 품종별 과실특성, 카로티노이드 및 비타민 C 성분 등의 분석기술은 향후 기능성 우량계통 조기선발 등 신품종 육종과 친환경 재배기술 개발 등 대농민 지도기술개발에 활용이 가능하다.

SUMMARY

The study was conducted to develop the promising transgenic kiwifruit with higher contents of carotenoids (provitamin A) and ascorbic acid (vitamin C). To accomplish the goals of the study, the strategy was devised with three approaches including an establishment of high efficient *Agrobacterium*-mediated transformation, the gene cloning related to carotenoid and ascorbic acid biosynthetic pathway, and an evaluation of factors affecting vitamin biosynthesis metabolism.

1. Establishment of high efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and selection of transgenic kiwifruit with high gene expression. To establish the high efficient *Agrobacterium*-mediated transformation, some factors affecting regeneration and genetic transformation were evaluated in 'Hayward' kiwifruit. The higher regeneration frequency resulted from the solid MS basal medium supplemented with $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ, $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA, $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose, $8\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar. To apply antibiotics to transformation system, regeneration response was investigated for different kanamycin (Km) concentrations. The result suggested that $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for leaf blades and $75\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Km for petioles were proper for selecting transformants, respectively. For genetic transformation, LBA4404 strain of *Agrobacterium tumefaciens* including pBI121 binary vector harboring T-DNA region containing nptII and target gene, which was sy or chx cloned from satsum mandarin was used in the experiment. The highest regeneration and transformation efficiency resulted from the bacterial inoculation with $0.7\sim 1.0$ OD₆₀₀ of incubation density and 1.0 OD₆₀₀ of suspension density, the 3 days of coculture, and supplement of $20\sim 50\mu\text{M}$ of AS in virulence induction and coculture medium. The putative transgenic shoots were proliferated on multiplication medium with antibiotics and rooted on rooting medium. The plants were planted into pots and acclimatized in greenhouse. To confirm the gene transfer, the PCR and Southern blot analysis were conducted.

2. Gene cloning related to carotenoid and ascorbic acid biosynthetic pathway. To characterize several genes involving in vitamin A and C biosynthesis in molecular level, carotenoid biosynthetic genes of phytoene synthase and lycopene

cyclase and ascorbic acid biosynthetic genes of GDP-mannose pyrophosphorylase (GMPP) and Galactose dehydrogenase (GDH) were tried to be isolated. The cDNA libraries were constructed from RNA of leaves and fruits. By RT-PCR using degenerate oligomer, designed by multi-sequence alignment, gene fragments of respective genes were obtained. The sequences were determined and analyzed using bioinformatics. Using the cDNA fragments, we isolated cDNA encoding GMPP and GDH by cDNA library screening and RACE PCR and obtained the full length sequences of GMPP and GDH. The deduced amino acid sequence showed higher level of similarity to those of potato, tobacco, apple, and citrus.

3. Evaluation of factors affecting vitamin biosynthesis metabolism. For analysis of the fruit characteristics including soluble solid, acidity, fruit weight, bioactive components, etc., 10 varieties of kiwifruit were investigated. The 'Daeheung' showed the largest fruit size at 127.2 g, the highest soluble solid at 16.0 °Brix in *A. deliciosa* species. In case of *A. chinensis* species, the 'Apple Sensation' had the highest fruit size with 127.6g. 'Apple Sensation' and 'Haenam' were higher in soluble solid than the others. Most of time, varieties from *A. chinensis* were higher in soluble solid than that of varieties from *A. deliciosa*. The flesh color of *A. deliciosa* was green but yellow color in *A. chinensis*. In evaluation of seasonal changes for fruit characteristics during fruit development, the soluble solid contents in all varieties increase during all developmental stages and became over 7.5 °Brix at harvest time, early November. On the other hand, the acidity become lower as the fruit ripened. However, the soluble solid was sharply down and the acidity was sharply up after over-ripening.

The content of ascorbic acid among kiwifruit varieties was the highest in *A. eriantha* at 426.7 mg/100g and the lowest in *A. deliciosa* cv. 'ELM Wood' at 42.6 mg/100g. The content of ascorbic acid in varieties from *A. chinensis* were higher than that in varieties from *A. deliciosa*. The content of ascorbic acid in *A. deliciosa* was the highest in young fruit but getting less and less during fruit development. But the content of ascorbic acid in *A. chinensis* was recovered like that of young fruit at ripening time. The contents of lutein and β-carotene were the highest in *A. deliciosa* cv. 'Hayward'. These contents showed a rapid increase when the fruit became ripened. Antioxidative activities were ranged from 26.8% at *A. deliciosa* cv. 'Hayward' to 62.1% at *A. chinensis* cv. 'Golden

Yellow'.

The fruit growth of kiwifruit in protecting culture system of polyvinyl was better than that in open field, however ascorbic acid was higher in kiwifruit fruit of open field culture.

Transgenic plants transformed *Psy* gene and *Chx* gene showed higher content in lutein and β -carotene than normal plant.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of the Research Project	10
1. Background and Purpose	10
2. Goals and Scope	16
Chapter 2. Current Development of Related Technology	19
1. Breeding of New Cultivars	19
2. Genetic Transformation	21
3. Gene Cloning	22
4. Metabolism of Vitamin Biosynthesis	22
Chapter 3. Research Data : Approaches, Results, and Discussion	24
1. Development of Transgenic Kiwifruit with High Gene Expression	24
2. Cloning of Genes Related to Vitamin Biosynthetic Pathway	50
3. Manipulation of Vitamin Biosynthesis Pathway	68
Chapter 4. Achievement Evaluation and Contribution	101
Chapter 5. Practical Application of the Results	104
Chapter 6. Scientific Information Collected through the Project	105
Chapter 7. References	106

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	10
제 1 절	연구개발의 필요성	10
제 2 절	연구개발의 목표 및 범위	16
제 2 장	국내외 기술개발 현황	19
제 1 절	참다래 신품종 육성	19
제 2 절	참다래 형질전환 기술개발	21
제 3 절	참다래 유용 유전자 개발	22
제 4 절	비타민 관련 유전자 개발 및 발현조절 연구	22
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	24
제 1 절	형질전환 비타민 A 및 C 강화 참다래 개발	24
제 2 절	참다래의 비타민 A 및 C 합성관련 유용 유전자 개발	50
제 3 절	참다래 과실의 비타민 A 및 C 대사조절 구명	68
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	101
제 1 절	목표 달성도	101
제 2 절	관련분야에의 기여도	102
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	104
제 1 절	개발기술의 활용계획	104
제 2 절	추가연구의 필요성	104
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	105
제 7 장	참고문헌	106

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

WTO 체제의 개방화 시대에 과수산업의 국제경쟁력 제고를 위해서는 친환경 고품질 기능성 과실의 생산이 필수적이다. 이는 우수 품종의 선택과 다양한 최신 재배기술의 적용으로 가능하다고 할 수 있다. 그러나 친환경 고품질 과실 생산을 위한 다양한 기술의 적용은 많은 비용과 노동력의 투입으로 생산비를 증가시켜 가격 경쟁력을 약화시키는 요인이 되고 있다. 그러므로 경쟁력 제고의 첩경은 고품질 기능성의 신품종을 육성하여 이용하는 것이라 할 수 있다.

신품종의 육성은 지금까지 거의 대부분 기존의 교배육종과 가지 돌연변이의 선발에 의하여 이루어져 왔다. 이것은 과수 작물의 육종적 특성에 기인한다. 과수는 작물특성상 유전자 조성이 매우 압박하고, 자가불화합성은 물론 많은 경우에 교배불친화성이 존재하여 우량형질 교배친간의 교배가 어려울 뿐 만 아니라, 교배되어 종자가 형성되더라도 종자에서 발아한 식물체가 꽃이 피어 과실이 결실하기까지의 발육기간인 유년성이 존재하기 때문에 세대진전에 10년 이상이 요구되며, 식물체의 크기가 매우 커서 넓은 육종포장을 요구한다. 그러므로 과수의 교배육종에는 오랜 육종기간과 많은 육종비용이 요구된다(송, 2000).

그런데 사과, 배, 복숭아, 포도 등의 주요 과종에서는 오랜 기간동안 많은 육종가들의 노력과 연구기반 설비의 투자로 외국은 물론 국내 육종의 성과도 상당한 편이다. 그럼에도 불구하고 선진국에서는 각종 내병성 형질의 도입, 무촉지 및 왜성 등 생력화 형질의 도입, 항산화 물질 등 특수 기능성 성분의 함량증진 등의 육종연구는 교배육종보다는 생명공학 기술을 통한 가능성을 더 크게 기대하고 있는 실정이다. 이는 이들의 형질을 지배하는 유전인자들이 주로 야생에 가까운 품종 또는 계통에 보유되어 있어 재배종 우수형질들의 유전적 분리됨 없이 이로부터의 소수 유전인자들의 재배종으로의 도입에는 수회의 교배가 필요하여 장구한 육종기간이 소요되기 때문이다. 이러한 생명공학에 의한 신품종 육성에는 목표 유전자의 개발과 기존품종에 이를 도입하는 형질전환 기술의 확립이 전제되어야 하고, 형질전환 기술에는 재분화 기술개발이 선행되어야 한다.

참다래는 1906년경 뉴질랜드에서 중국 야생종으로부터 우수품종을 선발하여 처

음 재배를 시작하였고 1930년대에 경제적인 재배가 이루어지기 시작하였다. 그러므로 세계적으로 재배역사가 매우 짧은 뿐 만 아니라 국내 재배 또한 1980년대 이후에야 시작되어 국내에서도 재배역사가 매우 짧은 편이다(Warrington & Weston, 1990). 그만큼 과수로서의 연구기반이 취약하다. 아직까지도 세계적으로 유전자원 수집 및 평가, 형질의 유전분석 등에 대한 연구가 미흡하고 육종기반도 매우 취약한 편이다.

참다래의 육종은 과실크기, 수량성, 과육색, 털의 유무, 향기, 그리고 당 및 비타민, 무기성분 등의 다양한 형질개량을 목표로 하고 있다. 그러나 이들 형질의 유전적 특성은 아직까지 밝혀지지 않았으며, 많은 연구자들에 의하여 유전자원의 특성과 분포 등에 대한 연구와 함께 *A. chinensis* 계통 육종 및 중간교잡을 이용한 육종이 진행되고 있다(Liang, 1984; Ferguson *et al.*, 1990; Cui, 1993; Ferguson and McNeilage, 1999; Huang *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 1999). 참다래에서 과실크기, 내병성, 특수성분 함유 등 1-2개의 특성이 우수한 계통들이 탐색되어 알려지고는 있으나, 이들 우량형질을 기존품종에 도입하여 우량 신품종을 육성하기 위한 교배육종의 성과는 미미한 편이다.

다래나무속 식물은 기능적으로 자웅이주 식물로서 자연상태에서도 2배체($2n=2x=58$), 4배체($2n=4x=116$), 6배체($2n=6x=174$) 등 여러 가지 형태의 배수성을 갖는 종들이 다양하게 분포하고 있다. 또한 어린개체에서는 외형적으로 암수 및 여러 가지 과실특성들을 판별하기 어려우며 개화 및 결실까지 3~5년이상 기다려야 하는 등 육종선발에 많은 어려움이 있다(Zhang *et al.*, 1983; 渡辺, 1992; Frédérique *et al.*, 1994). 그러므로 조기에 다양한 소비자 욕구에 부응하고 경쟁력을 확보하기 위한 방안으로 생명공학 기술인 분자육종을 교배육종에 접목하는 방법이 크게 기대되고 있는 추세에 있다.

생명공학 분야는 경쟁이 매우 치열하여 선점의 효과가 매우 강력하고 자본과 인력의 집약적 투자에 대한 고려가 없이는 경쟁력 확보는 매우 어려운 것이 사실이다. 현재 참다래의 생명공학 연구는 뉴질랜드, 이태리, 포르투갈 등 일부 국가에서 산발적으로 수행하고 있는 실정으로 아직은 세계적인 관심과 투자가 빈약한 편이다. 미국 등의 선진국은 과수 중에서 사과, 복숭아, 오렌지에 대한 연구투자가 집중되어 있다. 그러므로 참다래에 대한 유전자 개발 및 형질전환 등의 생명공학 투자는 아직까지 선진국의 선점효과가 없는 실정이어서 우리나라에서 조기 투자에 의한 기술개

발이 이루어질 수 있다면 충분히 선진국과의 경쟁력 측면에서 가능성이 높다고 할 수 있다.

우리나라의 과수생명공학 연구투자는 농촌진흥청의 바이오그린21, 농림부의 특정연구개발 사업 등에서 사과가 가장 먼저 시작되어 선도하고 있는 실정이다. 그런데 과수는 크게 사과, 배 등의 과육이 딱딱한 형태, 감귤, 포도 등의 과육이 액상인 형태와 참다래 등의 중간형태로 구분할 수 있다. 사과와 배 등의 인과류는 식용부위가 화탁 유래의 위과 형태이나, 포도, 참다래 등의 식용부위는 자방의 중과피가 비대한 진과에 해당한다. 한편 참다래는 어느 과종에서 보다는 유년성이 짧고 재분화능이 높은 편이어서 일본에서는 과수 게놈프로젝트를 수행하는데 모델식물로 이용하고 있는 실정이다. 그러므로 우리나라에서도 참다래 과실의 유전자 발현조절과 연구를 통하여 사과 과실에서의 유전자 개발 및 발현 비교를 통한 과실의 발육 및 품질 대사를 구명하고 과실의 다양한 유용 유전자 개발을 촉진하고 개발된 유전자의 활용도를 높이는 측면에서 참다래의 생명공학 기술개발과 투자는 필요성이 높다고 할 수 있다.

최근 웰빙시대에 맞추어 건강과 기능성에 대한 일반인들의 관심이 매우 높은 편이다. 그러므로 과수에서 국제경쟁력 제고의 요인으로 소비자들은 당도의 증진과 더불어 기능성 요인을 매우 중요하게 인식하고 있는 실정이다. 따라서 앞으로는 과수에서의 신품종 개발의 육종목표는 기능성 증진이 최우선적으로 고려되어야 한다. 그러나 기능성 성분은 과실내 미량으로 함유하고 있기 때문에 그 분석과 대사연구가 극히 어려워 지금까지 미루어져 온 것이 사실이다. 이에 비타민 등 기능성 성분의 품종간 차이, 환경에 따른 함량변화 연구, 함량증진 품종 육성 및 재배기술 연구 등 기능성 성분의 대사조절 연구가 매우 미흡한 실정이다(육종결과 보고서, 2002). 따라서 과실소비 촉진과 경쟁력 제고를 위해서는 비타민 등 기능성 증진 연구가 절대적으로 필요하다.

과수에서의 형질전환 기술개발은 세계적으로 매우 어려운 분야로 인식되어 왔다. 그러므로 유용 유전자 개발이 지연되어 오고 있다. 유용 유전자의 개발은 기능성이 밝혀지지 않은 유전자를 해당 작물 또는 동일 대사과정을 가지고 있는 작물에서 대사억제 또는 대사활성을 통하여 이루어지게 된다. 그러므로 해당 과수작물에서의 형질전환 기술 확립이 전제되어야 하는 것이다. 과수 중에서 가장 앞선 사과에서의 형질전환 효율은 5% 이내로 알려져 있으나, 아직까지 품종간 차이가 매우 커서

재현성이 부족한 것이 사실이다. 그러므로 과수에서의 유용 유전자 개발을 촉진하기 위한 과수작물에서의 형질전환 기술의 조기 확립이 절실한 편이다. 참다래는 선진국의 연구사례를 볼 때 재분화능이 우수한 편으로 알려지고 있어 국내에서의 형질전환 기술 조기개발이 가능할 것으로 판단되고 있다. 참다래 고효율 형질전환 기술개발을 확립하게 되면 사과 등 과수에서의 생명공학기술 개발을 매우 활발히 촉진할 수 있을 것으로 기대된다.

한편 과실 등 식품으로 이용하는 작물에 있어서 형질전환에 의한 신품종 육성에는 부수적이면서 반드시 이용되는 항생제 선발유전자로 인하여 환경에 대한 위해성은 물론 인체에 대한 위해성의 논란으로 상업화가 지연되고 있다. 그러므로 최근에는 목적 유전자도 해충저항성과 제조체 저항성에서 지방산 강화, 비타민 강화 등 기능성 증진 유전자로 전환되고 있으며 형질전환 선발기술도 항생제를 이용하지 않는 대체기술 개발에 투자를 집중하고 있는 실정이다. 유럽연합은 이미 2005년부터 항생제 선발기술을 이용한 GM 식물의 상업화를 불허하는 방침을 공표한 한 바 있다. 그러므로 우리나라도 세계적인 추세에 맞추어 형질전환 작물개발에 있어서 항생제 선발 대체기술을 개발하는 연구가 절실한 실정이다.

이러한 항생제 선발대체 기술로는 Ds 유전자 이용 또는 Cre/lox 시스템 이용 등 항생제 선발 유전자를 이용한 후 후대분리를 통한 항생제 유전자 제거 등의 기술과 mannose 또는 cytokinin glucuronides를 이용하는 비항생제 선발마커를 이용하는 기술이 개발되어 실용화에 이용되고 있는 실정이다(Ebinuma et al., 2001; Joersbo, 2001). 그런데 후대분리를 이용한 항생제 선발 유전자의 제거기술은 과수작물에 있어서는 적용이 어렵고 비항생제 선발마커를 이용하는 기술은 mannose를 이용하는 기술을 제외하면 아직 불완전하며, mannose 이용기술은 노바티스사인 다국적 기업에 고비용의 특허사용료를 지불해야 하는 단점이 있다.

Phospho-mannose isomerase(PMI) 이용 선발기술은 npt-II 유전자 대신 PMI를 대체하여 배지의 탄수화물원으로서 sucrose 대신에 mannose를 공급하여 형질전환체를 선발하는 기술이다. 그런데 우리나라에서는 이미 sorbitol dehydrogenase(SDH) 유전자가 사과에서 개발된 바 있다(Park et al., 2002). SDH 유전자는 sorbitol을 fructose로 전환하는 능력을 가지고 있다. 그러므로 SDH는 PMI 기술의 원리와 같이 항생제 선발대체 기술로서의 개발 가능성을 가지고 있다.

2. 경제·산업적 측면

참다래는 사과, 배 등 일반 온대 과실의 공급이 거의 끝나는 시기인 2월부터 5월까지 출하하여 소비자들의 기호를 맞출 수 있는 과실이다. 참다래는 비타민C의 함량이 가장 높은 과실 중의 하나이며 고혈압 및 동맥경화 예방, 감기예방, 소화촉진, 숙취해소 및 피로회복 등의 기능성이 풍부하여 선진국에서 1인당 2-6kg이 소비되는 선진국형 과실이다((Huang *et al.*, 1983, Warrington & Weston, 1990).

그런데 우리나라 참다래의 '99년 재배면적은 1.1천ha, 생산량 13.2천톤으로 국내 과수산업에 비해서는 0.6%로 미미한 편인 반면 소비량은 매년 점진적으로 증가하고 있어 공급이 부족한 실정이다(진영옥, 2000). 그리하여 매년 참다래의 수입량은 증가 추세이고, 1999년 기준 수입량이 4,383톤으로 국내 생산량의 33.2%를 차지하고 있다. 이에 반하여 국내 재배면적과 생산량의 증가는 1985년 대비하여 각각 4.4배, 20.6배의 증가를 나타내고 있으나 다소 낮은 수준에 머물러 있는 실정이다. 이는 10a당 표준소득이 배와 비슷한 수준으로 타작물에 비하여 다소 높은 수준을 유지하고는 있으나 소비증가가 약세에 있기 때문이다. 그러므로 고비타민 등 기능성이 강화된 신품종 과실을 생산하여 소비를 촉진시키게 된다면, 농가소득을 증대시킬 수 있음은 물론 국내 재배면적과 생산량을 증가시켜 수입을 대체하는 효과를 가져다 줄 것이다.

제주도의 경우 2003년 뉴질랜드 제스프리사와 골든키위 과실생산업무 의향서를 체결하여 86농가 60ha를 재배하고 있는 상태에 있다. 2006년에는 73농가 40ha를 추가로 확대하여 100ha 재배를 계획하고 있는 실정이다. 다국적기업인 제스프리사가 독점생산권을 갖고 있는 골든키위는 고품질 명성이 세계적으로 알려져 있어 국내 소비 공급은 물론 일본 수출의 전진기지로 활용될 전망에 있다. 이는 고품질 품종의 재배에 이용될 경우 산업의 활력도가 증진되어 경쟁력이 확보될 수 있음을 보여주는 사례라 할 수 있을 것이다. 국내 참다래 생산 재배환경의 우수성은 국내는 물론 뉴질랜드, 일본 등 국외 전문가들이 공통으로 인정하고 있는 것이 사실이다.

최근 일반인들의 건강에 대한 관심도의 증대는 과실의 안전성이 우선시되는 경향을 가져오고 있다. 더욱이 저가 농산물을 공급하는 최대 규모의 중국이 농산물 안전성에 심각한 문제점을 내포하고 있음을 공공연히 드러내고 있는 실정이다. 그 동안 저가 농산물 수입에 따른 생산가 보전 및 소득 보전이 낮아 농업의 경쟁력이 저하되어 왔으나, 안전성이 우선시되는 경향은 고품질 기능성 품종의 농가 재배에 따

른 경쟁력 향상이 보다 용이해 질 것으로 예상되고 있다. 따라서 우수농산물관리제도(GAP) 인증에 따른 외국 저가의 농산물과 차별화를 시도하고 품질과 기능성 면에서 경쟁을 할 수 있다면 농업의 활로를 충분히 찾아낼 수 있을 것이다. 그러므로 국내 참다래 산업의 지속적인 위축세가 신품종 육성에 따라서는 국내 농촌 환경의 유지와 더불어 농업의 지속적인 발전이 가능할 것이다.

한편 일본은 참다래를 매년 5만톤 정도를 생과로 수입하고 있다(진영옥, 2000). 일본시장에 대한 주요 수출국은 미국, 뉴질랜드 등이다. 그러나 우리나라는 일본과 가장 가까운 지리적인 위치를 차지하고 있어 수송 면에서 뉴질랜드보다도 훨씬 유리한 편이다. 일본과 인접해 있는 다른 동남아 국가는 열대성 기후로 기후상 낙엽과 수인 참다래 재배가 불가능하기 때문에 우리나라는 일본시장에 대한 수출 잠재력이 매우 높다고 할 수 있다. 또한 우리나라의 참다래 과실의 품질은 뉴질랜드산과 비교하여 당도와 과중 면에서 모두 우수한 편이다. 다만 생산비가 높고 국내가격이 다소 높게 형성되어 있으며 국내 공급물량이 부족한 실정이므로 수출할 물량확보가 어렵기 때문에 수출이 제대로 이루어지지 못하고 있는 형편이다. 1999년 수출량은 103톤으로 1998년의 245톤보다도 감소하였다. 그러나 고비타민 등 기능성 과실을 생산하게 된다면 보다 높은 가격에 판매가 가능하기 때문에 재배면적과 생산량을 증가시켜 농가소득을 향상시키고 수입을 대체하는 효과 이외에도, 과실 수출을 통한 외화 획득에도 크게 기여할 수 있을 것이다. 참다래 일본시장의 20%인 1만톤의 과실만 수출할 수 있어도 이는 우리나라 과실 수출량의 거의 절반에 해당하는 수치이다.

3. 사회·문화적 측면

WTO 및 뉴라운드 출범에 따라 국내 과수산업은 국내 자체생산 과실간의 경쟁뿐만 아니라 외국산 수입과실과도 경쟁해야 하는 무한경쟁의 시대로서 많은 어려움에 직면해 있다. 2000년 현재 국민 1인당 과실 소비량은 52.5kg 수준으로 선진국인 미국, 화란, 대만의 절반수준에 머무르고 있다(송관정, 2002). 그러므로 국내 과실 소비의 촉진과 수출확대를 도모하지 않고서는 우리나라 과수산업의 유지는 불투명할 수 밖에 없게 될 것이다. 따라서 과실의 경쟁력을 확보하는 것이 가장 중요한데 국내 과수산업 기반으로 볼 때 생산비의 절감을 통한 가격경쟁력 확보는 어려운 실정이다. 그러므로 과실 경쟁력은 품질과 기능성로서 승부할 수 밖에 없고, 이는 당도를 높이는 것과 더불어 기능성 증진을 통한 접근이 현대사회의 웰빙 식생활 패턴

으로 볼 때 더 합당할 것으로 받아들여지고 있다.

많은 현대인들은 성인병 예방에 많은 관심과 함께 투자를 한다. 앞으로는 단순한 다이어트 식품의 섭취이외에 암 및 고혈압 예방 등을 위한 항산화물의 섭취에 보다 비용을 지불하게 될 것이다. 그러므로 많은 생명공학을 연구하는 종사자들이 과거 수량 안정성의 유전자 및 품종 개발에 관한 연구보다도 비타민 강화 황금벼와 같은 연구에 더 박차를 가하고 있는 것이다.

그런데 이러한 기능성 등의 GMO 개발에는 부수적으로 사용해야만 하는 선발 마커인 항생제 또는 제초제 저항성 등의 관련 유전자의 사용이 환경 및 인체에 대한 위해 가능성을 놓고 지속적인 논란이 되어왔다. 한편 유럽연합에서는 2005년부터는 이러한 항생제 저항성 유전자의 선발표지를 사용하여 개발하는 연구마저도 허용치 않은 것으로 알려져 있다. 따라서 항생제 선발표지를 대체하는 기술개발이 절실한 실정이다. 한편 국내에서는 GMO 환경 및 인체 위해성 평가규정이 마련되고 있고, 이에 따른 외국의 GMO는 물론 국내 GMO 작물의 상업화가 가까운 장래에 가능할 것이다. 그러므로 유럽의 경우와 같이 지나친 회의적 접근보다는 긍정적인 측면에서 기술개발을 촉진하여 기술우위 확보가 더 중요할 것으로 판단된다.

제 2 절 연구개발의 목표 및 범위

1. 연구개발의 목표 및 내용

가. 최종목표 : 비타민A 및 C 함량 증진(기존의 2배 이상) 형질전환 참다래 개발

1) 연구내용

가) 형질전환 비타민A 및 C 강화 참다래 개발

- 아그로박테리움을 이용한 고효율 형질전환 기술을 개발한다.
- 카로티노이드(비타민A 전구체) 및 비타민C 합성관련 유전자 전환체를 대량 양성한다.
- 전이 유전자의 발현분석을 통하여 비타민A 및 C가 강화된 참다래 우량 계통을 선발한다.

나) 참다래의 비타민A 및 C 합성관련 유용 유전자 개발

- 참다래 cDNA library를 제작하고 비타민 합성관련 유전자 탐색을 위한 probe를 확보한다.
- 카로티노이드(비타민A 전구체)의 합성과 비타민C 합성관련 유전자를 클로

닝하여 염기서열을 밝힌다.

- 탐색 유전자의 식물체내 발현조절 분석 연구를 통하여 핵심 조절단계를 밝히고 유전자의 식물발현 벡터 시스템을 작성한다.

다) 참다래 과실의 비타민A와 C의 대사조절 구명

- 주요 품종 및 계통에서 과실의 발육 단계별로 비타민 함량의 변화를 분석 연구한다.
- 온도 및 토양수분 등 재배환경에 따른 과실내 비타민 함량의 변화를 분석한다.
- 탐색 유전자의 발현조절과 비타민 함량과의 관계를 분석하여 핵심조절 단계를 구명한다.

2. 연구개발의 범위 및 내용

개발목표	연차	연구개발 범위 및 내용
형질전환 비타민A 및 C 강화 참다래 개발	1년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ 아그로박테리움을 이용한 형질전환체 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 기 개발된 감귤의 카로티노이드 합성관련 유전자(Psy 및 Chx 등)를 이용한 고효율 형질전환체 확립 · 아그로박테리움의 최적 접종조건 구명 : acetosyringon의 농도, 아그로박테리움의 밀도, 공동배양의 조건 등 요인 분석 · 재분화 최적조건을 구명 : 호르몬 농도 및 조성, Km 선 발농도 등의 요인 분석 · 형질전환체의 PCR 확인과 확인 식물체의 발근 및 순화 조건 구명하여 형질전환체 양성체계의 확립 ○ 항생제 선발대체 기술연구 <ul style="list-style-type: none"> - npt-II를 SDH로 대체한 벡터를 이용하여 형질전환체 선발. 배지의 탄수화물 급원이 되는 sorbitol과 sucrose의 적정 농도를 구명
	2년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ 비타민 합성관련 유전자 전환체 대량생산 <ul style="list-style-type: none"> - 비타민A를 강화하기 위한 참다래 유래의 카로티노이드 합성관련 유전자 전환 재분화 식물체의 대량 생산

개발목표	연차	연구개발 범위 및 내용
형질전환 비타민A 및 C 강화 참다래 개발	2년차	<ul style="list-style-type: none"> - PCR 및 서어던 분석으로 형질전환체의 확인 - 형질전환체 확인 식물의 순화 및 육묘 · 1년차 형질전환 확인 계통은 순화 육묘 후에 육묘상에서 1차 발현분석 · 조기 검정을 위한 자근묘 및 접목묘 육성
	3년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ 비타민 합성관련 유전자 전환체 생산 - 참다래 유래의 비타민A 및 C 합성관련 유전자 전환 재분화 식물체 대량생산 - PCR 및 서어던 분석으로 형질전환체의 확인 - 형질전환체 확인 식물의 순화 및 육묘 ○ 비타민 강화 우량품종의 선발 - 전이 유전자 발현분석 및 비타민 함량분석을 통한 비타민 강화 우량계통의 선발
참다래의 비타민A 및 C 합성관련 유용 유전자 개발	1년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ cDNA library 제작 및 probe 확보 - 참다래의 잎과 과육으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA library를 제작함 - 감귤 등의 database 검색을 통한 probe용 primer를 제작하고 PCR를 통해 probe DNA의 증폭과 염기서열 결정에 의한 probe를 확보함 ○ 카로티노이드 합성관련 유전자 클로닝 - 감귤에서 추정된 핵심 유전자인 phytoene synthase의 클로닝 및 벡터를 작성함
	2년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ 카로티노이드 합성관련 유전자 클로닝 및 발현분석 - Ggps, Pds, Zds의 3종 유전자 분리 염기서열 결정 및 발현양상 분석 ○ 비타민C 합성관련 유전자 클로닝 및 발현분석 - GDP-mannose pyrophosphorylase 유전자의 분리 및 발현분석
	3년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ 카로티노이드 및 비타민C 합성관련 유전자 클로닝 및 발현분석 - CrtL-b 및 galactonolactone dehydrogenase, GDP-mannose epimerase 유전자 염기서열 결정 및 발현분석

참다래 과실의 비타민A 및 C의 대사 조절 구명	1년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ 주요 품종 및 계통의 과실 비타민 함량의 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 헤이워드, 해남 등 주품종 및 고품량 계통의 과실내 비 타민 A와 C 함량 분석 및 전구물질 함량분석 ○ 과실의 발육단계별 비타민 함량변화 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 발육단계 및 수확후 저장기간 중 (6단계) 비타민 및 전 구물질의 함량변화를 분석
	2년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ 주요 재배품종의 온도 및 토양수분 등 재배환경에 따른 비타민 함량의 변화 양상 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 온도 및 토양수분에 따른 비타민 함량 분석 - 고기능성 참다래 생산을 위한 재배환경 조건의 구명
	3년차	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고비타민 합성관련 핵심조절단계의 구명 <ul style="list-style-type: none"> - 분리된 조절 유전자의 발현과 비타민 함량과의 관계 구 명을 통한 핵심조절 단계의 결정 ○ 우량계통의 포장 시험 <ul style="list-style-type: none"> - 포장상태에서의 전이 유전자 발현분석과 비타민 함량 분석 <ul style="list-style-type: none"> · 밀감 비타민 합성관련 유전자 전환체의 과실발현 분석 - 우량계통의 조직배양 및 접목을 이용한 증식 <ul style="list-style-type: none"> · 조기 발현 검정을 위한 자근묘 및 접목묘간 포장 비교 시험 - 우량계통 포장육묘

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 참다래 신품종 육종

우리나라에서 교배육종에 의한 참다래 신품종 육성은 1995년 원예연구소 남해출장소에서 'Hayward'와 야생다래를 교배하여 나온 실생으로부터 선발한 '보옥' 품종이 있으나 이는 경제적 가치가 적은 초기 육종단계의 품종이다. 최근 성균관대학교 제주농업시험장 및 해남난지시험장의 공동으로 2001년도에 털이 적고 당도가 높으며 과육색이 황색계통인 '해남'과 이 품종에 대한 수분수로 '옥천'을 선발하였고, 또한 대과이고 다수성 품종으로 우연 교배실생인 '화북94'가 선발되었다. 그런데 이들 품종들은 아직도 과실크기, 당도, 비타민 함량, 조숙성 등의 면에서 개선해야 할 부분이 많다. 특히 참다래는 비타민C의 함량은 높은 편이나 비타민A의 함량은 매우 낮은 편이다. 그런데 국내 수집종에는 비타민C가 높은 계통이 있음에도 불구하고 이들 유전자원을 이용하기 위한 비타민 대사 연구와 고비타민 함유 신품종 육성 등의 연구는 미흡한 실정이다(제주농시보고서, 2001).

2002년도에 국내 참다래 신품종이 4건 보고가 이루어졌다. *A. chinensis*와 *A. deliciosa* 를 교배하여 얻은 '제시그린'은 과피에 털이 거의 없으나 과실의 크기와 당도 및 저장력이 헤이워드보다 우수하지 못한 것으로 알려지고 있다. *A. chinensis*끼리의 교배로 얻어진 '제시골드'는 과육색이 황색인 극조생 계통으로 알려지고 있으나 제시그린과 큰 차이가 없으며, 특히 국내에 수입되어 시판이 이루어지고 있는 제스프리 골드에 비하여 당도, 비타민 함량 등 여러 가지 면에서 떨어지는 편이다. 또한 전라남도 농업기술원에서 등록한 '비단' 품종은 *A. eriantha* 계통으로 원래 비타민 함량이 많으나 과실이 크기가 아주 작고 식용이 거의 불가능한 품종이며, '치약' 품종은 *A. arguta* 계통으로 과실에 털이 없으나 과실이 너무 작아 경제성이 부족하다. 특히 비타민 C에 대한 조사는 일부 이루어지고 있으나 비타민 A 전구물질 등에 대한 조사는 전혀 이루어지고 있지 않아 국내 육종 계통들에 대한 조사가 시급하다(육종결과 보고서, 2002).

뉴질랜드와 중국 등에서는 적색 및 황색의 과육색, 고비타민 함유, 잔털 없음, 대과성 등 다양한 유전자원의 수집 및 평가와 함께 우량형질을 도입하기 위한 교배육종 사업이 매우 활발한 편이다(Ferguson & McNeilage, 1999). 뉴질랜드와 중국은 공동연구로 다양한 다래속 식물의 유전자원 수집 및 특성 평가를 수행하고 있으며, 적색 및 황색의 과육색, 고비타민 함유, 털의 없음의 장점과 소과성 등의 단점을 보완하기 위한 교배육종을 추진하고 있고 과실의 크기 증대는 배수성 육종으로 접근하고 있다(HortResearch 연차보고서, 2003). 한편 소과이나 털이 없고 고비타민 다래를 차세대 과실로 육성하는 데 많은 노력을 기울이고 있는 실정이다(어린이 비타

민 보충용 도시락 이용 홍보 등). 그러나 이들은 모두 야생종에 가까운 계통으로 경제적 재배가치가 높은 신품종의 육성에는 상당 시일이 소요될 것으로 보아지고 있다. 또한 다래속 식물의 향기 다양성을 향장품 등의 개발에 이용하기 위한 특성분석 및 제품개발 산업화를 시도하고 있다.

또한 우리나라를 포함한 전세계적으로 molecular markers를 이용한 교배육종의 효율증진 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Jung 등, 2003; Kim 등, 2003; Shirkot 등, 2003). 다만 이태리와 뉴질랜드에서는 molecular markers를 이용한 교배육종의 효율증진 연구가 보다 활발한 편이다. RFLP는 물론 RAPD, AFLP 및 SSR 표지를 이용한 양적형질의 유전 등은 사과, 오렌지 등의 타과종과 비교하여 결코 뒤지지 않은 편이다(Testolin et al., 1997). 특히 교배실생의 선발체계에서 유묘기에 수나무를 조기에 도태하여 품종육성 효율을 증진하기 위한 성관련 유전자표지 선발에 연구가 오랫동안 수행되어 왔다(Fraser et al., 1997).

제 2 절 참다래 형질전환 기술개발

국내 참다래의 형질전환 기술개발의 연구는 전무하다. 다만 전북대에서 엽과 엽병을 이용한 식물재분화 연구가 수행된 바 있을 뿐, 재분화계 및 형질전환계 확립을 위한 연구가 미미한 수준이다(김영숙과 오성도, 1998).

참다래의 형질전환 기술이 1990년에 뉴질랜드에서 처음 보고(Atkinson 등, 1990)된 이래, 일본, 포르투갈, 스페인 등에서도 1990년대 초반에 형질전환 기술을 확립한 바 있다. 현재 참다래에서 일반적으로 이용되는 형질전환 기술은 엽 및 엽병조직을 아그로박테리움을 이용하여 형질전환한 후 기관분화를 통한 형질전환 식물체를 생산하는 방식이다(Fraser 등, 1995; Kobayashi 등, 2000; Nakamura 등, 1999). 원형질체로부터 직접 DNA를 주입하는 방식도 연구되어 왔다(Raquel & Oliveira, 1996; Oliveira 등, 1991; Oliveira와 Raquel, 1991). 그러나 particle bombardment법의 적용은 연구된 바 없다. 형질전환 이용 품종으로는 대부분 ‘헤이워드’이나, 일부 *A. chinensis* cv. ‘Earligold’(Whittaker 등, 1997)을 이용한 보고도 있다. 또한 식물재료로 엽과 엽병 이외에 하배축(Uematsu 등, 1991), 줄기(Fraser 등, 1995; Nakamura 등, 1999), 종자(Fung 등, 1998)를 이용한 경우도 있었다. *Agrobacterium*의 종류로는 *A. tumefaciens* 이외에 *A. rhizogenes* (Rugini 등, 1991; Yamakawa와 Chen, 1996)를 이용하기도 하였으며, *A. tumefaciens*의 경우 EHA101(Uematsu 등, 1991), A281 또는 C58(Fraser 등, 1995; Janssen 등, 1993), LBA4404(Janssen 등, 1993; Kobayashi 등, 2000; Kusabo 등, 1999; Nakamura 등, 1999)가 이용되었다. 형질전환체 선발표지로는 아직까지도 항생제 선발 유전자(*nptII*)를 사용하고 있는 실정이다.

지금까지 보고된 형질전환연구의 목적 유전자로는 ACC synthase & ACC oxidase 유전자, 벼의 개화조절관련 OSH1 유전자, 포도의 내병성 관련 stilbene 유전자 등이 있다(Kobayashi et al., 2000; Kusaba et al., 1995; Nakamura et al., 1999). 아직도 참다래 개량에 유용성이 높은 유전자와 발현조절 프로모터 개발이 지연되고 있어 형질전환 연구가 지속적으로 수행되고 있지 못하다. 특히 일본의 과수 시험장에서는 복숭아 등의 과수 계놈프로젝트에서 과실 형질관련 유전자 발현 및 screening을 통한 유용유전자 개발에 유년성이 짧은 참다래를 이용하고 있다. 현재 참다래 형질전환체의 포장시험에 대해서는 보고된 바가 없는 실정이다.

제 3 절 참다래 유용 유전자 개발

참다래에서 유용 유전자 개발에 관한 연구는 국내의 경우 전무한 실정이다. 이에 반하여 일본, 프랑스, 뉴질랜드 등에서 참다래 유전자 개발이 일부 보고된 바 있으나 아직도 산발적으로 수행되고 있는 편이다. 주로 과실의 연화 및 품질과 관련하여 연구되어 왔으나, 최근에는 개화조절과 관련한 연구도 수행되고 있다(Walton 등, 2001). 일본과 뉴질랜드 등에서 연화현상과 관련하여 에칠렌 합성억제 유전자와 polygalacturonase 유전자가 개발된 바 있으며, 당도증진과 관련하여 sucrose phosphate synthase, xyloglucan endotransglycosylase, glycosyltransferase와 galactose dehydrogenase 유전자 등이 보고되었다(Atkinson & Gardner, 1993; Ikoma et al., 1995; Langenkamper et al., 1998; Schroder et al., 1998). 프랑스에서는 *A. styracifolia*에서 ribulose 1,5-biphosphate carboxilase와 *A. chinensis* 등에서 NADH dehydrogenase를 보고하였으며, 일본에서는 펙틴질 합성과 관련하여 pectin methyl esterase inhibitor 등을 보고하고 있으나 지금까지도 극히 초보단계에 있다(Beunign 등, 2003; Chat 등, 2003; Laing과 MacRae, 2003; Irifune와 Nishida, 2003).

그러나 최근 뉴질랜드의 경우 사과 계놈연구 경험을 참다래에 적용하여 유전분석 및 유용 유전자 개발을 추진하고 있다. 이미 BAC library를 확보하고 있고, 분자표지를 이용한 유전자 지도작성 및 양적형질(QTLs)의 분석을 수행 중에 있다. 참다래 EST분석과 함께 DNA chip으로 유용 유전자를 선별하고, 이를 애기장대와 담배 식물에 형질전환하여 유전자 기능분석과 유용 유전자 개발을 추진하고 있다. 한편 유전자 특허 및 권리보호를 위해 연구결과의 발표제한 및 비관계자의 접근 통제를 강화하고 있어 향후 기술정보의 수집에 어려움이 예상되고 있다.

제 4 절 비타민관련 유전자 개발 및 발현조절 연구

식물의 비타민C의 합성경로는 아직도 완전히 구명이 되어 있지 않은 상태이나,

최근 식물에서의 비타민C 합성경로에 대한 연구가 활발하여 점차 밝혀지고 있는 실정이다. Wheeler 등(1998)이 애기장대를 이용하여 연구결과 제안한 Glucose → GDP-mannose → GDP-galactose → galactose → galactonolactone → ascorbic acid 순의 합성경로가 일반적인 가설로 받아들여지고 있으며, 최근 이와 관련한 다양한 유전자들의 크로닝과 발현연구가 수행되고 있다. 핵심조절 유전자로서 GDP-mannose pyrophosphorylase를 암호화하고 있는 *vtc1* (vitamin C deficient 1) 유전자와 Galactonolactone dehydrogenase 유전자가 제안되고 있다. 또한 참다래 및 채소의 품질에 악영향을 미치는 Ca-oxalate의 합성이 vit C로부터 이루어지며 idioblast 내의 Ca-oxalate crystal 형성과 관련된다고 알려져 있다(Conklin et al., 1999; Kosman et al, 2001; Tabata 등, 2001).

비타민A와 관련해서는 전구체인 카로티노이드의 합성 및 조절인자에 대한 연구가 많은 작물에서 수행되어 왔고, 핵심조절단계로서 phytoene synthase 및 lycopene cyclase, phytoene desaturase 등이 제안되어 왔다. 최근 이들 유전자가 도입된 여러 식물체가 만들어지고 있고, 효율적으로 카로티노이드 성분이 증가된 결과도 보여주고 있다(Bramely, 2002; Fraser et al, 2002; Hirschberg, 1999). Geranylgeranyl pyrophosphate(GGPP) synthase는 카로티노이드 생합성의 전구체인 GGPP의 합성을 담당하고 있는 효소로서 전체 카로티노이드 성분의 함량을 증가시키기 위해서는 이 유전자의 발현이 중요하다는 결과도 제시되고 있다.(Ravanello et al., 2003)

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 형질전환 비타민 A 및 C 강화 참다래 개발

1. 재료 및 방법

가. 식물재료

1) 식물재료

식물재료로 기내배양 중인 ‘헤이워드’ 품종을 사용하였다.

2) 기내배양방법

가) 식물체 기내도입 및 증식

겨울철 저온을 경과하여 휴면이 타파된 발아 전의 가지를 3월초에 채취하여 이용하였다. 채취한 가지는 30cm 길이로 절단한 후 가지 및 눈의 잔털을 제거하였다. 70% 알코올로 문질러 소독한 후 물병에 꽂아 실내에서 발아시켰다. 인편이 벌어지고 녹색의 유엽이 1.0cm 정도 자란 것을 기부에서 절취하여, 인편을 제거하고 1% NaOCl 용액에 10분간 침지하여 멸균처리한 후 멸균수로 3회 세척하였다. 소독된 어린 순의 외부 잎을 2-3장 제거하고 증식배지에 치상하였다. 기내도입 및 증식배양은 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 16시간/8시간의 $60\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 광조건 하에서 수행하였다. 기내 도입한 신초의 증식을 위하여 4주 간격으로 증식배지에서 계대하였다.

나) 배지조성

식물체 기내도입 및 증식에 사용한 배지로는 8% agar 고형의 MS 기본배지 (자당 3%, pH 5.8)에 1.0mg/L BA 및 0.1mg/L IBA를 첨가하여 사용하였다.

나. 재분화

1) 식물재료

재분화 식물체로는 기내배양 중인 신초의 연록색 유엽을 이용하였다. 잎을 절취하여 엽신과 엽병으로 나누어 재분화 시험을 수행하였다.

2) 처리내용

가) 신초 재분화에 미치는 성장조정제 및 고형물의 영향

재분화의 적정 조건을 구명코자 MS 기본배지에 사이토카인류인 TDZ와 오옥신류인 IBA를 혼용처리하고 암배양 4주 후의 캘러스 유도 및 신초 재분화 반응을 조사하였다. 성장조정제의 농도는 TDZ의 경우 0, 1, 2, 3, 4mg/L의 5수

준을, IBA의 경우 0, 0.2, 0.4, 0.6mg/L의 4수준을 설정하여 20개 조합(5수준×4수준)에 대한 반응을 조사하였다. 또한 TDZ, BA, Zeatin 등 사이토카인류의 종류에 따른 재분화 반응을 조사코자 하였다. 배지고형물의 영향을 분석코자 agar와 gelrite의 농도를 각각 0.8%, 0.025%로 설정하여 재분화 반응을 비교하였다.

나) 절편체 종류 및 치상방법에 따른 재분화 반응

엽신의 경우 가장자리를 잘라내어 0.7×0.7cm 내외의 조직을 만들어 이용하였다. 또한 잎의 크기별(1.5~2.0cm, 2.0~2.5cm, 2.5~3.5cm, 3.5~4.5cm) 재분화 반응에 대해서도 분석하였다. 엽병의 경우는 크기별(0.5, 1.0, 1.5, 2.0cm), 상처처리(지퍼형태), 수평절단에 따른 치상방법의 영향을 분석하였다.

다) 항생제 선발농도

형질전환 시험에서 선발마커로 사용코자하는 kanamycin의 적정농도를 설정하기 위하여 0, 25, 50, 75, 100, 150mg/L의 6수준을 설정하여, 치상조직의 캘러스 성장, 신초발생, 갈변정도 등을 조사하였다.

라) 항생제 선발대체 시험

항생제인 kanamycin를 대체하는 선발시스템 개발을 위하여 sorbitol에 대한 재분화 반응을 조사하였다. sorbitol 및 sucrose 농도를 각각 30-0, 25-5, 20-10, 10-20, 0-30g/L의 5조합을 설정하여 수행하였다.

다. 형질전환

1) 아그로박테리움 종류 및 벡터

Psy 또는 Chx (비타민 합성관련 유전자)/pBI121를 보유하고 있는 LBA4404 strain을 이용하였다(그림 1).

2) 균 배양 배지 및 방법

아그로박테리움을 항생제 첨가(10mg/L kanamycin + 50mg/L rifampicin)의 고체 YEB 배지(5.0g/L peptone + 1.0g/L yeast extract + 5g/L 자당 + 0.5g/L MgSO₄ + agar 1%)에 도말하고 28℃에서 2일 배양하여 단일 균체를 형성시켰다. 이들 단일 균체 중의 하나를 액체 YEB 배지에 접종하여 28℃, 180 rpm 조건에서 A₆₀₀ 0.7이 될 때까지 배양하였다. 배양한 균을 3,000×g에서 10분간 원심분리한 후, 액체 재분화 배지(pH 5.2)(MS 기본배지 + 0.2mg/L IBA + 3.0mg/L zeatin + 30g/L 자당 + 20μM acetosyrigone)에 A₆₀₀ 0.7로 희석하였다.

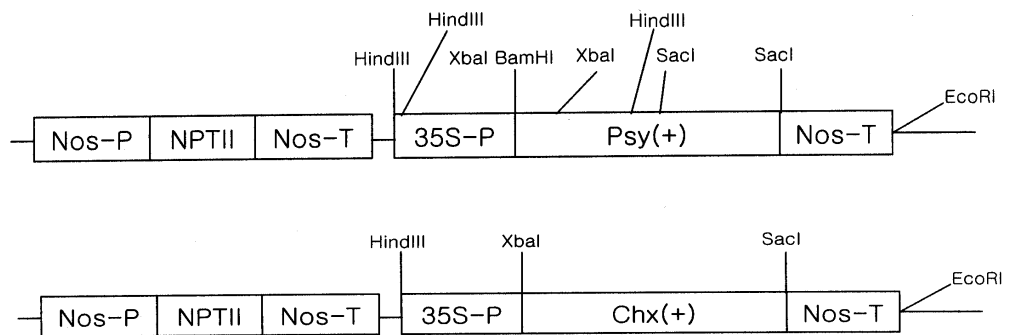


Fig. 1. Schematic representation of the T-DNA of vector pBI 121. Nos-P, nopaline synthase (NS) promoter; Nos-T, NS terminator; 35S-P, CaMV 35S promoter; NPTII, neomycin phosphotransferase Gene; Psy(+) and Chx(+), *phytone synthase* and β -*carotene hydroxylase* cloned from satsuma mandarin fruits, respectively.

이를 28℃, 180 rpm에서 최소 4시간 이상 배양한 후 접종에 이용하였다.

3) 균 접종

식물체의 균 접종은 잎 절편체를 균 현탁액에 담가 22℃, 180 rpm에서 10분 간 수행하였다. 접종 후 절편체는 멸균한 킴와이프스로 여액을 제거하였다.

4) 공동배양

균 접종 후 공동배양은 25℃, 암상태에서 수행하였다. 공동배양 배지는 MS 기본배지(pH 5.2)에 0.2mg/L IBA, 3.0mg/L TDZ, 30g/L 자당과 aceto- syrigone 을 첨가하고 0.25% gelrite로 고형화한 것을 이용하였다(Fraser 등, 1995).

5) 재분화 및 선발

공동배양 후 절편체는 선발 재분화 배지로 옮기고 암 상태에서 4주 동안 배양하였다. 4주 후 절편체는 배지를 교체하고 광 조건에서 배양하였다. 선발 재분화 배지는 MS 기본배지(pH 5.8)에 0.2mg/L IBA, 3.0mg/L zeatin, 30g/L 자당, 50mg/L kanamycin 및 250mg/L cefotaxime을 첨가하고 0.8% agar로 고형화한 것을 이용하였다. 재분화된 개체는 항생제가 없는 신초 증식 배지에서 1~2회 증식시킨 후 100mg/L kanamycin이 첨가된 신초 증식 배지에서 재선발하였다.

6) 처리내용

가) 형질전환 조건구명

- ① 아그로박테리움의 적정 배양농도 및 현탁농도를 설정코자 0.4, 0.7, 1.0 OD₆₀₀ 에 대하여 3×3의 9수준으로 재분화 및 형질전환 반응을 분석하였다.
- ② Acetosyringon (AS)의 현탁배양 및 공동배양 배지에 첨가한 농도(0, 10, 20, 30, 40, 50μM 등 6수준)에 따른 재분화 및 형질전환 반응을 분석하였다.
- ③ 공동배양의 적정 기간을 설정하고자 0, 1, 2, 3일 등 4수준에 대하여 재분화 및 형질전환 반응을 분석하였다.

나) 항생제 선발대체 기술개발

항생제 선발대체 가능성을 분석하기 위하여 gus 대신에 SDH로 대체한 p500 벡터(npt-II 포함)의 아그로박테리움 LBA4404 strain을 이용하여 재분화 및 형질전환 반응을 분석하였다. 엽신의 경우는 27.5g/L sorbitol + 2.5g/L sucrose, 엽병의 경우 30.0g/L sorbitol + 0mg/L sucrose 수준에서 형질전환을 수행하였다.

라. 형질전환체 확인

1) PCR 분석

가) 식물체 DNA 추출

PCR 분석을 위한 식물체 DNA 추출은 Shure et al.(1983)의 방법을 변형하여 사용하였다. 먼저 항생제 첨가 증식배지에서 재선발된 배양 중의 신초를 1일간 암상태에 유지한다.

신초의 어린 잎을 절취하여 1.5mL microtube에 넣고 액체질소를 가하여 tube 용 봉을 이용하여 마쇄한다. 여기에 65°C로 예열한 추출용액 [(50mM Tris-Cl, pH 8.0), 0.3M NaCl, 7M Urea, 1% N-Lauroyl Sarcosin, 2% PVP, 2% β -Mercaptoethanol] 을 첨가한다. Vortexing하여 조직이 엉기지 않고 추출용액과 잘 섞이도록 한다. 10분 간격으로 inversion하면서 65°C에서 30분간 배양한 후 4-5분 식는 것을 기다린다.

동량의 phenol:chloroform (1:1)을 가하여 적당히 inversion 하고 상온에서 20분간 정치한 후 상온, 12,000rpm, 10분간 원심분리한다. 마이크로피펫을 이용하여 노란색의 수용성 상정액을 1.5mL microtube로 옮긴다. 동량의 chloroform을 첨가하고 5분간 적당히 흔들어 섞는다. 이것을 12,000rpm, 10분간 원심분리한 후 상정액을 1.5mL microtube로 옮긴다.

여기에 120 μ L 4.4M ammonium acetate (pH 5.2)와 0.8-1 volume isopropanol (not cold)을 첨가하여 적당히 섞는다. DNA가 침전하면 즉시 상온, 12,000rpm, 10분간 원심분리하여 상정액을 버리고 pellets을 취한다. 1mL의 1차 washing buffer(75% EtOH, 0.2M NaOAc)을 첨가하고 적당히 섞어 상온에서 20분간 배양한다. 상온, 12,000rpm, 10분간 원심분리한 후 상정액을 버리고 pellets을 취한다. DNA를 2차 washing buffer(75% EtOH, 10mM NaOAc)를 첨가하고 5분간 정치하고 상온, 12,000rpm, 10분간 원심분리한 후 상정액을 버리고 pellets을 취한다. DNA를 65°C에서 dry시킨다.

200 μ L TE buffer를 첨가하고 tapping과 함께 65°C 상에서 DNA를 녹인다. 10mg/L RNasefm 첨가하여 적당한 inversion으로 섞고 10초 동안 원심분리한 후 37°C에서 3시간 이상 둔다. TE buffer를 첨가하여 최종 부피를 500 μ L로 조정된 후 동일 부피의 phenol:chloroform를 첨가하고 10분간 적당히 흔들어 섞는다. 상온, 12,000rpm, 10분간 원심분리한 후 상정액을 1.5mL microtube로 옮긴다. 동일 부피의 chloroform을 첨가하고 가볍게 섞은 후 상온, 12,000rpm, 10분간 원심분리하여 상정액을 1.5mL microtube로 옮긴다.

1/10 부피의 3M sodium acetate (pH 5.2)와 22.5 μ L 순수 에탄올(cold)을 첨

가하고 inversion으로 섞은 후 DNA 침전을 위해 20°C에서 1시간 이상 정치한다. 4°C, 12,000rpm, 10분간 원심분리한 후 상정액을 버린다. 70% EtOH로 세척하고 다시 4°C, 12,000rpm, 10분간 원심분리한 후 상정액을 버리고 65°C에서 DNA를 건조시킨다. DNA pellets을 50μL DDW에 녹인다.

나) PCR 분석

유전자 증폭을 위한 primers로는 nptⅡ 유전자에 대하여 5'-GAGGCTATTC-GGCTATGACT-3' & 5'-AATCTCGTGATGGCAGGTTG-3'을, CitPsy 유전자에 대하여 5'-CGGACTGCTGTGTTTAATTC-3' & 5'-TGCAGCATCAAGC-ATATCAA-3'을, CitChx 유전자에 대하여 5'-GCACCCAGATCGAGAGCTT-TC-3' & 5'-ACGAACATGTAGGCCATCCC-3'을, MdSDH 유전자에 대하여 5'-CAGAAGCCATCTGTGTGTCA-3' & 5'-AGAGATAGATCGAGTCTAG-G-3'을, 그리고 MdMADS2 유전자에 대하여 5'-CAGAAGCCATCTGTGTGT-CA-3' & 5'-AGAGATAGATCGAGTCTAGG-3'을 사용하였다. PCR 반응은 94°C 에서 2분간 DNA를 denaturation시킨 후, 94°C 1분간 denaturation, 60°C 1분간 annealing, 72°C 1분간 extension의 30회 반복 과정을 거친 다음, 72°C에서 5분 동안 extension시킨 후 4°C에서 안정화되도록 하였다(Song 등, 2000). 증폭한 DNA 단편은 1% agarose gel 상에서 전기영동하여 EtBr 로 염색 후 illuminator 상에서 ultraviolet를 조사하여 관찰하였다.

2) 서어던 분석

가) 식물체 DNA 추출

식물체 DNA 추출은 Shure et al. (1983)의 방법을 변형하여 이용하였다.

나) 서어던 분석

추출한 DNA를 제한효소 *EcoRI*으로 처리하고 0.8% agarose gel를 이용하여 전기영동하였으며, 이를hybond-Nylon membrane에 전이하였다. 이를 probe와 혼성화(62°C, 20시간)시킨 후 X-ray film을 이용하여 감광시켰다.

마. 형질전환 식물체 발근유도, 순화 및 육묘

1) 식물체 발근 유도

PCR 분석에 의해 잠정 형질전환체로 확인된 신초는 MS 기본배지에 0.5mg/L IBA가 첨가된 발근배지에서 발근을 유도하였다.

2) 순화 및 육묘

발근된 식물체들은 멸균한 모래에 심어 습도를 조절하여 순화하였다. 순화한 식물체는 피트모스:흙(1:1)이 채워진 타이백 포트에 옮겨 하우스에서 육묘하였다.

2. 연구 결과 및 고찰

가. 신초 재분화에 적정 조건 구명

1) 신초 재분화에 미치는 성장조정제 및 고형물의 영향

엽신 조직을 이용한 신초 재분화에 미치는 TDZ와 IBA의 영향을 분석하기 위하여 TDZ 및 IBA의 농도를 4×5 수준으로 조합하여 처리하였다. 배양 2주 후부터 잎 절편체의 단면에서 유관속 조직을 중심으로 캘러스의 형성이 시작되었고, 배양 3주 후부터는 신초의 형성이 시작되었다. 이는 Kim과 Oh(1998)의 ‘헤이워드’ 참다래 실생 묘의 엽육 조직을 이용한 재분화 연구에서 배양 10일 경부터 엽맥 부분이 팽대해지면서 절단면에서 캘러스가 형성되기 시작하였다는 연구결과와 유사하였다.

배양 8주 후에 캘러스 형성 정도, 재분화율, 신초 발생 정도 및 신초 소질을 조사한 결과를 Table 1과 Fig. 2에 나타내었다. 성장조정제의 조합에 따른 농도별 캘러스 형성 정도를 보면 TDZ가 첨가되지 않은 경우에는 매우 적은 편이었는데 TDZ의 농도가 높을수록 캘러스의 형성은 증가하는 경향을 나타내었다. IBA의 경우는 $0.4\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 이하의 농도에서는 캘러스 형성에 거의 영향하지 않았으나, $0.6\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 에서는 캘러스 형성을 촉진하는 경향을 나타내었다. 신초의 재분화는 TDZ가 첨가되지 않는 경우에는 IBA농도에 관계없이 이루어지지 않았는데, IBA의 농도가 높을수록 뿌리의 형성이 촉진되는 경향을 나타내었다. 그러나 TDZ의 농도가 $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 이상에서는 IBA의 농도에 상관없이 90~100% 내외의 높은 재분화 수준을 나타내었다.

절편체당 재분화 신초의 발생은 평균 2~5개 내외의 신초 균을 형성하였고 정상 신초의 형성율도 양호한 편이었다. 신초발생 정도와 신초의 소질을 고려할 때 ‘헤이워드’ 참다래 엽신 절편체의 재분화를 위한 성장조정제의 적정 농도는 $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 TDZ와 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IBA로 판단되었다.

사이토키닌 종류와 고형화 첨가물의 종류가 재분화에 미치는 영향을 Table 2에 나타내었다. Gelrite로 고형화된 배지에서 BA는 캘러스의 형성을 억제하는 것으로 나타났으나, TDZ와 zeatin에 비해 재분화가 낮고 신초 수가 적은 경향을 나타내었다. 그러나 TDZ와 BA에서는 90~100% 내외의 높은 재분화율을 나타내었는데, TDZ는 신초 발생을 촉진하고

zeatin은 신초 소질을 좋게 하는 경향을 보여 주었으나, 전체적으로 거의 차이가 없었다.

Table 1. Effect of TDZ and IBA concentration on regeneration from leaf blade explants of 'Hayward' kiwifruit.

TDZ + IBA (mg · L ⁻¹)	Callus growth	Regeneration rate (%)	Shoot formation	Shoot quality
0.0 + 0.0	1	0	-	-
0.0 + 0.2	1	0	-	-
0.0 + 0.4	1	0	-	-
0.0 + 0.6	2	0	-	-
1.0 + 0.0	2	90	3	2
1.0 + 0.2	2	90	3	2
1.0 + 0.4	2	100	3	2
1.0 + 0.6	3	100	2	2
2.0 + 0.0	3	100	3	3
2.0 + 0.2	3	100	4	3
2.0 + 0.4	3	100	3	2
2.0 + 0.6	4	100	2	2
3.0 + 0.0	3	100	4	3
3.0 + 0.2	3	100	5	3
3.0 + 0.4	3	100	3	3
3.0 + 0.6	4	100	3	2
4.0 + 0.0	4	100	3	2
4.0 + 0.2	4	100	4	3
4.0 + 0.4	4	100	3	3
4.0 + 0.6	5	100	2	2

Numerical values for callus growth, shoot formation, and shoot quality indicated approximate measure for the amount of callus, relative shoot number, and normal shoot growth, respectively from 1 reflecting the least growth to 5 reflecting the most growth after 8 weeks of tissue culture. Regeneration frequency indicated percentages of explants with adventitious shoot formation.

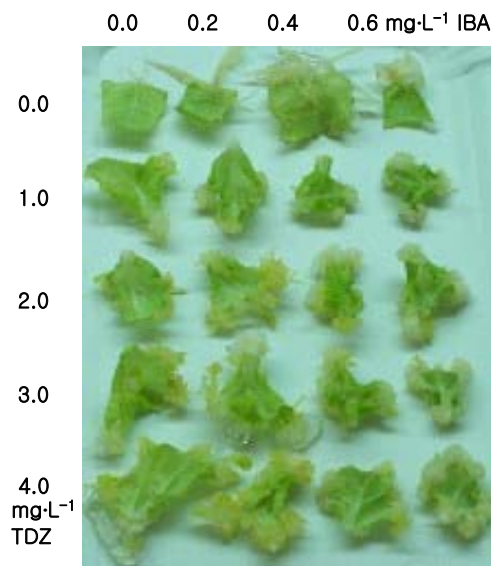


Fig. 2. Regeneration from leaf blade explants of 'Hayward' kiwifruit on regeneration medium with TDZ and IBA after 4 weeks culture in dark condition.

그런데 Kim과 Oh(1998)는 cytokinin 중에서는 zeatin이 가장 재분화 반응이 좋고 TDZ, BA의 순으로 신초의 재분화율과 신초 수가 감소한다고 하였다. 또한 Fraser 등(1995)은 zeatin이 신초 재분화율과 신초 소질 면에서 가장 좋았고 BA, TDZ의 순으로 나빠진다고 하였다. 그러므로 zeatin에 대한 재분화 반응이 BA보다 우수한 것은 본 연구결과와 일치하였으나, zeatin과 TDZ에 대한 반응은 큰 차이를 나타내었다. 그러나 이러한 차이는 식물체의 genotypes 또는 배지 종류의 차이에 기인한 것으로 생각되었다.

배지고형물에 따른 재분화 반응에서는 gelrite와 agar 간에 재분화율에는 거의 차이가 없었다. 그러나 gelrite는 신초 형성을 촉진하고 agar는 신초 소질을 양호하게 하는 경향을 보여 주었다.

Table 2. Effect of different cytokinins (TDZ, Zeatin, and BA) supplemented with same concentration of $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ combined with $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA and solidifying agents on regeneration from leaf blade explants of 'Hayward' kiwifruit.

Cytokinin (gelling agent)	Callus growth	Regeneration rate (%)	Shoot formation	Shoot quality
TDZ (gelrite)	3	100	5	3
Zeatin (gelrite)	4	90	4	4
Zeatin (agar)	5	100	3	5
BA (gelrite)	1	60	2	3

Numerical values for callus growth, shoot formation, or shoot quality indicated approximate measure as detailed in Table 1. Regeneration frequency indicated percentages of explants with adventitious shoot formation.

2) 절편체 종류 및 치상방법에 따른 재분화 반응

잎의 크기와 부위에 따른 재분화 반응은 Fig. 3과 같다. 잎의 크기는 작을수록 큰 것에 비해 신초 발생과 신초 소질이 좋았고, 부위별로는 엽병 쪽인 기부에 가까울수록 신초 수와 신초 소질이 좋았다. 이는 잎의 크기가 작을수록 어린 상태로서 발육이 덜 진행되고, 또한 잎 기부도 선단보다 발육이 늦게 진행되는 것과 관련되는 것으로 생각되었다(Raven 등, 1999).

엽병 조직의 cytokinins 종류와 농도에 따른 재분화 반응은 Table 3 및 Fig. 4와 같다. TDZ, zeatin 및 BA의 종류 간에는 재분화 반응이 다르게 나타났으나, 종류별 농도 수준에 따른 재분화 반응은 거의 차이를 보이지 않았다. Zeatin의 경우 50~100% 내외의 재분화율을 나타내었고, 신초 소질도 양호하여 가장 좋은 결과를 보여 주었다. 그러나 $3\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 농도에서 재분화율이 가장 낮은 것은 시료의 반복수가 적은 데서 발생한 실험상의 오차로 생각되었다. TDZ의 경우는 40~80% 내외의 재분화율을 나타내어, zeatin 보다는 감소하였으나 신초 발생은 촉진되는 경향이었다. BA의 경우는 재분화율이 0~10% 내외로서 가장 낮은 수준을 나타내었다. 대체적으로 엽병 조직의 재분화 반응은 엽신 조직과 비교할 때 다소 낮은 경향이었다. 그러나 Rodriguez 등(1995)이 MS 배지를 이용한 '헤이워드' 품종의 엽병에서 보고한 61.5% 보다는 양호한 결과를 나타내었다.

Table 3. Effect of different cytokinins (TDZ, Zeatin, and BA) combined with $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA on regeneration from petiole explants of 'Hayward' kiwifruit.

	Cytokinin conc. ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Callus growth	Regeneration rate (%)	Shoot formation	Shoot quality
TDZ	2.0	5	70	4	3
	3.0	4	80	5	2
	4.0	3	40	3	2
Zeatin	2.0	4	100	3	4
	3.0	5	50	3	4
	4.0	3	100	4	3
BA	2.0	3	0	-	-
	3.0	2	10	1	1
	4.0	2	10	1	1

Numerical values for callus growth, shoot formation, and shoot quality indicated approximate measure as detailed in Table 1. Regeneration frequency indicated percentages of explants with adventitious shoot formation.

엽병의 크기별 재분화 반응은 Table 4와 같다. 엽병의 크기가 작을수록 캘러스 발달은 높은 편이었고 재분화율도 증가하였으며, 신초 발생 정도와 신초 소질도 양호하였다. 이는 엽병의 크기가 작을수록 잎의 크기가 작으며, 발육이 덜 진행된 것과 관계되는 것으로 보아졌다.

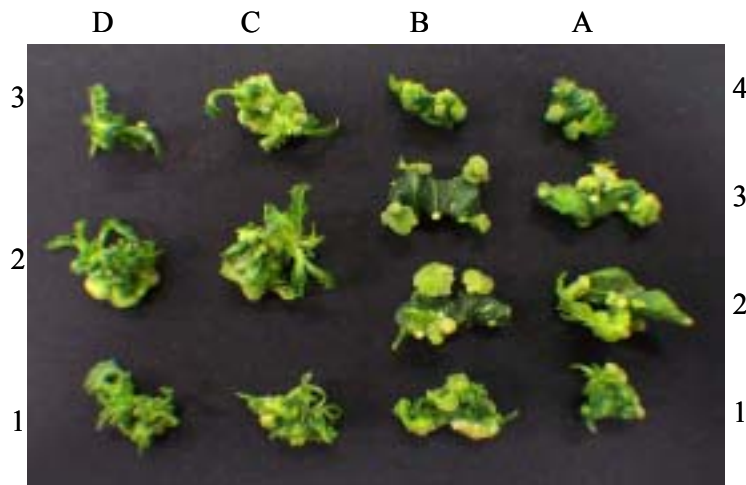


Fig. 3. Regeneration response of explants with different leaf sizes and parts from 'Hayward' kiwifruit in regeneration medium supplemented with $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ and $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA. A-D ; leaf size (A; 1.5~2.0cm, B; 2.0~2.5cm, C; 2.5~3.5cm, D; 3.5~4.5cm).

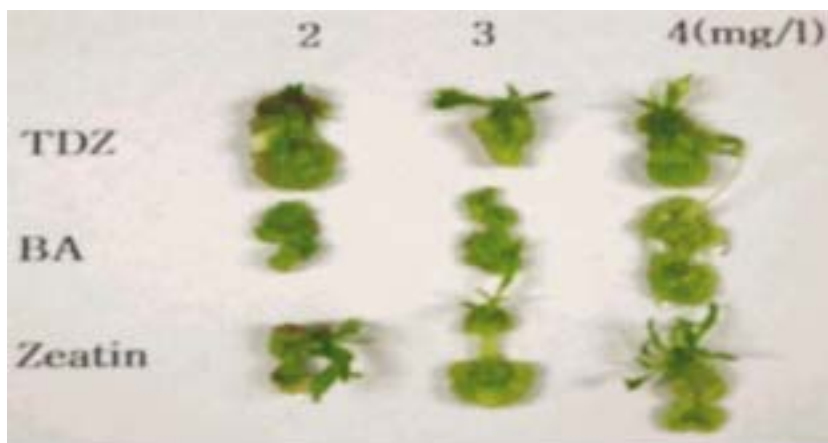


Fig. 4. Effect of different cytokinins (TDZ, Zeatin, and BAP) supplemented with $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA in regeneration medium on regeneration from petiole explants of 'Hayward' kiwifruit.

Table 4. Effect of petiole size of 'Hayward' kiwifruit on regeneration in regeneration medium supplemented with $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ and $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA.

Petiole size	Callus growth	Regeneration rate (%)	Shoot formation	Shoot quality
0.5cm	4	87.6	5	4
1.0cm	3	66.7	4	3
1.5cm	2	36.4	2	2
2.0cm	2	33.3	1	1

Numerical values for callus growth, shoot formation, and shoot quality indicated approximate measure as detailed in Table 1. Regeneration frequency indicated percentages of explants with adventitious shoot formation.

Table 5. Effect of wounding induction on regeneration from petiole explants of 'Hayward' kiwifruit in regeneration medium supplemented with $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ and $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA.

Wounding method	Callus growth	Regeneration rate (%)	Shoot formation	Shoot quality
Toothed wheel type	4	75	4	4
Cutting longitudinally into halves	5	95	5	5
Control	5	50	3	3

Numerical values for callus growth, shoot formation, and shoot quality indicated approximate measure as detailed in Table 1. Regeneration frequency indicated percentages of explants with adventitious shoot formation.

Table 5는 엽병 조직의 절편체에 상처를 유도하는 방법에 따른 재분화 반응을 나타낸 것이다. 메스에 의한 톱니바퀴 양상의 상처 유도 처리의 경우 재분화율은 75% 내외이고, 반으로 길게 쪼갠 방식의 상처 유도 처리의 경우는 재분화율이 95% 내외로서 그냥 치상하는 경우의 50% 내외의 재분화율에 비하면 차이가 컸다. 재분화율 이외에도 싹 발생과 싹 소실 면에서도 양호한 결과를 보여 주었다. 톱니바퀴 모양의 상처 유도보다는 반으로 쪼개는 방식이 더 재분화 반응이 향상되었는데, 이는 절단면이 증가함에 따른 유관속 조직은 더 많이 노출될 수 있는 것과 관련이 있는 것으로 생각되었다. 이상의 결과로 미루어 유체에

서 재분화율이 20% 이상의 경우 형질전환이 가능하다는 Tomzik(1995)의 연구보고와 비교할 때, 참다래의 엽병 조직을 이용한 형질전환 연구가 충분히 가능할 것으로 판단되었다.

3) 항생제 선발농도

잎참다래의 엽신과 엽병 조직을 이용하여 재분화 단계에서의 kanamycin 항생제에 대한 내성을 분석하였다(Fig. 5). 엽신의 경우 TDZ와 zeatin에 상관없이 $25.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin 이상의 수준에서 신초 재분화가 억제되었다. 그러나 캘러스 형성 및 탈색 등의 반응은 TDZ와 zeatin 간에 약간의 차이를 보였다. TDZ의 경우는 $50.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin 수준에서 주맥 절단면의 캘러스 형성이 거의 이루어지지 않았으나, zeatin의 경우는 동일 kanamycin 농도에서 캘러스가 형성되었다. 또한 고농도에서의 탈색 정도는 zeatin의 경우보다 TDZ에서 심한 편이었다. 엽병의 경우에서도 엽신과 비교할 때 유사한 경향을 보여 주었다. $25.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin 수준까지는 신초 재분화가 이루어졌고, $50.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin 수준에서는 캘러스 생장이 미약하게나마 진행됨을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 참다래 엽신 조직을 이용한 경우의 형질전환체 선발은 $50.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin 내외에서, 그리고 엽병의 경우에는 $75.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin 내외에서 가능할 것으로 판단되었다. 이는 Janssen과 Gardner (1991)와 Nakamura 등(1999)이 사용한 농도와 비교할 때 동일한 수준이었으나, Uematsu 등(1991)의 $25.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 보다는 높고 Fraser 등(1995)의 $100.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 보다는 낮은 수준이었다.

4) 항생제 선발대체 시험

엽과 엽병을 이용한 재분화 배지내 항생제 대체 적정 sorbitol 농도를 설정하기 위하여 sorbitol-sucrose의 농도 수준을 달리한 실험결과는 Fig. 6과 같다. 엽의 경우 27.5-2.5g/L, 엽병의 경우 30.0-0g/L 수준에서 캘러스 발생이 제어되었고, 절편체 팽창도 거의 이루어지지 않은 것으로 나타나, 항생제 대체선발을 위한 적정농도로 확인되었다.

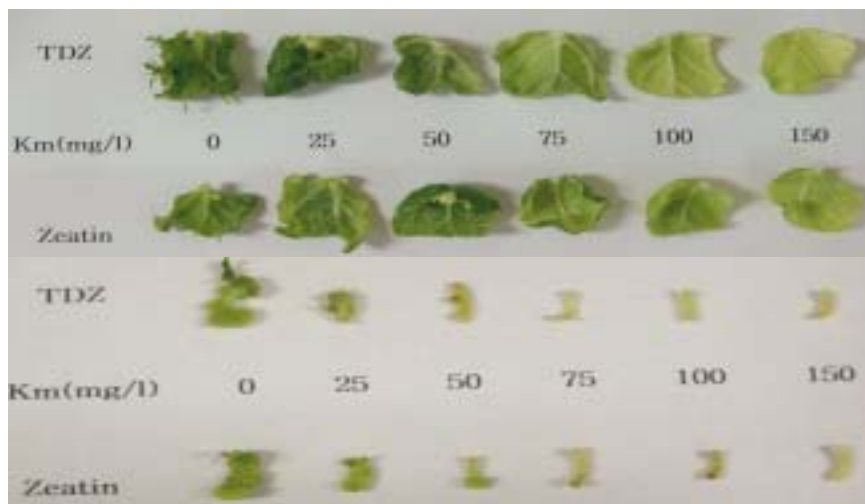


Fig. 5. Regeneration response from leaf blade and petiole explants of 'Hayward' kiwifruit in regeneration medium, which consisted of agar solidified MS medium with $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ or zeatin and $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA, supplemented with different kanamycin concentrations.

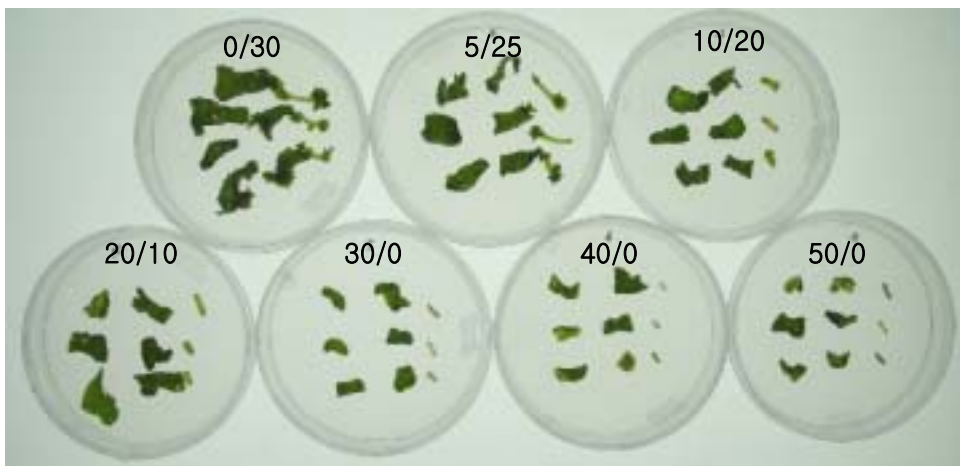


Fig. 5. Regeneration response of leaf blade and petiole explants for the ratio of sorbitol and sucrose concentration (g/L) supplemented in regeneration medium as a carbohydrate source 4 weeks after dark culture in kiwifruit

나. 형질전환 적정조건 구명

1) 아그로박테리움의 적정 배양밀도 및 현탁밀도 구명

균 배양 및 접종 농도의 적정농도를 구명코자 균 배양 농도 0.4, 0.7, 1.0 OD₆₀₀의 3수준과 현탁농도 0.4, 0.7, 1.0 OD₆₀₀의 3수준을 조합 처리하여 엽신과 엽병의 형질전환을 수행한 결과를 Table 6과 Table 7에 나타내었다. 엽신의 경우 절편체의 캘러스 형성율은 45~93% 내외로 높은 편이었고, 재분화율은 0~50% 내외이었으나 처리간 차이가 심한 편이었다. 캘러스 형성율과 재분화율 간에는 상관성이 없는 것으로 나타났고, 재분화율과 형질전환율과도 상관성이 없는 것으로 나타났다. 균 배양농도 0.7 OD₆₀₀, 접종농도 1.0 OD₆₀₀에서 재분화율 49.8%, 형질전환율 11.1%로 가장 좋은 결과를 나타내었고, 균 배양농도 1.0 OD₆₀₀, 접종농도 1.0 OD₆₀₀에서는 재분화율 21.6%, 형질전환율 7.8%을 나타냈으나, 그 외의 배양 및 접종 농도에서는 3% 내외의 낮은 형질전환율을 나타내었다. 그러므로 엽신의 경우 균 배양농도보다는 접종농도가 중요하게 작용하는 것으로 나타났으며, 균 배양 농도는 0.7~1.0 OD₆₀₀, 접종농도는 1.0 OD₆₀₀이 적합한 것으로 보아졌다. 그러나 실험자와 계절, 식물체의 상태에 따라 *Agrobacterium*의 과다생장에 의한 재분화 억제 등 재분화 및 형질전환율에 차이가 있어 재현성이 다소 떨어지는 문제점을 내포하고 있어 보다 상세하고도 지속적인 연구가 필요한 것으로 생각되었다.

Table 6. Effect of *Agrobacterium* density on transformation of leaf blade explants in 'Hayward' kiwifruit.

<i>Agrobacterium</i> density (OD ₆₀₀)		Callus formation (%)	Regeneration (%)	Transformation (%) ^Z
Initial culture	Suspension			
0.4	0.4	78.6	28.6	2.8
	0.7	93.3	0.0	0.0
	1.0	-	-	-
0.7	0.4	44.5	24.9	2.5
	0.7	85.2	32.2	2.8
	1.0	73.2	49.8	11.1
1.0	0.4	69.6	21.7	3.5
	0.7	-	-	-
	1.0	69.7	21.7	7.8

^Z was calculated on the basis of PCR analysis.

엽병의 경우 캘러스 형성율은 40~63% 내외를 나타내었고, 재분화율은 17~50% 내외를 나타내었으며, 형질전환율은 3~5% 내외를 나타내었다. 엽신과 비교하였을 때, 절편체의 캘러스 형성율은 낮은 편이었으나, 재분화율과 형질전환율은 비슷한 편이었으나, 처리 간에 거의 차이를 보이지 않은 것으로 나타났다. 그러므로 엽신과 달리 엽병의 경우 균 배양농도 및 접종농도가 중요하게 작용하지 않은 것으로 나타났다. 형질전환에 있어서, 균 배양농도는 균의 활력과 관계되고, 접종농도는 균 밀도와 관계되어, 사과 등의 작물에서 중요한 요인의 하나로 보고된 바 있다(Song 등, 2003). 그러나 참다래의 경우에는 이에 대한 연구 보고가 없는 실정으로 본 실험의 결과만으로는 정확한 평가를 하기가 어려웠다. 따라서 이에 대한 보다 상세하고도 지속적인 연구가 필요한 것으로 판단되었다.

Table 7. Effect of *Agrobacterium* density on transformation of petiole explants in 'Hayward' kiwifruit.

<i>Agrobacterium</i> density (OD ₆₀₀)		Callus formation (%)	Regeneration (%)	Transformation (%) ^Z
Initial culture	Suspension			
0.4	0.4	40.0± 5.7	23.3± 3.3	3.3
	0.7	60.0± 5.7	40.0± 5.8	5.0
	1.0	53.3±14.5	36.7±12.0	5.0
0.7	0.4	63.3± 4.9	50.0± 5.8	5.0
	0.7	60.0± 5.2	35.0± 6.7	4.2
	1.0	60.0± 7.3	45.0± 5.6	3.0
1.0	0.7	63.3± 8.8	16.7± 3.3	5.0

^Z was calculated on the basis of PCR analysis.

2) Acetosyringon (AS)의 적정 농도 구명

균 접종을 위한 현탁용액과 공동배양 배지에 첨가하는 AS의 적정 농도를 설정하고자 0, 10, 20, 30, 40, 50 μ M의 농도별 재분화 및 형질전환에 미치는 영향을 분석하였다(Fig. 6 및 Table 8). 엽신의 경우, 초기 캘러스 형성 정도와 재분화 정도를 비교할 때, 20 μ M 이상에서 양호하게 비슷한 정도로 나타났으나(Fig. 6), 후기의 균 과다생장에 의한 재분화 및 형질전환율의 정확한 평가를 수행치 못하

였다.

엽병의 경우 캘러스 형성을과 재분화율은 비슷하게 나타났으나, 형질전환율은 2~10% 내외로 처리간 차이를 나타내었고, AS 농도가 높을수록 형질전환율이 높은 경향을 나타내었으나, 20 μ M 이상의 농도에서는 큰 차이가 없는 것으로 나타나, AS 농도는 20~50 μ M 내외가 적당한 것으로 생각되었다. 이는 참다래의 형질전환에 20 μ M AS가 필수적이라는 연구보고(Janssen과 Gardner, 1993)와 일치하는 경향을 나타내었다.

AS는 polyphenolics의 하나로서 식물의 상처조직 등에서 분비되어 아그로박테리움의 식물체 인식 및 부착을 통하여 벡터 내 T-DNA 영역의 식물체내 전이 시스템을 작동시키는 형질전환에서 필수 요인이다. 식물의 생리적 상태 및 발육 단계에 따라 조직내 페놀류 및 다당류의 조성구 농도가 달라질 수 있다. 어린 조직 또는 환경 스트레스가 낮은 경우 식물체내 이들 성분의 축적이 다소 낮아질 수 있어 아그로박테리움의 유전자 전환 유도 효율이 낮아지는 것으로 생각되고 있다. 사과와 경우(Song, 2001)에서도 형질전환 효율을 증진시키기 위해서는 AS 첨가가 필수적이며 100 μ M 내외가 적정 농도로 알려져 있어, 참다래와 비교하여 높은 농도가 요구되고 있다. 또한 AS 농도에 대한 반응은 품종에 따라서도 달라질 수 있다고 하였다. 그러므로 ‘헤이워드’ 품종이 아닌 다른 품종이나 종을 이용하여 형질전환을 수행할 경우는 AS의 첨가 적정농도 설정에 대한 연구가 선행될 필요성이 있다.

Table 8. Effect of acetosyringon (AS) conc. on Agrobacterium-mediated transformation of petiole explants in ‘Hayward’ kiwifruit.

AS conc. (μ M)	Callus formation (%)		Regeneration (%)		Transformation (%) ^Z
	8 weeks	12 weeks	8 weeks	12 weeks	
0	40	45	25	45	2.5
10	40	40	25	35	2.5
20	60	75	45	60	7.5
30	45	55	35	40	5.0
40	50	60	30	55	10.0
50	65	65	45	50	10.0

^Z was calculated on the basis of PCR analysis.



Fig. 6. Effect of acetosyringon concentration on kiwifruit transformation 4weeks after *Agrobacterium* inoculation.

3) 공동배양 기간 설정

적정 공동배양 기간을 설정하기 위하여 공동배양 기간을 1, 2, 3, 5일 후 재분화 및 형질전환율을 분석한 결과를 Table 8에 나타내었다. 캘러스 형성율은 40~75% 내외를, 재분화율은 0~60% 내외, 그리고 형질전환율은 0~5% 내외를 나타냈으나, 공동배양 3일 처리에서 가장 높은 캘러스 형성율, 재분화율, 그리고 형질전환율을 나타내었다. 공동배양 1일의 경우는 재분화 개체가 모두 escape로 나타나, 형질전환이 거의 이루어지지 않았고, 5일의 경우에는 캘러스 형성율이 3일 공동배양과 차이가 없는데도 불구하고, 균 과다생장에 기인하여 재분화 개체 및 형질전환체를 획득할 수 없었다. 그러므로 참다래 형질전환에 있어서 공동배양 기간은 3일이 적당한 것으로 보아졌다.

Table 8. Effect of cocultivation period on *Agrobacterium*-mediated transformation of petiole explants in 'Hayward' kiwifruit.

Cocultivation period (day)	Callus formation (%)		Regeneration (%)		Transformation (%) ^Z
	8 weeks	12 weeks	8 weeks	12 weeks	
1	40	45	10	15	0.0
2	40	40	25	35	2.5
3	50	75	45	60	5.0
5	55	60	5	-	0.0

^Z was calculated on the basis of PCR analysis.

다. 항생제 대체를 위한 sorbitol 선발 형질전환

항생제 선발대체 재분화 반응의 분석에서 얻어진 sorbitol-sucrose 적정농도(엽의 경우 27.5-25g/L, 엽병의 경우 30.0-0g/L)를 설정하고 형질전환체를 1차 선발하였다. 엽의 경우 2개체, 엽병의 경우 4개체를 획득하여 증식 후 PCR 분석을 수행하였으나, 선발표지 유전자인 MdSDH에 대한 목적 유전자 증폭 결과를 얻을 수 없었다. 그런데, 옥수수(Negrotto 등, 2000), 고추(Kim 등, 2002) 등의 항생제를 대체한 mannose 시스템의 성공사례를 볼 때, 비록 재분화 배지내 탄수화물 급원으로서의 sorbitol를 이용하여 항생제 선발을 대체하는 형질전환 연구가 성공을 거두지는 못했지만 가능성이 충분히 있으므로 이에 대해서는 추가적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

라. 형질전환체 분석 및 식물체 순화

1) PCR 분석

재분화 개체들은 항생제 첨가 증식배지에서 증식되었고, 이 과정에서 항생제 저항성을 나타내지 못하여 급속 신장 및 증식이 되지 못하는 식물체들은 도태되고 항생제 내성이 있는 개체들만 2차 선발하였다. 이들의 잎을 채취하고 DNA를 추출하여 특이 primers를 이용하여 PCR 분석을 수행한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 2차 선발개체들의 50% 이상은 *nptII*에 대한 특이 증폭을 보여주었고, 이들은 대부분 목적 유전자(*Psy* 또는 *Chx*)를 가지고 있는 것으로 분석되었다. 현재 PCR 분석에 의하여 추정되는 형질전환체들은 154개체를 확보하고 있으나, 목적 유전자를 가지고 있는 개체들은 125개체를 확보하였다.

Table. 9. PCR analysis of plants regenerated from *Agrobacterium*-mediated transformation of kiwifruit for *nptII*, *Psy* and *Chx* gene.

Targeted gene	Putative transformant		
	Both	Only <i>npt</i> -II	Total
<i>Psy</i>	61	10	71
<i>Chx</i>	64	19	83
Total	125	29	154

2) Southern blot 분석

PCR 분석에서 잠정 형질전환체로 추정되는 식물체들은 발근배지에서 발근을 유도하였고, 이를 순화(Fig. 8)하여 성숙한 잎을 채취하여 DNA를 추출하고 probe를 이용하여 목적 유전자의 전환 여부를 최종 확인하였다. 충분한 DNA 량을 확보한 6개체를 분석한 결과 2개체에서 특이 유전자 삽입이 확인되었다(Fig. 9). 참다래 식물체의 잎은 다당류 및 폴리페놀, resin의 다량 함유하고 있어 DNA 추출시 순도가 낮은 단점이 있고, 6배체 식물로 genome 크기가 큰 편인데, 이들 요인에 의한 것인지는 분명치 않으나 Southern 분석 결과를 충분히 제시하지 못하였다. 차후 잠정 추정 형질전환체의 순화를 완료하고 모든 개체들에 대한 Southern blot 분석을 수행함은 물론 성분 분석에 대한 추가적인 연구를 보완할 것이다.

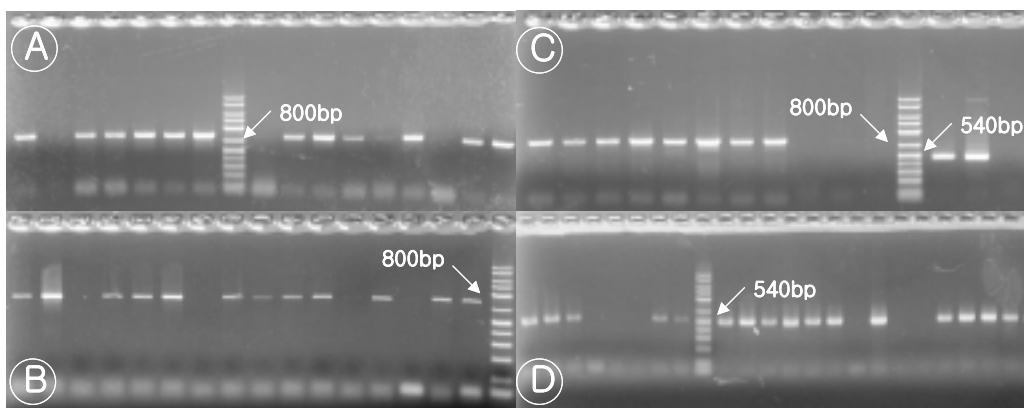


Fig. 7. PCR analysis of putative transgenic plants for selective marker gene of npt-II (A, B, and C) and targeted gene of Psy or Chx (C and D).



Fig. 8. Acclimatization of putative transgenic kiwifruit plants.

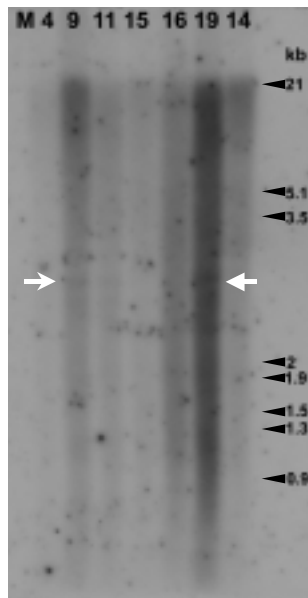


Fig. 9. Southern blot analysis of putative transgenic plants. Genomic DNA was extracted, digested with BamHI, and hybridized with the probe labelled with ^{32}P for *psy* or *chx*.

제 2 절 참다래 비타민A 및 C 합성관련 유용유전자 개발

1. 재료 및 방법

가. 식물재료

‘헤이워드’ 품종의 성숙 잎 및 과실을 이용하였다.

나. cDNA library 제작

1) 키위 잎과 과육으로부터 순도높은 total RNA를 분리하는 방법 고안: 키위 과일은 많은 물과 탄수화물, 페놀화합물 등을 다량으로 함유하고 있어 담배, 애기장대 등의 식물로부터 RNA를 추출하는데 많이 사용하던 기존의 방법으로는 유전자의 분리, PCR 등의 주형에 필요한 RNA를 확보하는데 어려움이 있다. 이에 따라 문헌정보 검색, 다양한 RNA 추출방법 등을 비교/분석하여 키위의 과실로부터 효율적으로 RNA를 추출하는 방법을 확립하였다.

2) mRNA 분리: Poly(A)⁺ RNA는 PolyAtract mRNA isolation System II(Promega)을 사용하여 분리하였다.

3) cDNA synthesis 및 packaging을 통한 library 제작: 분리된 mRNA로부터 Zap-cDNA synthesis kit와 Gigapack II gold cloning kit(Stratagene)를 사용하여 감귤 과실 cDNA library를 제작하였다.

다. 유전자 분리

1) Database 검색을 통한 카로티노이드 및 비타민C 합성관련 유전자 degenerate primer 합성:

① 비타민 C 생합성 관련 유전자: GMPP(GDP-mannose pyrophosphorylase) 유전자를 분리하기 위해 담배, 감자, 애기장대, 벼 등의 식물체에서 보고된 아미노산 서열을 바탕으로 가장 보존된 서열로부터 degenerate primer를 디자인 및 합성하였다. GDH(L-galactose dehydrogenase)의 유전자의 분리는 고구마, 담배, 애기장대 등에서 보고된 아미노산 서열로부터 degenerate primer를 합성하였다.

② 카로티노이드 생합성 관련 유전자: Psy(phytoene synthase)와 Lcy(lycopene cyclase) 유전자를 분리하기 위해 감귤, 애기장대 등의 유전자서열의 비교를 통해 degenerate primer를 합성하였다.

- RT-PCR, subcloning, 염기서열 결정: 앞에서 합성한 degenerate primer와 키위 mRNA를 주형으로 사용하여 역전사와 PCR 수행. 획득한 PCR 산물을 pGEM-T easy vector에 삽입한 후, 염기서열을 결정하여 각 유전자의 단편임을

확인하였다.

- RACE PCR용 primer(10종류) 제작: plaque hybridization을 통해 full size의 cDNA가 분리되지 않은 유전자의 5' 말단과 3'말단 부위를 분리하기 위한 primer 제작하였다.

- Plaque hybridization: RT-PCR을 통해 획득한 각 유전자단편을 방사성 동위원소인 [α -³²P]dCTP로 표지하였다. 이와 같이 만들어진 probe를 이용하여 cDNA library로부터 통상의 plaque lift method(Sambrook and Russell 2000)를 사용하여 각 유전자의 cDNA clone을 탐색하였다.

- RACE PCR: TAKARA사의 5'-full race core set과 3'-Full RACE CORE Set을 사용하여 RACE 수행하였다.

라. 식물형질전환용 벡터 제작

분리한 각 유전자의 cDNA를 사용하여, 유전자의 발현을 제어하는 식물형질전환용 벡터를 제작하였다. 기본 벡터로 사용한 플라스미드는 pBI121과 pCAMBIA2300으로서 이들 벡터의 GUS 유전자를 분리한 카로티노이드와 비타민 C 생합성 유전자로 치환하였다. 제작된 형질전환용 벡터는 대장균(*E. coli*)에서 증식하여 확인한 후, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 또는 EHA105에 도입하여 키위형질전환 실험에 사용하였다.

2. 연구 결과 및 고찰

가. 참다래 잎과 과육으로부터 효율적인 RNA 추출방법 고안

현재 RNA 추출에 사용하는 여러 가지 방법을 사용하여 RNA를 추출하였으나, northern 분석과 titer가 높은 cDNA를 만들기에는 부적합한 RNA로 판단되었다. 그러므로 northern 분석을 위한 RNA 시료 및 높은 titer의 cDNA library를 만들기 위해서는 새로운 RNA 추출 방법을 고안해야 했다. 여러 문헌정보 검색을 통해 다양한 추출방법을 바탕으로 새로운 추출방법을 확립하였다. 이는 aurintricarboxylic acid, lithium chloride, sarcosine, 2-mercaptoethanol, polyvinylpyrrolidone을 이용한 RNA 추출 방법이다.

나. 참다래 잎과 과육의 cDNA library 제작

1차년도에 제작한 library와는 다른 새로운 cDNA library를 3차년도에 제작하였고, 이로부터 유전자를 분리 중에 있다.

1) 카로티노이드 합성관련 유전자 클로닝

① Database 검색을 통한 probe용 primer를 제작하고 PCR를 통해 probe DNA의 증폭과 염기서열 결정에 의한 phytoene synthase와 lycopene cyclase 유전자의 probe를 확보하였다. Probe를 이용하여 수집 회의 plaque hybridization 실험을 수행하여 단편 유전자를 분리하였다.

② 시료가 다른 cDNA library 제작 및 RACE PCR을 통한 전체 유전자를 분리 중에 있다.

③ GGPS(geranylgeranyl pyrophosphorylase) probe를 분리하기 위한 새로운 primer 디자인 및 제작을 완료하였다. 현재 RT-PCR을 수행 중에 있다.

<GGPS probe 분리용 RT-PCR primer>

Group I

GGPSG25: 5'-CCYTGTATGGAYAAYGAYGA

GGPSG23: 5'-TTYGGATAHGTMRWCTTATC

Group II

GGPSG125: 5'-CCTAAGCTTGCCTCRGCTGC

GGPSG123: 5'-RGCAAACAATATTGGAGCTG

Group III

GGPSG115: 5'-GCRTGCGAGCTCGTYGGCGG

GGPSG113: 5'-YTYCTCARCTTYTSWATYTY

Group IV

GGPSG35: 5'-ATWYATGAAKCHATGAGGTA

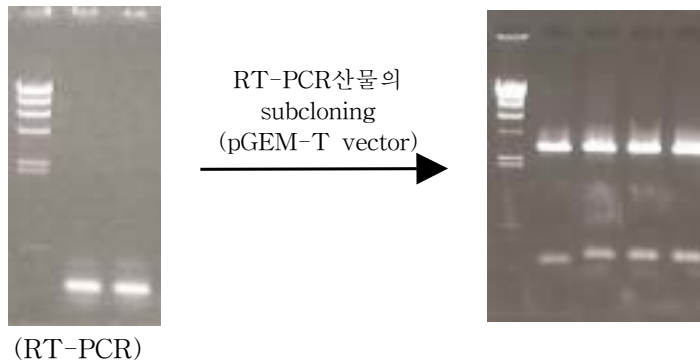
GGPSG33: 5'-ABCAARTCYTTYCCTGCAGT

2) 카로티노이드 합성관련 유전자의 선발: 정보 분석

정보 분석을 통해 현재까지 밝혀진 카로티노이드 생합성관련 유전자중 식물에 도입할 경우 효율적으로 카로티노이드 성분을 변화시킬 수 있는 유전자로서는 GGPS, Psy, Chx 일 것으로 예상되었다.

① Psy probe의 염기서열 분석 및 RACE PCR용 primer 제작

참다래 Psy 유전자의 RT-PCR를 수행하고 pGEM-T easy vector로의



<그림 1> 참다래 Psy 유전자의 RT-PCR 및 pGEM-T easy vector로의 subcloning

```

Query: 14 gaaggaatgaggatggaccttaggaagtcagatcaaaaaactttgacgagtttacctc
73
                A2(Complementary)      A1(Complementary)

Query: 74 tattgttactacgtggctgggacgcttggattgatgagtgttccagttatgggcattgca 133

Query: 134 cctgactcgtggccacaactgagagcgtctataacgctgccttggctctagggattgcc
193
                                S1                S2

Query: 194 aatcagttgaccaacattctcagagacgcttggccaagatgc 234
                RT용(Complementary)

```

<그림 2> Psy 단편의 염기서열 및 RACE용 primer 제작

subcloning을 수행한 후(그림 1), Psy 단편의 염기서열을 분석하여 RACE용 primer을 제작(그림 2)하였다. 이들 primer를 사용하여 RACE를 수행하였으나, 원하는 DNA band를 얻지 못하였다. 이것은 RNA에 불순물이 많이 오염되어 있어 실험이 제대로 수행되지 않았거나, 유전자의 안정성과 발현 수준이 낮아 분리될 수 없었던 것으로 사료된다. 이를 위한 해결책으로 순도가 높은 RNA를 분리하기 위해 새로운 RNA 추출방법을 위에서 설명한 것과 같이 확립하였고, 이를 이용하여 전체 ORF를 갖는 유전자를 분리 중에 있다(표 1, 그림 5).

② Lcy probe의 염기서열 분석 및 RACE PCR용 primer 제작

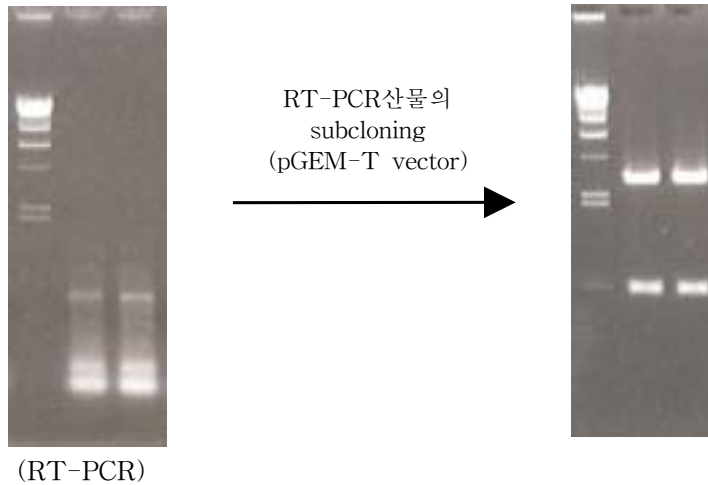
참다래 Lcy 유전자의 RT-PCR을 수행하고 pGEM-T easy vector로의 subcloning을 수행한 후(그림 3), Lcy 단편의 염기서열을 분석하여 RACE용 primer를 제작하였다(그림 4). 이들 primer를 사용하여 RACE를 수행하였으나, 원하는 DNA band를 얻지 못하였다. 이것은 RNA에 불순물이 많이 오염되어 있어 실험이 제대로 수행되지 않았거나, 유전자의 안정성과 발현 수준이 낮아 분리될 수 없었던 것으로 사료된다. 이를 위한 해결책으로 순도가 높은 RNA를 분리하기 위해 새로운 RNA 추출방법을 위에서 설명한 것과 같이 확립하였고, 이를 이용하여 전체 ORF를 갖는 유전자를 분리 중에 있다(표 1, 그림 5).

표 1. RACE용 primer 서열

	A1	A2	S1	S2
Psy	GTTTTTGTATC TGGACTTCC	AAGGTCCATTC CTCATTCCTTC	TCTATAACGC TGCCTTGGCTC	GGGATTGCCAA TCAGTTGACC
Lcy	GAGCAAACCGA AAGCCCCGCC	TTGCTGAGCAA CAGCAAGCCC	AATCCAGGTT ACCAAGTGGC	ATGGAATACT AGCTGAGGTAG

PSY RT용: GCATCTTCGCCAACGTC

LCY RT용: TGTCTAAATCAAACGGG



<그림 3> 참다래 Lcy 유전자의 RT-PCR과 pGEM-T easy vector로의 subcloning

```

Query: 8  tccaatccatgaaaaccatcttgtctaaatcaaacgggtgctcttctacctcagctagta 67
                RT용(그대로)                S2(Comp)

Query: 68  ttccatatgccacttggtaacctggattatagggtttatcatactgcacaagcaccttag 127
                S1(Complementary)

Query: 128  agaatcccgtagcatcaagaaccaoggcagccctgaattgtcacaccatcattgcaaatca 187
Query: 188  acaaagatttggactcttcatgaataaccttaataactttagcttgggtggaacttaacac 247
Query: 248  cattggttatgcatttttgcagcattttcgacttcagcaacttcttattaactctgccat 307
Query: 308  aaggtctatcaagatccttctttgtattatcatcaatgtgcacaacagcaccagaccaag 367
Query: 368  tagtatcaaggcaatcaagcaaatccatggcctcaaattcatccaccaaacaccataat 427
Query: 428  tatttggccaaatcaatttgggagatggatcaatcgagcaaacggaaagcccggcctctg 487
                A1(그대로)

Query: 488  aaacttgcctgagcaacagcaagcccagccggggcc 521
                A2(그대로)
  
```

<그림 4> Lcy 단편의 염기서열 및 RACE용 primer 제작

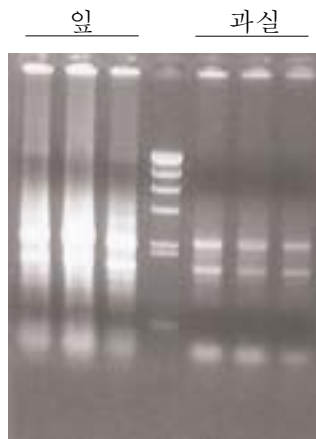


그림 5. 새로운 RNA 추출방법에 의한 참다래 RNA 추출

3) 비타민 C 합성관련 유전자 클로닝

① 참다래 GDP-mannose pyrophosphorylase(GMPP) 유전자의 분리

Database 검색을 통한 probe용 primer를 제작하고 PCR를 통해 probe DNA의 증폭과 염기서열 결정에 의한 probe를 확보하였다(그림 6). RACE PCR 분석을 통한 GMPP의 full 염기서열을 결정하였다(그림 7). 참다래 GMPP 염기서열의 타식물과의 상동성을 비교한 결과 감자와 담배에서 분리된 GMPP의 아미노산 서열과 88-89%의 상동성을 나타내었다(그림 8).

② 참다래 galactonolactone dehydrogenase(GDH) 유전자의 분리

Database 검색을 통한 probe용 primer를 제작하고 PCR를 통해 probe DNA의 증폭과 염기서열 결정에 의한 probe를 확보하였다. Primer design은 Genbank AY176585의 유전자서열을 바탕으로 다음과 같은 제작하였다.

GDH1 - GCACA AACCG TAGAA ACCTA AAACC

GDH2 - GATTT TTTCA TGCCA CGATT TACAA

RACE PCR 분석을 통한 참다래위 GDH 염기서열을 결정하였고(그림 9) 사과에서 보고된 GDH 유전자와 상동성 분석을 수행한 결과 84%의 아미노산 서열의 상동성을 나타내었다(그림 10).

다. 식물형질전환용 벡터의 제작

1) 키위 GMPP를 이용한 식물형질전환용 벡터의 제작

형질전환용 벡터를 제작하기 위한 기본 벡터로서 pCAMBIA2300 플라스미드를 사용하기 위해 pBI121으로부터 35S CaMV promoter-GUS-Nos terminator 부위를 pCAMBIA2300 플라스미드의 HindIII & EcoRI site에 삽입하였다. 이와 같은 과정을 통해 제작된 벡터를 “pCAMBIA2300GUS”로 명명하였다. 또한 GUS 대신 GFP가 삽입되어 있는 “pCAMBIA2300GFP”도 제작하였다.

이를 사용하여 분리한 GMPP 유전자를 sense 방향으로 또는 antisense 방향으로 삽입(BamHI & SacI site)한 식물형질전환용 벡터를 제작하였다. 형질전환 대장균으로부터 플라스미드를 분리한 후, BamHI-SacI으로 double digestion한 DNA를 agarose gel 전기영동을 통해 확인하였다. ①의 경우 1번 클론을, ②의 경우 2번 클론을, ③번의 경우 4번 클론을, ④의 경우 1번 클론을 *Agrobacterium* 형질전환에 사용하였다(그림 11). *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 freeze-thaw method에 의해 도입한 후, PCR에 의해 확인하였다. (그림 12).

Cloning of GDP-mannose pyrophosphorylase cDNA from kiwifruit

Primers

GMPU1 - GAN TTY GSN AAY AAR CCN ATG AT

GMPL4 - GGY TGNCCN AYR TCC ATC CAR AA

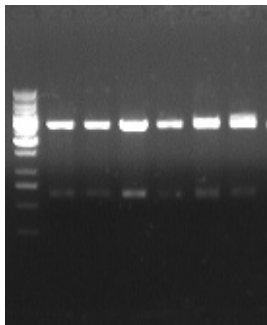
RT-PCR → ~ 600 bp fragment

→ Cloning into pGEM-T vector

→ Sequencing & homology test

→ RACE PCR → Full-length cloning

600 bp fragment



RACE PCR

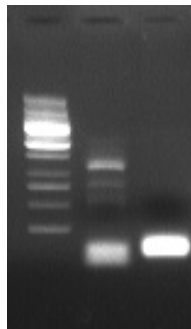


그림 6. GMPP probe 용 primer 작성 및 RACE 분석

GAGTTCGGAAACAAGCCTATGATCCTGCATCAGTATATCAGATTGAGGCTCTCAAGGCT
ATCGGAGTAAGTGAAGTGGTCTGGCTATCAATTACCAGCCAGAGGTGATGCTGAATTT
CTTGAAGGACTTTGAGACAAAACCTGGAATCAAGATTACATGCTCACAAGAGACTGAGC
CACTCGGCACTGCAGGTCCTCTTGCTCTGGCGAGGGACAAAACCTGATCGATGACCCTGGTG
AGCCATTTCTTGTTCTTAACAGTGATGTTATCAGTGAATACCCTCTCAAAGAGATGATC
GAATTCACAAAATCTCATGGAGGTGAGGCTTCTATTATGGTAACCAAGGTTGATGAGCC
ATCAAAATATGGTGTTCGTTATGGAAGAATCAACCGGCAAGTTGAAAAATTTGTA
GAAAAACCTAAATGTTTCGTGGGTAACAAGATCAATGCTGGGATTTACTTGCTGAACCC
ATCTGTTCTCGATCGAATTGAACTGAGGCCACCTCAATTGAGAAAGAGATCTTCCCAA
AAATTGCAGGAGAGAAAAAGCTATATGCCATGGTCTACCAGGCTTTTGGATGGAC

그림 7. 참다래 GDP-mannose pyrophosphorylase(GMPP) 유전자의 염기서열

```

>gi|4103324|gb|AAD01737.1| GDP-mannose pyrophosphorylase [Solanum tuberosum]
Length = 361

Score = 345 bits (886), Expect = 3e-94
Identities = 171/192 (89%), Positives = 181/192 (94%)
Frame = +3

Query: 15 AYDPASVYQIEALKAIGVSEVLAINYQPEVMLNFLKDFETKLGIKITCSQETEPLGTAG 194
      A P ++QIEALKA+GV+EVVLAINYQPEVMLNFLK+FE LGIKITCSQETEPLGTAG
Sbjct: 29 ANKPMILHQIEALKAVGVTEVLAINYQPEVMLNFLKEFEASLGIKITCSQETEPLGTAG 88

Query: 195 PLALARDKLI DDGPEPFLVLSNDVISEYPLKEMIEFHKSHGGEASIMVTKVDEPSKYGVV 374
      PLALARDKLI DD GEPF VLNSDVISEYP KEMI +FHKSHGGEAS+MVTKVDEPSKYGVV
Sbjct: 89 PLALARDKLI DDGPEPFLVLSNDVISEYPFKEMIQFHKSHGGEASLMVTKVDEPSKYGVV 148

Query: 375 VMEESTGQVEKFVEKPKLFVGNKINAGIYLLNPSVLDRIELRPTSIEKEIFPKIAGEKKL 554
      VMEESTGQVE+FVEKPKLFVGNKINAG YLLNPSVLDRI+LRPTSIEKE+FPKIA EKKL
Sbjct: 149 VMEESTGQVERFVEKPKLFVGNKINAGFYLLNPSVLDRIQLRPTSIEKEVFPKIAAEKKL 208

Query: 555 YAMVLPGFWMDI 590
      YAMVLPGFWMDI
Sbjct: 209 YAMVLPGFWMDI 220

```

```

>gi|14971013|dbj|BAB62108.1| GDP-D-mannose pyrophosphorylase [Nicotiana tabacum]
Length = 361

Score = 340 bits (873), Expect = 1e-92
Identities = 169/192 (88%), Positives = 179/192 (93%)
Frame = +3

Query: 15 AYDPASVYQIEALKAIGVSEVLAINYQPEVMLNFLKDFETKLGIKITCSQETEPLGTAG 194
      A P ++QIEALKA+GV+EVVLAINYQPE MLNFLK+FE LGIKITCSQETEPLGTAG
Sbjct: 29 ANKPMILHQIEALKAVGVTEVLAINYQPEMLNFLKEFEANLGIKITCSQETEPLGTAG 88

Query: 195 PLALARDKLI DDGPEPFLVLSNDVISEYPLKEMIEFHKSHGGEASIMVTKVDEPSKYGVV 374
      PLALARDKLI DD GEPF VLNSDVISEYP KEMI FHKSHGGEAS+MVTKVDEPSKYGVV
Sbjct: 89 PLALARDKLI DDGPEPFLVLSNDVISEYPFKEMIAFHKSHGGEASLMVTKVDEPSKYGVV 148

Query: 375 VMEESTGQVEKFVEKPKLFVGNKINAGIYLLNPSVLDRIELRPTSIEKEIFPKIAGEKKL 554
      VMEESTGQVE+FVEKPKLFVGNKINAG YLLNPSVLDRI+LRPTSIEKE+FPKIA E+KL
Sbjct: 149 VMEESTGQVERFVEKPKLFVGNKINAGFYLLNPSVLDRIQLRPTSIEKEVFPKIAAEKKL 208

Query: 555 YAMVLPGFWMDI 590
      YAMVLPGFWMDI
Sbjct: 209 YAMVLPGFWMDI 220

```

그림 8. 참다래 GMPP 유전자의 감자와 담배에서의 GMPP 아미노산 서열 비교

10 20 30 40 50 60 70 80
 GCACAAACCGTAGAAACCTAAAACCCAAACAATGGCAACCTAGACCTCCGACCCCTCGGGAACACGGCCTGAAGCTGA
 M A T L D L R P L G N T G L K L

90 100 110 120 130 140 150 160
 GCTCGGTGGGCTTCGGAGCCTCACCTCTGGGCAACGTTTTCGGCCAGTCTCCGACCATGACGCCATCGCCTCCGTCCGC
 S S V G F G A S P L G N V F G P V S D H D A I A S V R

170 180 190 200 210 220 230 240
 GAGGCCCTTCGCCTCGGCATCAACTTCTTCGACACCTCTCCGTATTATGGAGGAACATTGTCGGAGAAAGTACTGGGGAA
 E A L R L G I N F F D T S P Y Y G G T L S E K V L G K

250 260 270 280 290 300 310 320
 GGCCTAAAAGCTCTGGGAGTGCCGCGAAACGAGTACATTGTGTCGACCAAGTGTGGGAGGTATGCAGAAGGCTTTGATT
 A L K A L G V P R N E Y I V S T K C G R Y A E G F D

330 340 350 360 370 380 390 400
 TCAGTCCGAGAGAGTGACTAGGAGCATTGATGAGAGCCTGGAGAGGTTGCAGCTCGACTATGTTGATATATTGCAATGC
 F S A E R V T R S I D E S L E R L Q L D Y V D I L Q C

410 420 430 440 450 460 470 480
 CATGATATTGAATTTGGGTCCCTTGATCAGATTGTGAATGAGACGATTCCTGCTCTTCAAAAAGCTAAAGGAAGCAGGAAA
 H D I E F G S L D Q I V N E T I P A L Q K L K E A G K

490 500 510 520 530 540 550 560
 GATCCGGTTTATGGTATTACAGGACTCCCACTGGGAGTATTACCTATGTGCTCGATCGGGTTCCACCAGGCACAGTCG
 I R F I G I T G L P L G V F T Y V L D R V P P G T V

570 580 590 600 610 620 630 640
 ACGTGATTCTGTCAATATGGCCGTACAGTATTAATGATTCAACTCTGGAGGATCTACTGCCTTACTTAAAGAGCAAGGGT
 D V I L S Y C R Y S I N D S T L E D L L P Y L K S K G

650 660 670 680 690 700 710 720
 GTGGGAGTGATCAGTGCCTTCGGCTTCAATGGGCTTCTTACAGAGAGTGGTCCCTCAGAGTGGCACCAGCCTTCCACC
 V G V I S A S P L A M G L L T E S G P P E W H P A S P

730 740 750 760 770 780 790 800
 TGAAGTGAAGGCTGCATGCCAAGCCGCTGCTGCTCATTGTAAAGATAAGGGTAGAATAATTTGCAAGTTAGTCTATGCAGT
 E L K A A C Q A A A A H C K D K G R N I S K L A M Q

810 820 830 840 850 860 870 880
 ACAGCTTGTCAAATAAAGATATTTCTCCATACTGGTCGGCATGAATCCGTTAAACAGGTTGAAGAAAATGTTGCTGCC
 Y S L S N K D I S S I L V G M N S V K Q V E E N V A A

890 900 910 920 930 940 950 960
 GCTAATGAACCTGCAACATTTGGGAAGGATGCGAAAACCTGTGTCAGAGATTGAAGAGATTCTAAAACCCGTGAAGAACCA
 A N E L A T F G K D A K T V S E I E E I L K P V K N Q

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
 GACATGGCCTAGCGGTATACAACAAATTTGAGGTTGCTTTGTGAAGTGGCTGCTAATCAATCATTGCTCGCCTTTTAT
 T W P S G I Q Q I -

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 GCCTGTAATTTTCAGCACITTTGGTGTCTAAATCTTCAAACCTGCAATCCCAGTGTGTTTTGATTCTCTTAAATCAAC

1130 1140 1150 1160 1170 1180
 AATTATAGCCATCAGAAATGTATCATCCAGGGGATAGGCCCTTGTAAATCGTGGCATGAAAAAATC

그림 9. 참다래 galactonolactone dehydrogenase(GDH) 유전자의 염기서열

>gi|30267886|gb|AAP21783.1| L-galactose dehydrogenase [Malus x domestica]
Length = 324

Score = 557 bits (1436), Expect = e-158
Identities = 266/315 (84%), Positives = 295/315 (93%)

Query: 4 LDLRPLGNTGLKLSSVGFASPLGNVFGPVSDDHAIASVREALRLGINFFDTSPPYGGTL 63
++LR LGNTGLKLS VGFASPLGNVFGPVSDD +AI SVREA R GINFFDTSPPYGGTL
Sbjct: 9 VELRELGNTGLKLSCVGFASPLGNVFGPVSDDAIGSVREAFRRGINFFDTSPPYGGTL 68

Query: 64 SEKVLGKALKALGVPRNEYIVSTKCGRYAEGDFSAERVTRSIDESLERLQLDYVDILQC 123
SEKVLGK LKALGVPR+EY+V+TKCGRYA+GFDFSA+RVT+SIDESLERLQLDYVDILQC
Sbjct: 69 SEKVLGKTLKALGVPRSEYVVATKCGRYADGFDSADRVTKSIDESLERLQLDYVDILQC 128

Query: 124 HDIEFGSLDQIVNETIPALQKLKEAGKIRFIGITGLPLGVFTYVLD RVPVGTVDVILSYC 183
HDIEFGSLDQIVNETIPAL+KLKEAGKIRFIGITGLPLG+FTYVLD R+P G VDV+LSYC
Sbjct: 129 HDIEFGSLDQIVNETIPALKKLKEAGKIRFIGITGLPLGIFTYVLD RIPAGMVDVLSYC 188

Query: 184 RYSINDSTLEDLLPYLKSKGVGVI SASPLAMGLL TESGPPEWHPASPELKAACQAAAAHC 243
Y INDSTLEDL+PYLKSKGVG+I SASPLAMGLL TE+GPPEWHPAS ELK+AC+AAA +C
Sbjct: 189 HYGINDSTLEDLIPYLKSKGVGI SASPLAMGLL TENGPPPEWHPASAE LKSACRAAAVYC 248

Query: 244 KDKGRNISKLAMQYSLSNKDISSILVGMNSVKQVEENVAAANELATFGKDAKTVSEIEE I 303
K++G NISKLA+QYSLSNKDISS+LVGMNS+ QVEENVAAA ELAT GK+ K ++E+E I
Sbjct: 249 KERGNISKLALQYSLSNKDISSVLVGMNSINQVEENVAAAVELATIGKNEKILAEVEAI 308

Query: 304 LKPVKNTWPSGIQQ 318
LKPVKNTWPSG+QQ
Sbjct: 309 LKPVKNTWPSGLQQ 323

그림 10. 참다래 GDH 유전자의 사과 GDP 유전자와의 상동성 비교 분석

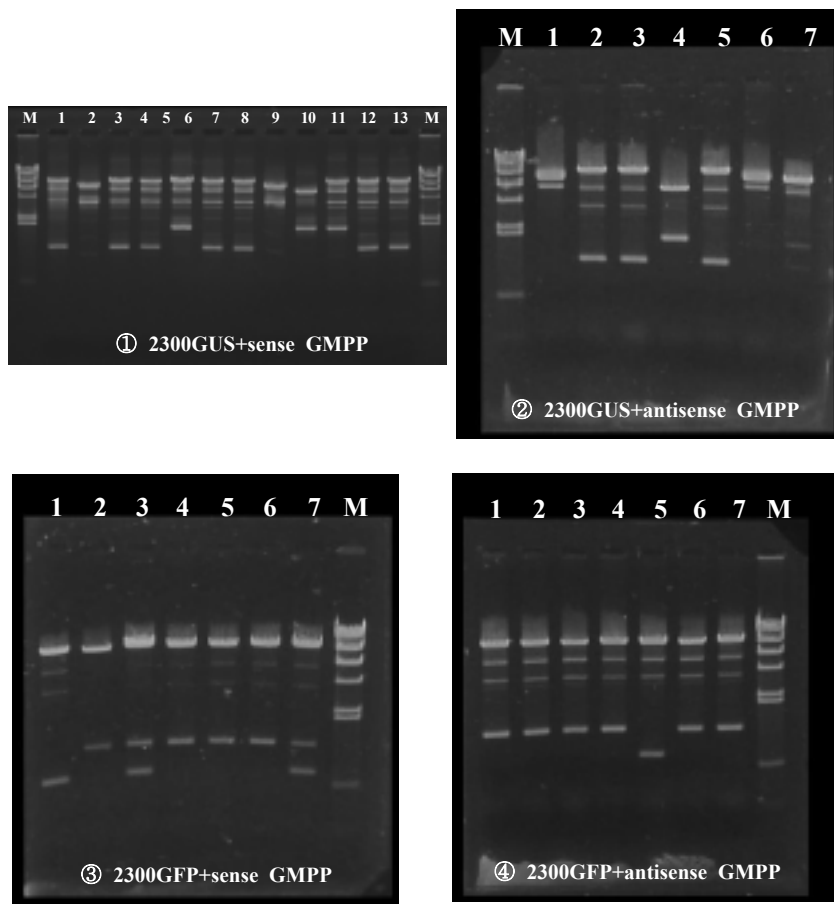


그림 11. 키위 GMPP 유전자의 발현을 제어하는 식물형질전환용 벡터의 제작

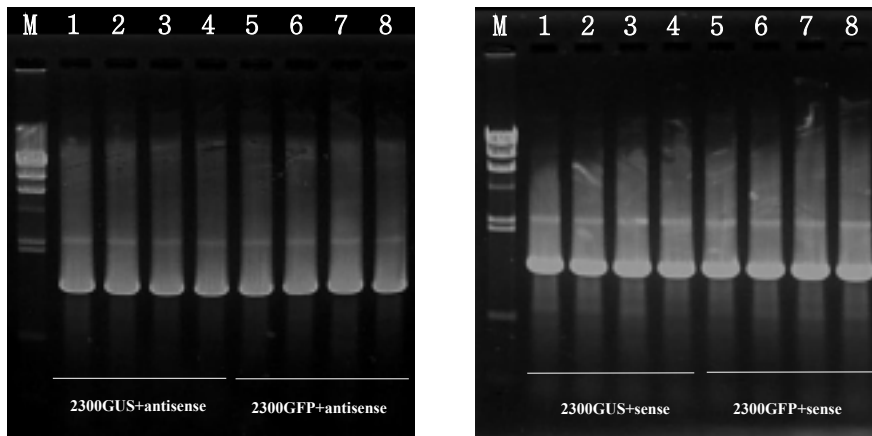
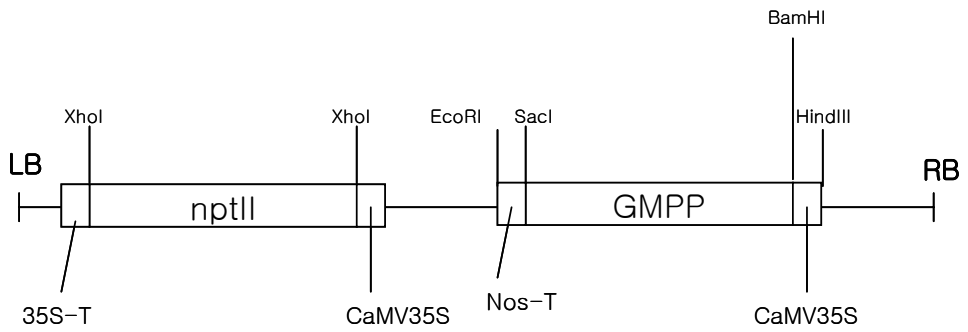


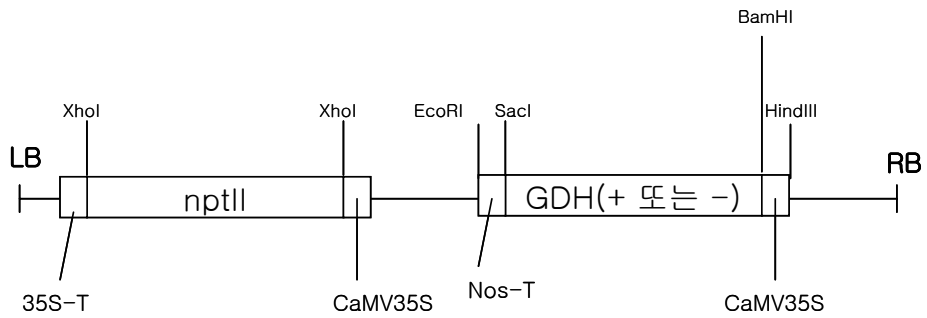
그림 12. GMPP 유전자의 발현 제어 식물형질전환용 벡터 Map
Agrobacterium으로부터 plasmid를 삽입 확인

2) 참다래 GDH를 이용한 식물형질전환용 벡터의 제작

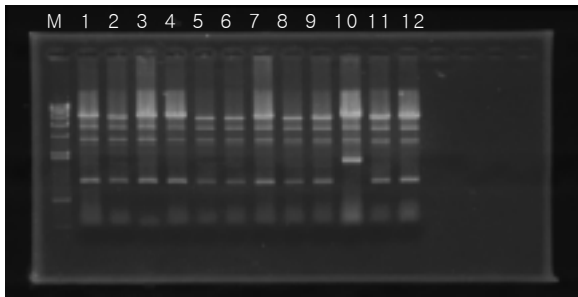
pCAMBIA2300GUS 벡터를 사용하여 분리한 GDH 유전자를 sense 방향으로 또는 antisense 방향으로 삽입(*Bam*HI & *Sac*I site)한 식물형질전환용 벡터를 제작하였다(그림 13).

3) 참다래 Lcy를 이용한 식물형질전환용 벡터의 제작

전술한 참다래 Lcy 단편을 이용하여 Lcy 유전자의 발현을 억제할 수 있는 식물형질전환용 벡터의 제작을 제작하였다. pCAMBIA2300GFP 벡터를 사용하여 분리한 Lcy 유전자 단편을 antisense 방향으로 삽입(*Xba*I & *Sac*I site)한 식물형질전환용 벡터를 제작하였다(그림 14).

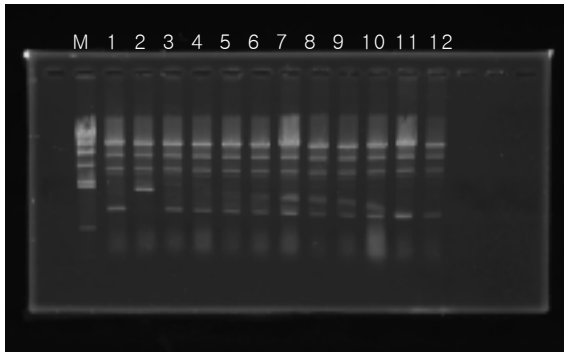


① sense 방향으로 삽입



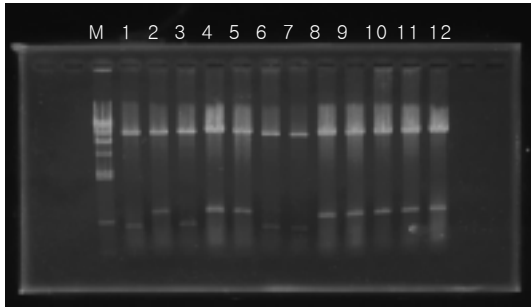
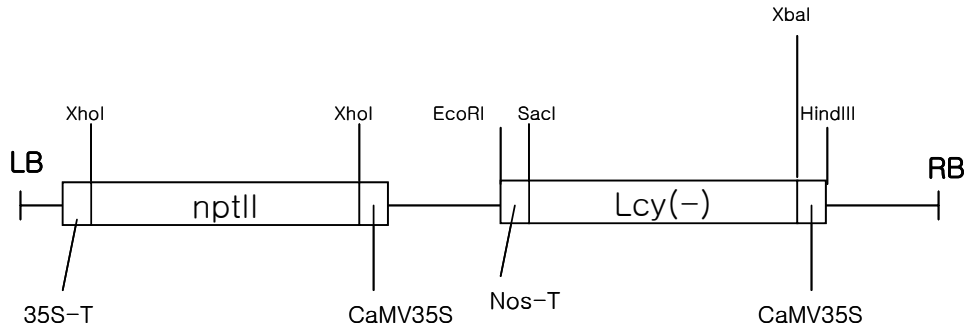
11번 클론을 제외한 나머지 클론은 제대로 삽입이 이루어짐.

② antisense 방향으로 삽입



2번 클론을 제외한 나머지 클론은 제대로 삽입이 이루어짐.

그림 13. pCAMBIA2300 플라스미드를 이용하여 제작한, GDH 유전자의 발현을 제어하는 식물형질전환용 벡터 Map과 전기영동.



1, 3, 6, 7번 클론: Lcy 유전자 단편이 들어가서 만들어진 벡터
 2, 4, 5, 8-12번 클론: pCAMBIA2300 벡터에 GFP 유전자가 들어있는 형태

그림 14. pCAMBIA2300 플라스미드를 이용하여 제작한, Lcy 유전자의 발현을 제어하는 식물형질전환용 벡터의 Map과 전기영동.

제 3 절 참다래 비타민A 및 C 합성관련 유용유전자 개발

1. 재료 및 방법

가. 주요 품종의 과실특성

참다래의 과실특성 분석은 1997년에서 1999년까지 국내외에서 도입하여 농촌진흥청 난지농업연구소 비가림하우스 포장에서 재배되고 있는 주요 품종들을 대상으로 조사하였다. 과실의 특성은 과중, 경도, 당도 및 산도 등을 평균값으로 나타내었으며, 수확 후 25℃에서 7~15일 동안 후숙을 실시한 후 조사하였다. ‘제스프리 그린’과 ‘제스프리 골드’는 뉴질랜드에서 수입되어 국내에서 시판되고 있는 것을 구입하여 국내에서 재배되는 품종들과 비교하였다.

참다래 과실 발달단계별 특성 분석은 4월 말에서 5월 초순경에 수분을 실시한 후 1개월 단위로 과중, 당도, 산도 및 경도의 변화를 조사하였으며, 특히 당도, 산도 및 경도의 경우는 수확 후 후숙과 과숙 및 부패 단계에서의 변화를 조사하였다.

나. 비타민 C 분석

비타민 C 추출은 Rizzolo 등 방법(1984)을 변형하여 추출하였으며, HPLC 조건은 Albrecht과 Schafer(1990)의 방법을 이용하였다. 먼저 참다래 과실의 과육 30g에 6% meta-phosphoric acid 용액 25 ml를 참가한 후 homogenizer를 이용하여 곱게 간 다음 원심분리기를 이용하여 4℃, 6,000 rpm에서 10분 동안 원심분리를 실시하였다. 원심분리가 끝난 시료는 거름종이(whatman No. 4)를 이용하여 상등액을 얻은 후 pore size가 0.22 µm인 membrane filter를 이용하여 filtering을 실시하였다. 이 추출액은 다시 SepPak C18 카트리지를 통과시켜 깨끗한 ascorbic acid 추출물을 얻은 다음 HPLC를 이용하여 분석하였다(Fig 1). HPLC 분석을 위한 컬럼은 µBondapak NH₂ 컬럼을 이용하였고 이동상은 5 mM KH₂PO₄(pH 4.6)-ACN(30:70), 유속 1ml/min, 그리고 함량분석은 UV 254 nm에서 실시하였다.

시기별 비타민 C 함량의 변화는 *A. deliciosa* cv. ‘Hayward’와 *A. chinensis* cv. ‘Apple Sensation’ 품종을 이용하여 유과기인 6월에서 수확기인 10월말까지 1개월 단위로 5회 동안 과실의 무게와 비타민 C 분석을 실시하였다.

다. 비타민 A 관련물질 분석

비타민 A 관련물질 추출은 Cano 방법(1991)을 변형하여 추출하였으며, HPLC 조건은 Albrecht과 Schafer(1990)의 방법을 이용 하였다.

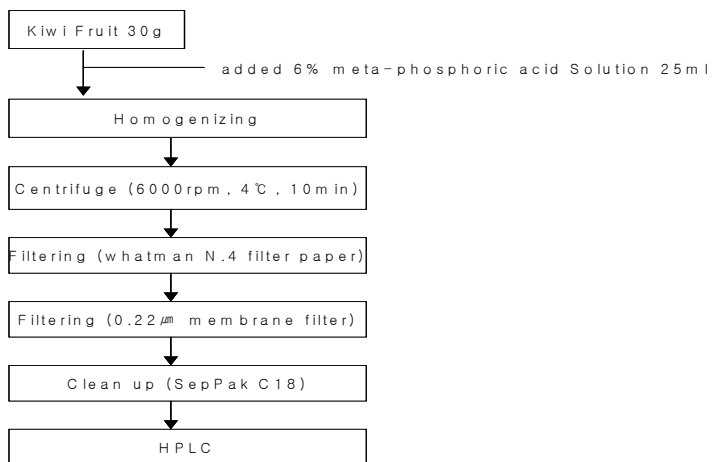


Fig. 1. Extraction procedure of ascorbic acid from kiwifruit.

먼저 참다래 과실의 과육 50g에 sodium carbonate 1 g을 첨가하고 1%의 BHT를 포함하고 차가운 아세톤을 약 80%의 추출용액이 되도록 첨가하였다. 이를 homogenizer를 이용하여 곱게 간 다음 원심분리기를 이용하여 4°C, 4,000 rpm에서 10분 동안 원심분리를 실시하였다. 원심분리가 끝난 시료는 거름종이 (whatman No. 4)를 이용하여 상등액을 얻은 후 분액 깔대기로 옮겼다. 여기에 diethyl ether 500 mL와 증류수 500 mL를 첨가하여 천천히 흔든 다음 스텐드를 이용하여 정치(standing) 시켰다. 디에틸에테르층과 물층이 분획이 이루어진 후 물층을 버리고 다시 증류수 500 mL를 첨가하면서 같은 작업은 5회 동안 실시하면서 아세톤을 제거하였다. 디에틸에테르 층은 감압농축기(evaporator)를 이용하여 30°C에서 농축하였으며, 여기에 디에틸에테르 20 mL를 첨가하여 녹였다. 클로로필 관련물질을 제거하기 위하여 10%의 methanolic KOH를 20 mL 첨가한 후 shaking incubator를 이용하여 37°C에서 1시간동안 암조건으로 배양하였다. 과실 내의 클로로필 관련 물질의 존재유무 비교를 위한 시료로서 엽록소를 제거하지 않는 경우는 이 과정을 생략하였다. 한 시간 동안 배양된 시료는 saturated NH₄Cl 용액을 첨가한 후 증류수를 이용하여 5-10회 동안 washing을 실시하여 클로로필 관련 물질을 제거하였다. 여기에 Na₂SO₄를 첨가하여 수분을 제거한 다음 농축을 실시하였다. 농축된 시료는 0.1 %의 BHT를 포함하는 용매(EtOAc:MeOH=1:1) 5 mL에 녹인 후 HPLC 분석을 실시하였다(Fig. 2). HPLC 분석을 위한 컬럼은 μ Bondapak™ C18 125Å, 10μm column(3.9 ×150mm)을 이용하였고 이동상은 MeOH:H₂O (75:25)과 EtOAc(100)를 gradient로 하였으며, 유속 1ml/min, 그리고 함량분석은 UV 430 nm에서 30분 동안 실시하였다.

라. TLC를 이용한 비타민 A 및 클로로필 관련물질 분석

참다래 과실내의 엽록소와 carotenoid의 존재유무와 *A. deliciosa*와 *A. chinensis*의 과육에서의 함량을 비교하기 위하여 *A. deliciosa* 중에서는 ‘대흥’ 품종을 사용하였고, *A. chinensis* 중에서는 ‘해남’ 품종을 사용하였다. 또한 KOH처리로서 클로로필 관련물질의 제거 유무를 확인과 lutein 및 β-carotene의 존재유무를 확인하기 위하여 *A. deliciosa* cv ‘Hayward’를 이용하여 KOH 처리 전후, 그리고 표품을 이용하여 TLC를 실시하였다. TLC를 위한 이동상은 석유 에테르와 아세톤을 3:1 비율로 혼합하여 사용하였다.

마. 시기별 비타민 A관련 대사물질 함량 변화

‘Hayward’와 ‘Daeheung’ 품종을 이용하여 유과기인 6월에서 수확기인 10월말까지 1개월 단위로 lutein과 β-carotene 분석을 실시하였다.

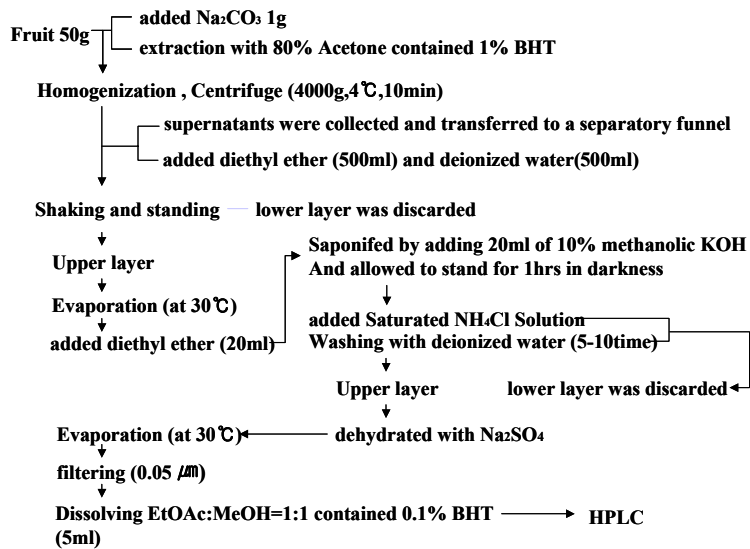


Fig. 2. Extraction procedure of carotenoids from kiwifruit.

바. 참다래 계통별 항산화능 분석

참다래 주요 품종의 항산화능 검정은 Hatano 등(1988)의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) assay 방법을 사용하였다. 참다래 11계통의 과실을 믹서기로 곱게 간 다음 메틸알콜로 추출한 후 1000 mg/L로 희석하여 사용하였다. 추출된 시료는 15 mL 시험관에 1 mL 넣은 후 0.15 mM DPPH radical solution을 1 mL 첨가하여 vortexing 하였다. 이를 30°C에서 5분, 그리고 30분 동안 반응 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 다음과 같은 계산식으로 계산하였다.

$$1 - (\text{시료첨가구 흡광도} / \text{무첨가구 흡광도}) \times 100$$

또한 참다래의 항산화능은 0, 50, 100, 250, 그리고 500 ppm 농도로 만들어진 BHT용액의 항산화능과 비교하였다.

사. 재배환경에 따른 비타민 함량 변화 분석

참다래 재배환경과 비타민 함량과의 관계를 구명코자 참다래가 재배되는 장소인 비가림하우스와 노지, 그리고 참다래가 재배되지 않는 야외를 대상으로 온도와 습도 등에 대한 조사를 2003년 9월에서 2004년 9월까지 1년 동안 실시하였다. 각각의 조사에서 비가림하우스 재배는 house, 노지재배는 field, 그리고 참다래가 재배되지 않는 야외는 open field로 표기하였다.

아. 형질전환 식물체의 생육특성과 비타민 분석

본 과제의 책임자로부터 *Psy* gene과 *Chx* gene을 이용하여 형질전환을 실시한 후 PCR로 형질전환이 확인된 식물체 9개체를 개체를 분양 받은 후 GMO 온실에서 재배를 하면서 식물체의 생육특성을 조사하였고 lutein과 β -carotene 분석은 형질전환이 이루어지지 않은 개체와 형질전환체 각각의 클론의 잎 1 g을 상기에서 표기한 방법에 따라 추출한 후 HPLC로 분석하였다.

2. 연구 결과 및 고찰

가. 주요 품종별 과실특성

1) 주요품종의 과실특성

A. deliciosa 5 품종과 *A. chinensis* 5 품종 등 10개의 국내외 참다래 주요 품종의 국내 재배에 대하여 과중, 경도, 당도 및 산도 등의 과실특성을 분석하여 우리나라 참다래 재배농가에게 기초 자료를 제공코자 실시하였다(Table 1).

Table. 1. Fruit characteristics of kiwifruits cultivated in Jeju.

Species	Variety	Length (mm)	Width (mm)	Fresh weight(g)	Soluble solids (°Brix)	Citric acid (% FW)	Firmness (kgf)	Flesh color
<i>A. deliciosa</i>	Hayward	65.8	49.6	88.1	14.4	0.5	0.02	Green
	Daeheung	80.9	56.0	132.5	15.6	0.8	0.01	Green
	ELM Wood	69.2	52.2	100.3	11.0	2.0	3.33	Green
	Hwabuk 94	70.1	53.0	113.1	11.5	1.9	2.38	Green
	Zespri Green	67.8	50.4	100.7	13.2	1.1	0.45	Green
<i>A. chinensis</i>	Apple Sensation	56.7	62.0	127.6	15.8	0.8	0.05	Yellow
	Haenam	59.5	56.2	118.2	15.6	1.5	0.10	Yellow
	First Emperor	65.4	49.5	99.0	11.8	2.0	1.85	Yellow
	Zespri Gold	78.5	58.3	112.8	14.3	0.7	0.16	Yellow

과실의 모양은 *A. deliciosa* 품종들은 모두 타원형에 가까웠으며, 특히 ‘대홍’ 품종의 경우는 타 품종에 비하여 종경이 횡경보다 훨씬 커서 장타원형을 나타내었다. 또한 *A. chinensis* 품종들의 경우에도 타원형에 가까웠으나 ‘애플 센세이션’의 경우 종경은 56.7 mm인데 비하여 횡경이 62.0 mm로서 원형에 가깝고 특히 사과와 모양과 유사하다하여 ‘애플 센세이션’으로 명명되었다는 것은 이미 널리 알려진 사실이다. 과중은 대부분의 품종에서 100 g 이상으로 나타났으며, *A. deliciosa*의 경우 2003년 국내에서 등록된 ‘대홍’ 품종이 127.2 g으로 가장 컸고 ‘헤이워드’의 경우는 93.7 g으로 나타났다. *A. deliciosa* 품종들에 비하여 숙기가 빠른 것으로 알려진 *A. chinensis* 품종들의 경우는 ‘애플 센세이션’이 127.6 g으로 가장 과중이 크게 나타났으며, 뉴질랜드에서 수입되어 국내에서 유통되고 있는 ‘제스프리 그린’과 ‘제스프리 골드’의 경우는 100~115 g 범위에 포함되었다. 한편 국내에서 재배된 모든 품종들에서 기존에 보고되고 있는 과중보다 작게 나타난 것은 재배관리상에서 나타난 결과이다. 당도는 ‘대홍’, ‘애플 센세이션’ 및 ‘해남’ 품종에서 각각 16.0 °Brix, 15.8 °Brix, 그리고 15.6 °Brix로 높게 나타났으며, ‘헤이워드’의 경우도 14.1 °Brix를 나타내었다. 국내에서 시판중인 제스프리 품종들은 12.7 °Brix와 14.3 °Brix를 나타내었다. 적정 후숙이 이루어진 품종들에서 산도는 0.5~1.1%로 나타났으며, 경도는 0.1~0.3 kgf를 나타내었다. 과육색은 *A. deliciosa* 품종들은 녹색을 나타내었으며, *A. chinensis* 품종들은 노란색을 나

타내었다. 한편 ‘ELM Wood’, ‘화북 94’ 및 ‘퍼스트 엠퍼러’의 경우는 약 11 °Brix로서 아주 낮게 나타났는데 이는 산도 및 경도 등을 볼 때 후숙이 완전히 이루어지지 않았던 것으로 판단된다.

2) 과실 발육단계별 과실특성 분석

참다래 과실이 성숙 및 부패되어가는 과정에서의 변화를 구명하여 재배 및 마케팅을 위한 기초자료로 제공코자 6월부터 11월까지 1개월 단위로 조사한 결과 과중은 유과단계인 6월 2일에는 ‘헤이워드’ 품종이 5.6 g으로 가장 작았고, 가장 큰 ‘대홍’ 품종은 12.8 g을 나타내었다. 한편 7월 10일에는 *A. deliciosa* 품종들은 35~50 g 정도의 과중 증가를 나타내었고, *A. chinensis* 품종들은 65 g 이상의 과중증가를 나타내어 과실비대가 가장 급격히 일어나는 것으로 확인되었다. 과실의 비대속도는 점차 둔화되면서 *A. deliciosa* 품종들은 11월 수확기까지 비대는 조금씩 이루어지지만 *A. chinensis* 품종들은 10월 초순경에 사실상의 비대가 완료되는 것으로 나타났다(Fig. 3).

당도는 유과단계에서는 모든 품종에서 약 4.14~4.41 °Brix 정도로 낮았으나 성숙되면서 서서히 증가하기 시작하여 수확기인 11월 초순에는 모든 품종에서 7.5 °Brix 이상의 높은 당도를 나타내었다. 한편 Ferguson(1999)은 뉴질랜드에서 재배중인 헤이워드 품종의 경우 수확기를 6.2 °Brix 이상으로 해야 마케팅에 문제가 발생하지 않는다고 하였는데 제주지역에서 재배중인 참다래의 경우 11월 초가 수확기로서 적절하다고 판단되었다. 또한 *A. chinensis*종인 ‘애플 센세이션’의 경우는 11월 초에 이미 당도가 10.7 °Brix로서 아주 높게 나타났다. 이는 *A. chinensis* 종들이 *A. deliciosa* 종들보다 숙기가 15일에서 30일까지 빠르기 때문에 나타나는 현상이라 판단된다. 한편 후숙 시 최고의 당도를 나타내었던 참다래는 과숙이 되면서 당도가 감소하기 시작하여 부패하였을 경우 2 °Brix 이상 낮아져서 참다래에서 적정 후숙시기를 잘 조절하는 것이 마케팅에 중요한 요인이 될 수 있다고 판단되었다(Fig. 4).

산도는 유과단계에서는 1.5%를 나타내었으나 성숙되면서 산도가 증가하였으며, 수확기인 11월 초순까지 산도가 유지되다가 후숙되면서 급격히 감소하였다. 또한 모든 품종에서 과실이 과숙되면서 산도가 증가하기 시작하였으며, 부패과에서는 산도가 크게 증가하였다(Fig. 5).

경도는 6월초순의 유과단계에서는 ‘헤이워드’ 3.63, ‘대홍’ 3.53 및 ‘애플 센세이션’ 4.73으로 높게 나타났으며, 수확기까지 유지되다가 후숙이 되면서 0.02~0.15로 급격히 감소하였다(Fig. 6).

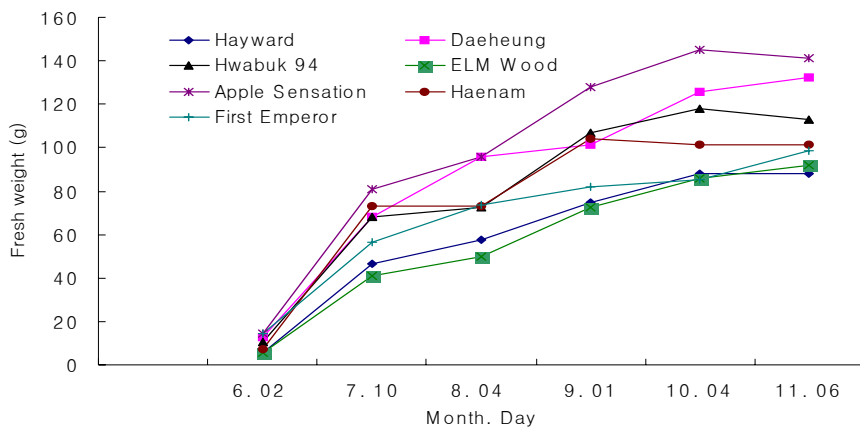


Fig. 3. Change of fresh weight during fruit development in kiwifruit.

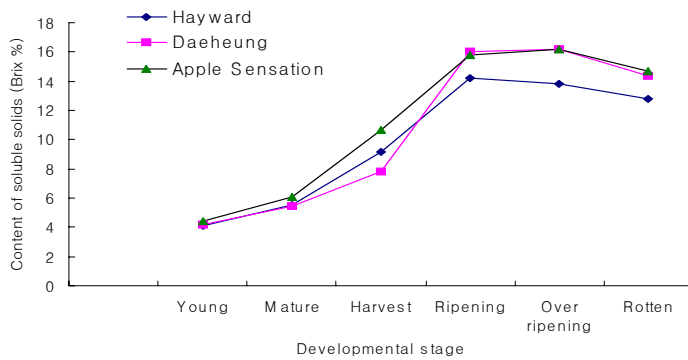


Fig. 4. Change of firmness during fruit development in kiwifruit.

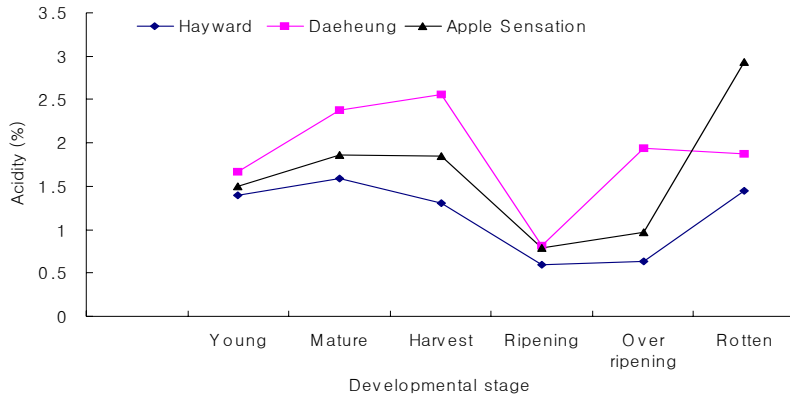


Fig. 5. Change of citric acid content during fruit development in kiwifruit.

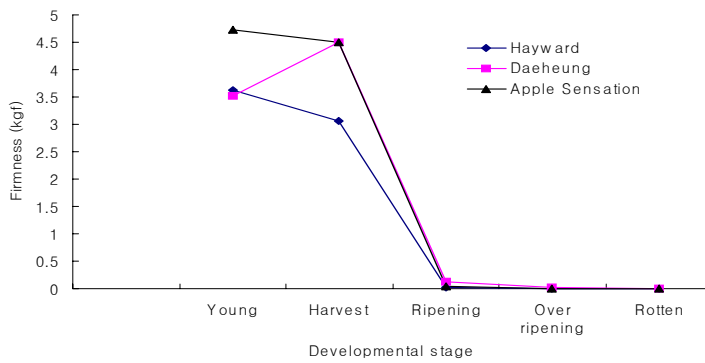


Fig. 6. Change of firmness during fruit development in kiwifruit.

나. 주요 품종 및 계통의 비타민 분석

1) 주요 계통별 비타민 C 분석

참다래 주요 계통별로 비타민 C 분석을 위하여 참다래 과실에서 비타민 C를 추출한 HPLC로 분석한 결과 약 6분대에서 단일 peak로 나타났다. 표준을 이용하여 농도와 HPLC 분석데이터의 면적 값 사이의 회귀직선의 방정식을 조사한 결과 $y = 0.00176 X + 0.38988$, 상관계수가 $R^2 = 0.99846$ 로 고도의 유의성이 인정되었다(Fig. 7과 8).

비타민 C 분석을 위한 최적조건을 찾기 위하여 참다래에서 추출한 비타민 C 추출물을 상온과 4℃에 보관하면서 12시간 간격으로 2일 동안 분석한 결과 최종 산물은 4℃보다는 상온에서 추출 즉시 분석하는 것이 가장 안정적인 결과를 얻을 수 있는 것으로 확인되었다(Fig. 9).

참다래 8계통에 대하여 계통별 비타민 C 함량을 분석한 결과 *A. eriantha*에서 426.7 mg/100g으로 가장 높았으며, *A. deliciosa* 보다 *A. chinensis* 계통이 2배 이상 높았다. *A. deliciosa* 품종 가운데는 뉴질랜드에서 수입되어 시중에 유통 중인 ‘제스프리그린’이 93.9 mg/100g으로 가장 높았으며 국내에서 재배 중인 품종 가운데는 ‘대홍’의 비타민 C 함량이 77.46 mg/100g으로 가장 높았다. *A. chinensis* 품종 가운데는 ‘애플센세이션’이 160.6 mg/100g으로 가장 높게 나타났으며 ‘제스프리 골드’가 98.2 mg/100g으로 가장 낮았다(Table 2).

Table 2. Comparisons of ascorbic acid contents among several kinds of kiwifruit cultivars.

Variety	<i>A. deliciosa</i>					<i>A. chinensis</i>				<i>A. eriantha</i>
	Hayward	Hwabuk '94	ELM Wood	Dae-heung	Zespri Green	Haenam	Apple	야생형	Zespri Gold	
Content (mg/100g FW)	50.41	50.98	42.64	77.46	93.9	118.05	160.57	160.02	98.2	426.65
Harvest time (Month. Day)	11. 20	11. 20	11. 20	11. 01	6. 14 ^a	11. 01	10. 20	10. 20	6.14 ^a	11. 20

a: 시중에서 구입한 날짜

한편 뉴질랜드의 제스프리사는 ‘제스프리 골드’가 까지 1개월 단위로 5회 동안 과실의 무게와 비타민 C 분석을 실시하였다. *A. deliciosa* 와 *A. chinensis*의 교배조합에 의하여 선발된 것이라고 하였는데, 이 보고를 근거로 볼 때 비타민 C

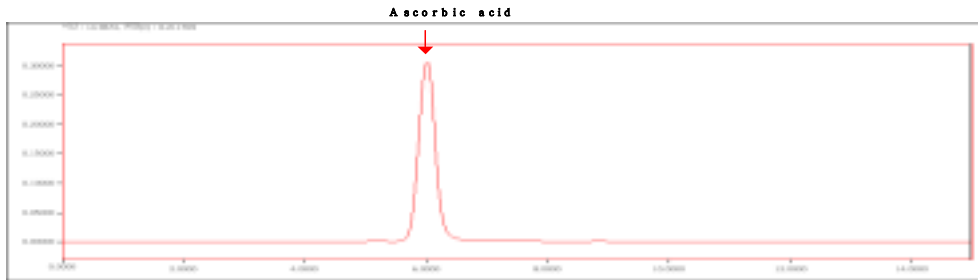


Fig. 7. HPLC chromatogram of ascorbic acid in kiwifruit.

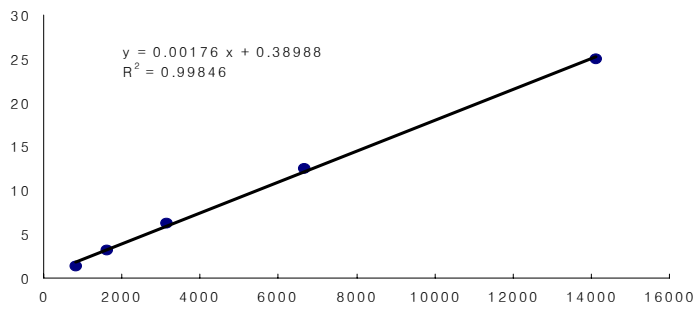


Fig. 8. Relationship between standard ascorbic acid content and absorbance by HPLC.

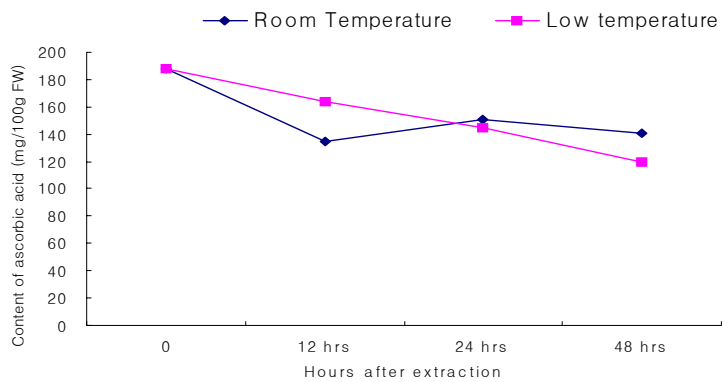


Fig. 9. Change of ascorbic acid content during storage after extraction in 'Apple Sensation' kiwifruit.

함량은 *A. deliciosa*의 영향을 받은 것이 아닌가 여겨지며 앞으로 이에 대한 보다 세밀한 검토가 필요하다고 사료된다. 또한 국내에서 재배중인 *A. deliciosa* 품종들의 경우에는 비타민 C 함량을 높일 수 있는 방법이 검토되어야 할 것이다.

2) 시기별 비타민 C 분석

시기별 비타민 C 함량의 변화를 구명하기 위하여 *A. deliciosa* cv. 'Hayward'와 *A. chinensis* cv. 'Apple Sensation' 품종을 이용하여 유과기인 6월에서 수확기인 10월말까지 분석을 실시하였다.

유과기인 6월에는 '헤이워드'의 경우 과실의 무게 44.3g에 비타민 C 함량은 173.5 mg/100g으로 가장 높았으며, 7월에 과실크기가 75.2 g으로 크게 증가하는 반면 비타민 C 함량은 67.4 mg/100g으로 급격히 감소하였다. 8월부터 수확기까지는 과실비대가 조금씩 밖에 이루어지지 않았다. 한편 비타민 C 함량은 9월 말까지 감소하다가 과실비대가 거의 완료되어 수확기에 다다르면서 비타민 C 함량이 조금씩 높아졌다(Fig. 10). '애플 센세이션'의 경우에는 6월 말 현재 과실의 크기가 88.2 g으로 '헤이워드'에 비하여 과실이 컸으며, 비타민 C 함량은 165.8 mg/100g으로 높게 나타났다. 시기별 비타민 C 함량은 7월 말까지 급격히 감소하였으나 그 이후에는 수확기까지 계속적으로 증가하였다(Fig. 11).

한편 비타민 C 함량이 낮은 품종인 '헤이워드' 품종과 비타민 C 함량이 높은 '애플 센세이션' 품종 모두에서 과실의 가장 많이 비대하는 6월에서 7월의 경우 비타민 C 함량이 급격히 감소하였고, 또한 과실비대가 비교적 적은 시기에는 비타민 C 함량이 조금씩 높아졌던 점과 유과기인 6월에 비타민 C 함량이 아주 높은 점 등을 토대로 볼 때 이는 잎 등 다른 조직에서 비타민 C가 합성되어 과실에 축적되고 있음을 나타낸다. 또한 비타민 C가 과실이 발달단계에서 다른 지역에서 전류되어 오는 것 이외에도 과실에서 분해가 계속적으로 이루어지고 있는 것으로 추정되며 이에 대한 보다 세밀한 연구가 이루어져야 할 것으로 여겨진다.

A. chinensis 품종들이 *A. deliciosa* 품종들 보다 비타민 C 함량이 높은 이유를 구명하고자 *A. chinensis* 계통의 '해남', '애플 센세이션', 'CS9412', 그리고 'CS984' 등 4품종과 *A. deliciosa* 계통의 '헤이워드', '대홍', 그리고 'ELM Wood' 등 3품종에 대하여 시기별 비타민 C 함량의 변화를 조사하였다.

본 연구결과 *A. chinensis*의 경우 모든 품종들에서 6월에서 7월 사이에 비타민 C 함량이 갑자기 떨어졌으나 그 후에 계속 증가하여 초기의 비타민 C 함량을 회복하였다. 품종간 비교에서는 야생종인 'CS984'가 가장 변화의 폭이 작았으며, 다른 3개의 품종은 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 12).

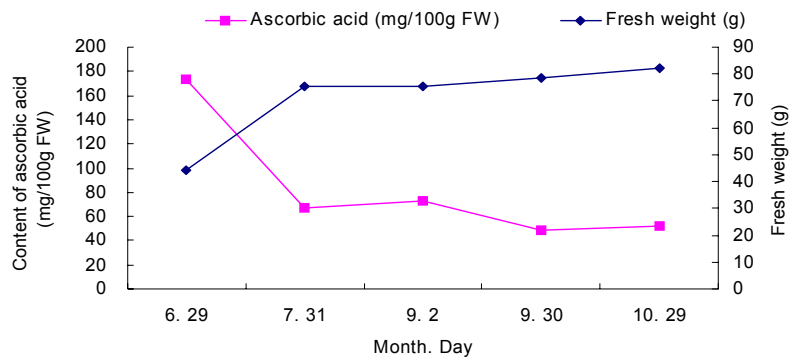


Fig. 10. Change of ascorbic acid content during fruit development in 'Hayward' kiwifruit.

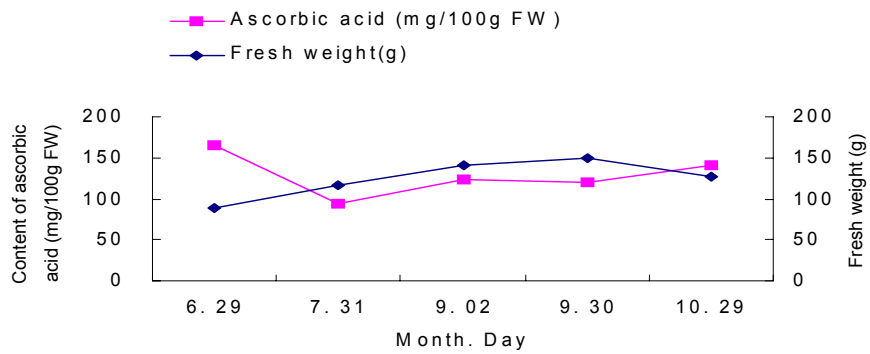


Fig. 11. Change of ascorbic acid content during fruit development in 'Apple Sensation' kiwifruit.

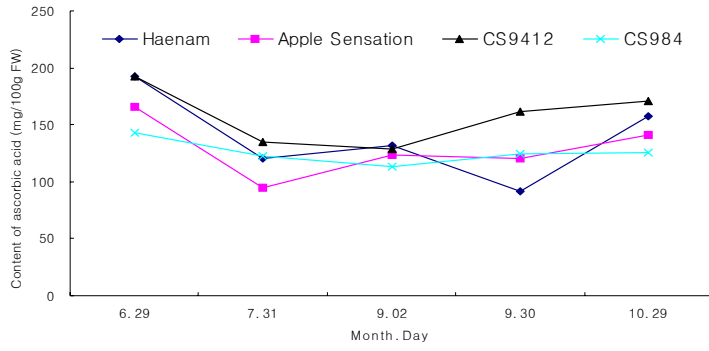


Fig. 12. Change of ascorbic acid content during fruit development in *A. chinensis* spp.

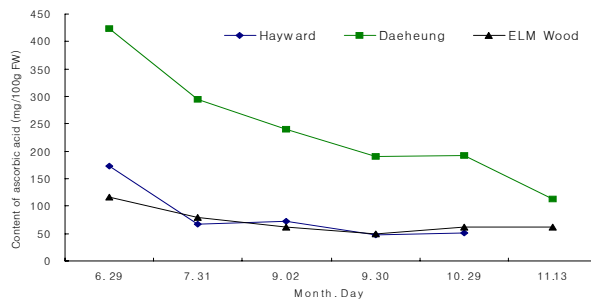


Fig. 13. Change of ascorbic acid content during fruit development in *A. deliciosa* spp.

*A. deliciosa*의 경우에는 모든 품종들에서 6월에서 7월 사이에 비타민 C 함량이 갑자기 떨어진 후 유과기의 농도를 회복하지 못하고 계속적으로 낮은 농도로 유지되었다. 품종간 비교에서는 '대홍'이 가장 변화의 폭이 크게 나타났다(Fig. 13). 그림 12과 그림 13의 결과를 토대로 볼 때 과육이 노란색인 *A. chinensis* 경우가 과육이 녹색인 *A. deliciosa* 품종들보다 비타민 C 함량변화가 작았다. 이 결과는 *A. chinensis* 품종이 과실내 비타민 농도가 높아지는 요인을 설명해 주고 있으며, 교배육종으로 비타민 C가 높은 참다래를 얻고자 한다면 *A. chinensis*와 *A. deliciosa*의 중간교배를 이용하는 것이 유리하다고 사료된다.

3) 비타민 A 관련물질 분석기술 확립

① TLC를 이용한 비타민 A 및 클로로필 관련물질 분석

참다래 과실내 엽록소와 carotenoids의 존재유무와 *A. deliciosa*와 *A. chinensis*의 과육에서의 존재유무를 비교하기 위하여 Thin layer chromatography(TLC)를 실시하였다. *A. deliciosa* 종에서는 '대홍' 품종을 사용하였고, *A. chinensis* 종에서는 '해남' 품종을 사용하였다.

Table 3. TLC bands separated from fruit extracts in *A. deliciosa* cv. 'Daeheung' and *A. chinensis* cv. 'Haenam'.

Band	Color	Rf	Chem. class
1	Yellow	0.96	carotenes
2	Gray	0.80	chlorophylls
3	Gray-Green	0.70	chlorophylls
4	Green	0.63	chlorophylls
5	Light-green	0.60	chlorophylls
6	Green-yellow	0.51	chlorophylls
7	Orange-yellow	0.46	xanthophylls
8	Light yellow	0.38	xanthophylls
9	Light yellow	0.29	xanthophylls
10	Yellow	0.13	xanthophylls

*A. deliciosa*인 '대홍'과 *A. chinensis*인 '해남'에 대한 TLC 결과 약 10종류의 물질들이 육안으로 확인되었다. 이들 물질 특성별로 분류해 본 결과 xanthophyll 계열에 4개의 물질이 가장 아래쪽인 Rf 0.13에서 Rf 0.46 범위에 위치하였고,

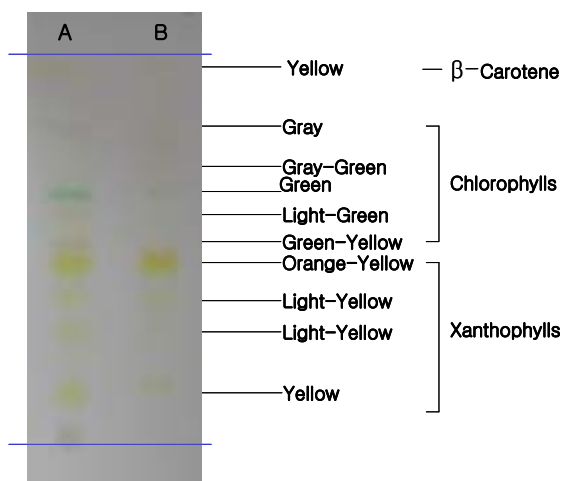


Fig. 14. Comparison of TLC chromatograms on carotenoids extracts between
A. deliciosa and *A. chinensis*.

A, *A. deliciosa* cv 'Daeheung';

B, *A. chinensis* cv. 'Haenam'.

Running buffer is petroleum ether : acetone = 3 : 1

chlorophyll 계열의 5개의 물질이 Rf 0.51에서 Rf 0.80 범위에 위치하였다. 가장 위쪽에는 β -carotene이 Rf 0.96 위치에 나타났다(Fig. 14, Table 3). 한 편 과육색이 녹색인 ‘대홍’과 과육색이 노란색인 ‘해남’품종을 비교한 결과 ‘대홍’품종에서 클로로필 관련물질이 강하게 나타나 클로로필이 *A. delicosa* 종에서 녹색의 과육색을 나타낸다는 보고(Cano, 1991; McGhie and Ainge, 2002)를 강하게 뒷받침해 주었다.

참다래의 carotenoids 분석에 있어서 다량으로 함유된 chlorophyll 계열물질은 참다래 품종들간의 정량분석에 많은 장애요인이 될 수 있다. 본 연구에서는 보다 신뢰성 있는 추출방법을 개발하기 위하여 KOH 처리 유무에 따른 carotenoids의 추출여부를 TLC와 HPLC 분석을 통하여 비교하였다. 또한 표품을 이용하여 참다래 추출물로부터 lutein과 β -carotene이 존재여부를 확인하였다.

TLC 결과 KOH 처리에 의하여 chlorophyll 계열의 물질들이 제거됨을 확인할 수 있었으며, 표품의 크로마토그램과 비교한 결과 lutein은 Rf 0.31 그리고 β -carotene은 Rf 0.96 부위에서 확인되었다(Fig. 15).

② HPLC를 이용한 비타민 A 관련물질 분석 비교

참다래 과실에서 Carotenoids에 대한 HPLC 분석을 위하여 KOH 처리 전후의 크로마토그램을 비교한 결과 KOH를 처리하지 않은 경우에는 클로로필 계열의 물질들로 인하여 깨끗한 HPLC 크로마토그램을 얻기가 어려웠으며, 특히 β -carotene의 경우 KOH 처리로 깨끗한 peak가 나타났다(Fig. 16). 또한 표품의 HPLC 크로마토그램과 비교한 결과 *All-trans*-lutein은 7.2분대, β -carotene은 14분대에서 나타났으며, 이들 peak들에 대하여 Cano(1991)와 Watanabe와 Tahahashi(1999)의 보고를 토대로 물질들을 분류한 결과는 그림 16과 같다. 그러나 이 물질들의 정확한 판단을 위해서는 보다 많은 연구가 필요하다는 점은 분명하다.

표품을 이용하여 농도와 HPLC 분석데이터의 면적 값 사이의 회귀직선의 방정식을 조사한 결과 lutein은 $y = 0.0000002 X + 0.0000320$, 상관계수가 $R^2 = 0.99860$ 이었으며, β -carotene은 $y = 0.0000003 X + 0.0000022$, 상관계수가 $R^2 = 0.99939$ 로 고도의 유의성이 인정되었다(Fig. 17과 18).

그림 19는 ‘헤이워드’와 ‘대홍’ 품종을 대상으로 참다래 carotenoid에 대한 HPLC 크로마토그램을 나타내고 있으며, 이들 크로마토그램은 품종간에 큰 차이를 발견할 수가 없었다.

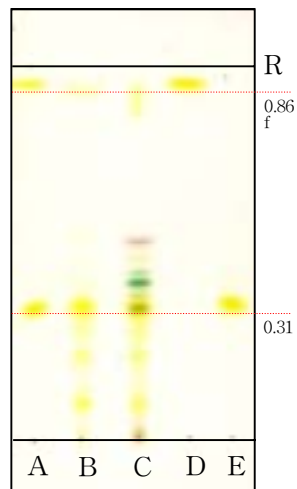


Fig. 15. TLC chromatogram of chlorophylls and carotenoids in *A. deliciosa* cv. 'Hayward'. Running buffer is P. ether:Acetone=3:1

A, β -carotene and all-trans lutein; B, After KOH treatment; C, Before KOH treatment; D, all-trans lutein; E, β -carotene

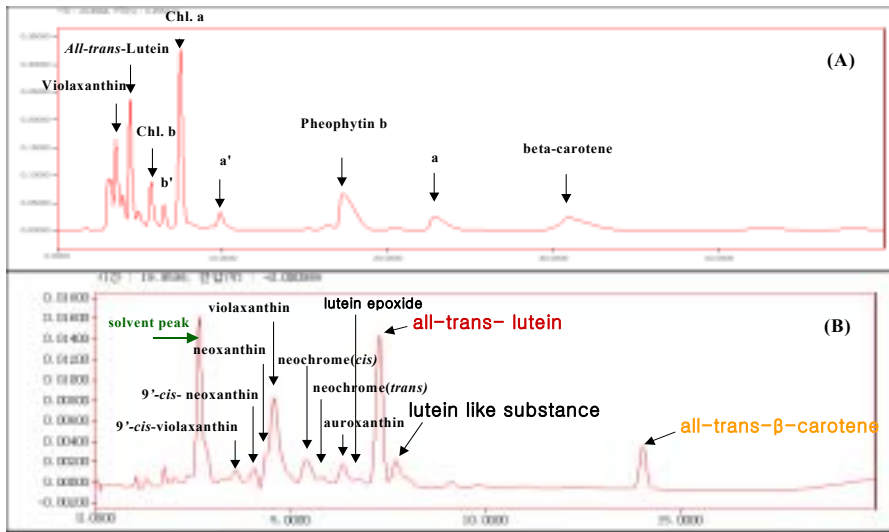


Fig. 16. HPLC chromatograms of carotenoids extracts before(A) and after(B) treatment with 10% KOH in 'Daeheung' kiwifruit.

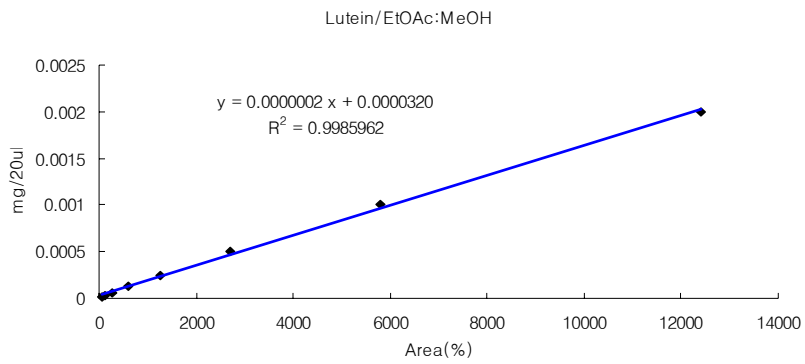


Fig. 17. Relationship between standard lutein content and absorbance by HPLC.

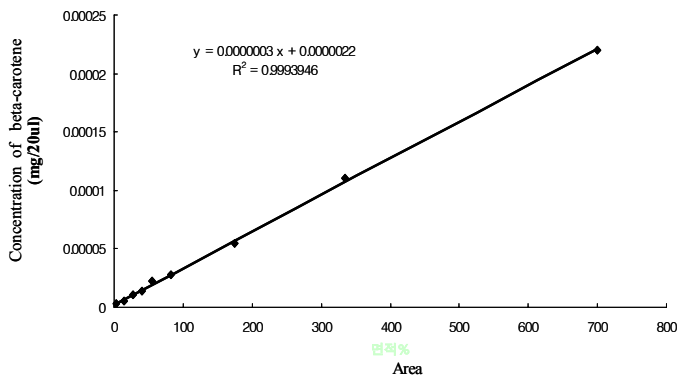


Fig. 18. Relationship between standard β -carotene contents and absorbance by HPLC.

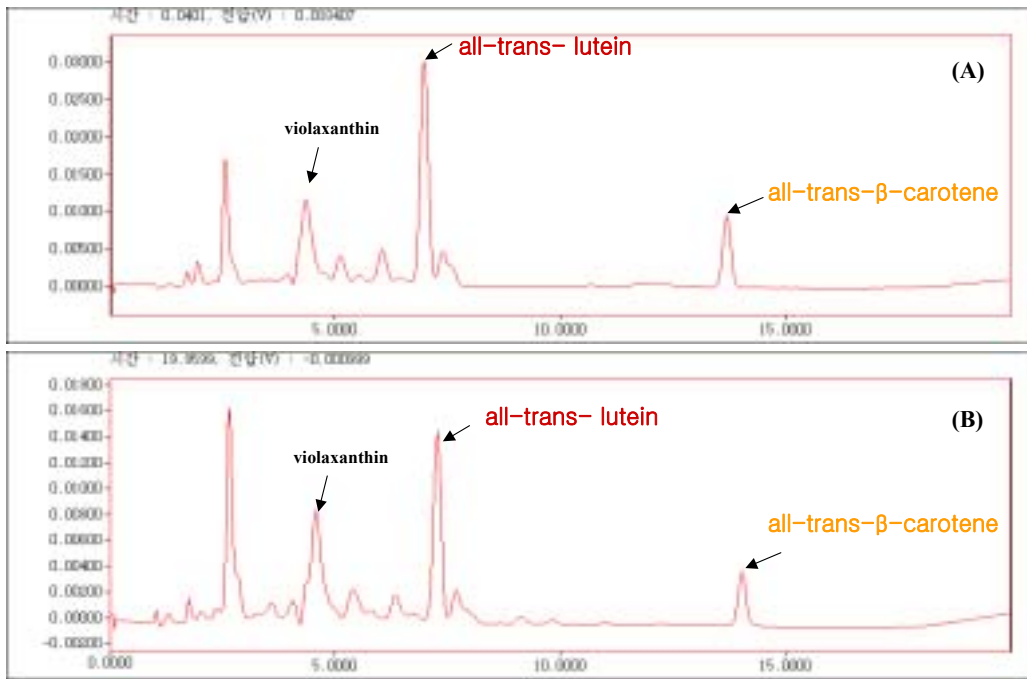


Fig. 19. HPLC chromatograms of carotenoids in 'Hayward'(A) and 'Daeheung'(B) kiwifruit.

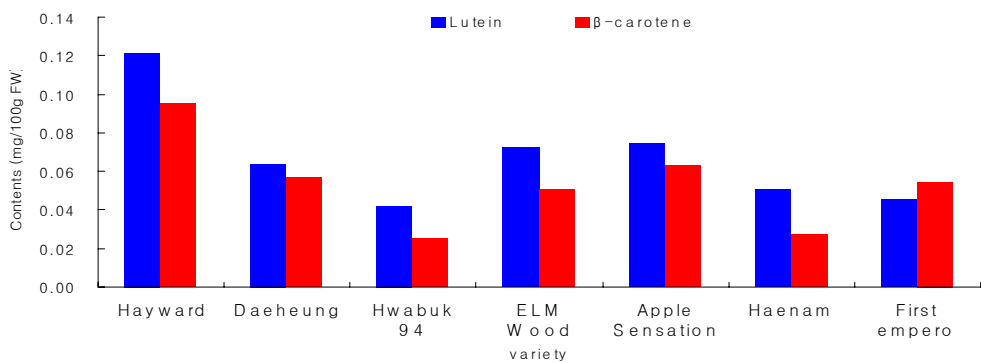


Fig. 20. Comparisons of lutein and β-carotene contents among several kinds of kiwifruit cultivars.

참다래 7품종에 대하여 lutein과 β -carotene 함량을 분석한 결과 ‘헤이워드’ 품종이 lutein과 β -carotene 함량 모두에서 0.12 mg/100g과 0.10 mg/100g으로 가장 높았으며, ‘화북 94’와 ‘해남’ 품종이 가장 낮았다. 종에 따른 비교에서 *A. deliciosa* 품종들과 *A. chinensis* 품종들 간에는 유의성을 발견 할 수가 없었다. 품종간 비교해 볼 때 lutein은 ‘헤이워드’ > ‘애플 센세이션’ > ‘ELM Wood’ > ‘대홍’ > ‘해남’ > ‘First Emperor’ > ‘화북 94’ 순으로 나타났다. β -carotene은 ‘헤이워드’ > ‘애플 센세이션’ > ‘대홍’ > ‘First Emperor’ > ‘ELM Wood’ > ‘해남’ = ‘화북 94’ 순으로 나타났다(Fig. 20).

4) 시기별 비타민 A관련 대사물질 함량 변화

‘헤이워드’와 ‘대홍’ 품종을 이용하여 과실의 발달 단계에 따른 lutein 함량의 변화를 조사한 결과 유과기인 6월에 ‘헤이워드’ 0.13 mg/100g, 그리고 ‘대홍’은 0.12 mg/100g을 나타내었으며 과실이 발달하면서 점차 낮아졌다. 이들 함량은 10월에 0.06 mg/100g과 0.05 mg/100g으로 가장 낮아졌으나 후숙이 되면서 높아져 후숙 과실의 경우 ‘헤이워드’는 0.15 mg/100g, 그리고 ‘대홍’은 0.11 mg/100g으로 유과기의 함량과 유사하였다(Fig. 21).

β -carotene 함량은 유과기인 6월에 ‘헤이워드’ 0.13 mg/100g, ‘대홍’ 0.16 mg/100g으로 가장 높게 나타났으며 과실이 발달하면서 점차 낮아졌다. β -carotene 함량 또한 후숙 후에는 ‘헤이워드’ 0.10 mg/100g, 그리고 ‘대홍’은 0.08 mg/100g로 높아졌다. 이러한 결과는 참다래의 경우 과실을 후숙 시킨 후 먹는 것이 lutein과 β -carotene 등의 비타민 A관련 대사물질을 다량 섭취할 수 있음을 나타낸다(Fig. 22).

다. 참다래 계통별 항산화능 분석

참다래 주요 품종의 항산화능 검정은 Hatano 등(1988)의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) assay 방법을 사용하였다. DPPH는 매우 안정한 free radical로서 517nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물로서 알코올 등의 유기용매에서 매우 안정하며 특히 여러 가지 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다.

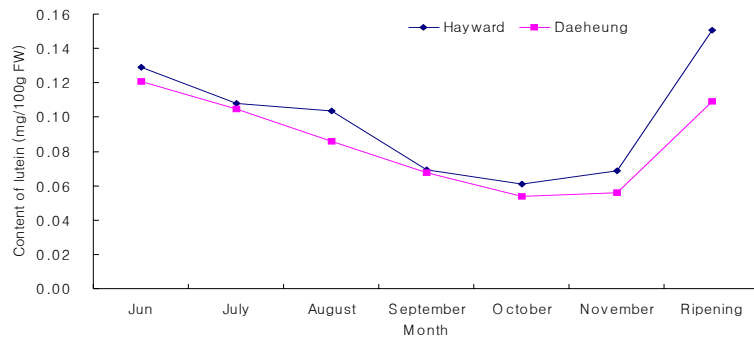


Fig. 21. Changes of lutein content during fruit development in 'Hayward' and 'Daeheung' kiwifruit.

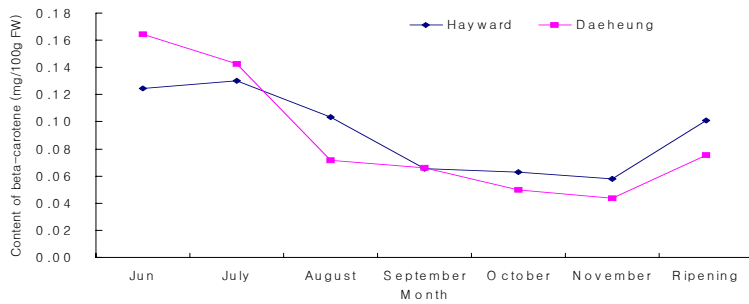


Fig. 22. Changes of β -carotene content during fruit development in 'Hayward' and 'Daeheung' kiwifruit.

참다래 11계통에 대하여 항산화능을 조사한 결과(Fig. 23) DPPH 처리 5분 후 BHT 50 mg/L 처리에서 38.8%의 항산화율을 나타내었으며, 이 때 참다래 품종별 항산화율은 ‘헤이워드’ 26.8%에서 ‘골든 옐로우’ 62.1%까지 다양하였다. *A. deliciosa*에서는 ‘체스프리 그린’이 32.9%로 가장 높았으며, ‘대홍’과 ‘ELM Wood’가 31%로 유사하였다. *A. chinensis*에서는 ‘골든 옐로우’가 62.1%로 가장 높았으며, ‘골든 킹’과 ‘애플센세이션’이 49.6%와 48.1%로 높게 나타났다. 특히 *A. chinensis* 품종들은 *A. deliciosa* 품종들보다 항산화능이 높았으며, 또한 대부분이 BHT 50 mg/L보다 높은 항산화능을 나타내어 참다래 육종시 좋은 소재가 될 수 있을 것으로 판단되었다. 한편 이러한 결과는 비타민 C 함량과 밀접한 연관성이 있을 것으로 사료되며 앞으로 보다 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 판단되었다.

라. 재배환경에 따른 비타민 함량 변화 분석

1) 참다래 재배지 기상환경 조사

참다래 재배환경과 비타민 함량과의 관계를 구명하여 비타민이 강화된 참다래의 생산에 이용코자 참다래가 재배되는 장소인 비가림하우스와 노지, 그리고 참다래가 재배되지 않는 야외를 대상으로 온도와 습도 등에 대한 조사를 2003년 9월에서 2004년 9월까지 1년 동안 실시하였다.

1일 기상환경에 따른 온도의 변화를 조사한 결과 상온의 경우 겨울인 3월 7일에 노지, 하우스, 그리고 야외 등 기상환경에 따른 온도의 차이는 거의 없이 일정하였다(Fig. 25).

지온의 경우 온도변화의 양상은 유사하였으나 최저기온에 있어서 야외가 하우스보다 3℃ 정도 높았으며, 최고온도는 하우스가 높게 나타났다. 한편 하우스의 경우 노지재배지와 야외보다 최저지온이 낮은 것은 겨울철 일조량의 부족에 기인한 것으로 사료된다(Fig 26). 그림 27과 그림 28은 재배환경에 따른 여름철 온도변화를 나타내고 있다. 상온의 경우 최저온도에서는 20℃로 환경에 따른 차이를 나타내지 않았으나 최고 온도에서 야외의 경우 14:00시에 33.6℃를 나타내었으나 노지와 비가림하우스의 경우에는 29.5℃로 4℃이상 낮았다. 지온에 있어서는 야외보다 전체적으로 5℃ 썩 낮게 나타났다. 한편 이는 상온과 지온 모두 참다래 나무 밑인 수관하부에서 측정된 결과로서 참다래 앞으로 그늘막이 형성되어 나타난 결과로 판단된다.

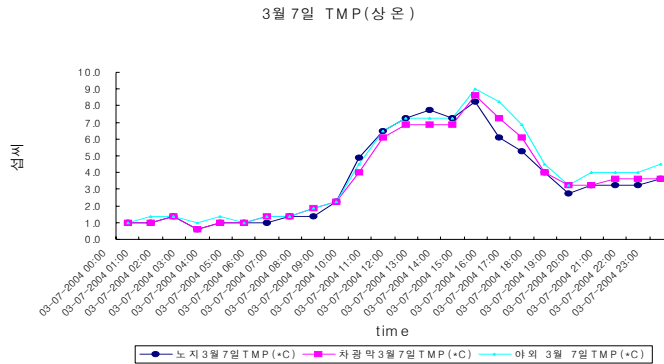


Fig. 25. Change of air temperature on March 3th, 2004.

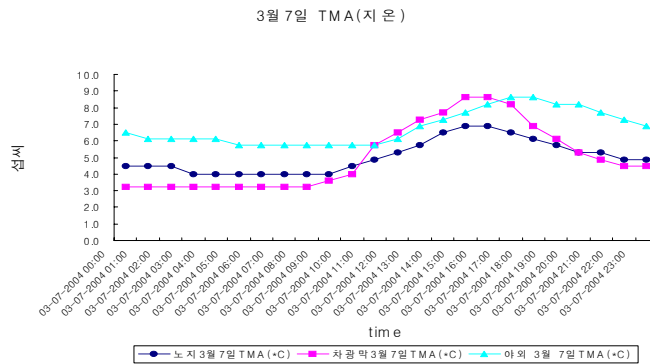


Fig. 26. Change of soil temperature on March 3th, 2004.

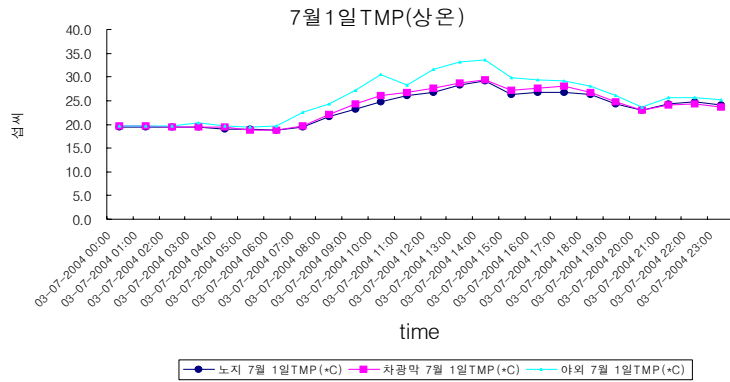


Fig. 27. Change of air temperature on July 1th, 2004.

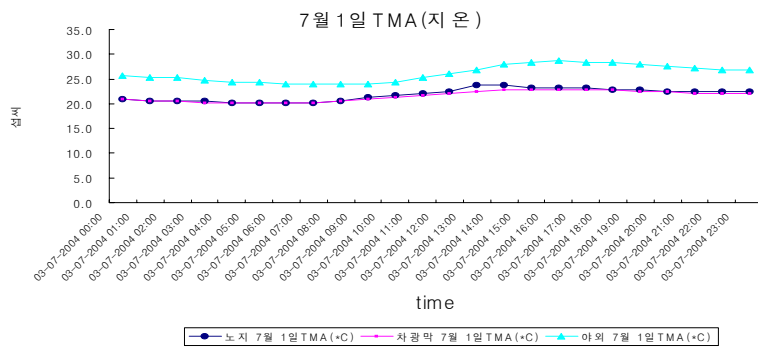


Fig. 28. Change of soil temperature on July 1th, 2004.

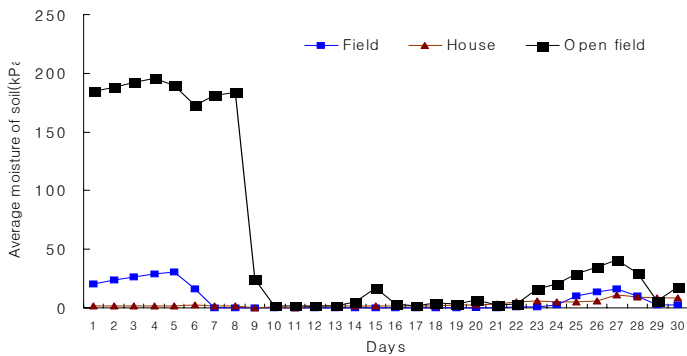


Fig. 29. Change of soil moisture in different culture system for one month of September, 2004.

토양습도는 노지와 야외의 경우에는 같은 양상으로 나타났으며 야외의 경우 외부환경에 따라 민감하게 반응하여 우천시 갑자기 높았다가 맑아지면 갑자기 낮아지는 양상으로 나타났으나 노지는 그 변화가 극히 낮았다. 하우스의 경우에는 외부환경에 변화없이 우천시에도 거의 일정하게 유지되었다.

재배조건에 따른 광환경을 조사한 결과(Table 4), 노지의 경우 수관상부는 자연광선 그대로 받을 수 있으며, 수관하부의 경우에는 광 투과율이 1.1%로 낮았다. 하우스의 경우에는 수관상부의 경우 76%의 광투과율을 나타내었으며, 수관하부의 경우 1.6%정도의 광투과율을 나타내었다. 한편 노지재배와 하우스재배 모두에서 수관하부 광투과율이 낮은 것은 참다래 잎이 무성하여 그늘막이 형성되었기 때문이다.

Table 4. Right environment according to culture condition in kiwifruit.

Month. Day	Open field (Lux)	Field		House			
		Under tree		Upper tree		Under tree	
		Light (Lux)	Transmission (%)	Light (Lux)	Transmission (%)	Light (Lux)	Transmission (%)
9. 23	89,880	960	1.1	68,040	75.7	869	1.3
9. 24	72,900	784	1.1	55,475	76.1	1,140	2.1

2) 재배환경에 따른 생육특성

재배환경에 따른 과실의 특성을 조사한 결과 하우스에서 재배한 것이 종경과 횡경에서 모두 우세하였으나 당도에 있어서는 노지에서 재배한 것이 14.9 °Brix로 노지의 14.4 °Brix보다 높았다. 산도의 경우 하우스 재배가 낮았으며, 경도는 동일하였다(Table 5). 과실의 발육단계별 당도의 변화를 보면 노지재배가 하우스 재배보다 높게 나타났으며 산도와 경도 또한 같은 양상이었다(Fig. 30, 31, 32).

Table 5. Comparison of the characteristic of fruit according to culture system in 'Hayward' kiwifruit.

Culture system	Length (mm)	Width (mm)	Fresh weight(g)	Soluble solids (°Brix)	Citric acid (% FW)	Firmness (kgf)
House	61.2 ± 5.90 ^Z	47.1 ± 2.32	79.8 ± 8.31	14.2 ± 0.34	0.6 ± 0.10	0.02 ± 0.01
Field	60.8 ± 2.10	48.7 ± 8.04	76.2 ± 10.42	15.4 ± 2.63	0.7 ± 0.28	0.02 ± 0.01

^Z : standard error

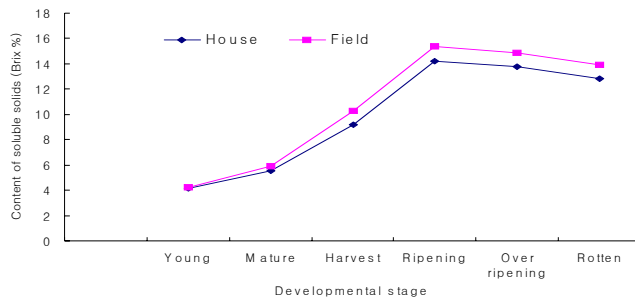


Fig. 30. Change of soluble solids during fruit development between different culture systems.

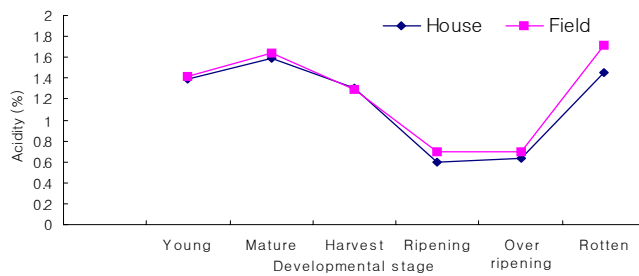


Fig. 31. Change of citric acid during fruit development between different culture systems.

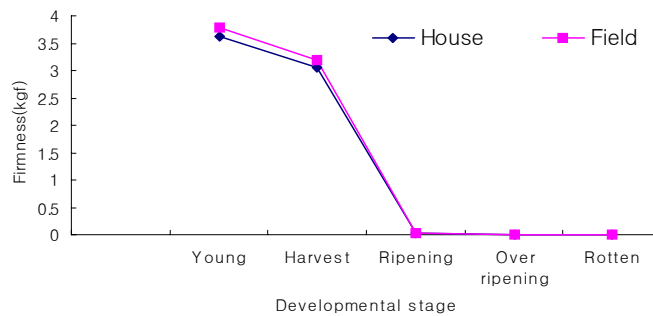


Fig. 32. Change of firmness during fruit development between different culture systems.

3) 재배환경에 따른 비타민 C와 lutein 및 β -carotene 함량 비교

재배환경에 따른 비타민 C와 lutein 및 β -carotene 함량을 조사하기 위하여 비가림 하우스와 노지에서 재배되고 있는 ‘헤이워드’ 품종의 과실을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 비타민 C는 하우스에서 40.74 mg/100g으로 노지에서의 44.34 mg/100보다 낮았다(Fig. 33). Lutein은 하우스 0.15 mg/100g, 노지 2.2 mg/100g으로 노지가 하우스보다 약 50% 정도 높게 나타났다. β -carotene은 하우스에서 0.10 mg/100g이었으나 노지에서는 0.19 mg/100g으로 하우스보다 두배 정도 높게 나타났다(Fig. 34). 한편 비타민 C와 lutein 및 β -carotene 함량에 있어서 노지가 하우스보다 높게 나타난 것은 온도와 습도 등 환경의 변화가 노지가 높아 이들 물질이 축적량이 많았던 것으로 사료되며 앞으로 이에 대한 세밀한 연구가 더 필요하다고 판단된다.

마. 형질전환 식물체의 생육특성과 비타민 분석

1) 형질전환 식물체의 포장 생육특성

Table 6. Growth characteristic of transformed plants by *Chx* gene and *Psy* gene in ‘Hayward’ kiwifruit.

Clone name	No. of leaf (ea)	Largest leaf		Second largest leaf		Length of stem (cm)	Width of stem (cm)	No. of branch (ea)
		Width (cm)	Length (cm)	Width (cm)	Length (cm)			
Control	8.3	20.9	16.2	19.6	14.4	105.3	6.9	0.7
1-C1-4(A)	6	25.0	17.0	17.9	11.6	35.6	7.8	1
1-C5-2	9	18.5	12.3	18.3	12.5	30.1	6.8	1
1-C14A	8	19.7	13.9	15.5	10.9	32.3	5.1	1
1-C15-3	6	23.2	17.3	26.4	19.3	68.0	8.7	1
CHX1.0 ⑥	5	21.7	13.5	19.6	14.4	21.0	5.5	1
2-CHX1.0-6-5-1	4	15.3	9.4	13.1	8.9	44.4	7.1	4
2-CHX1.0, 6-5-2	7	22.5	16.5	20.3	15.2	98.3	9.1	3
1-P14-2(B)	8	24.0	17.4	17.2	10.8	55.0	7.8	0
1-P15	10	22.1	16.8	24.7	17.2	130.0	6.2	0

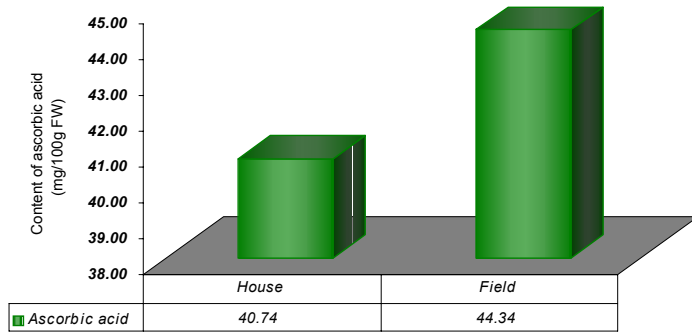


Fig. 33. Comparison of ascorbic acid content between different culture systems in 'Hayward' kiwifruit.

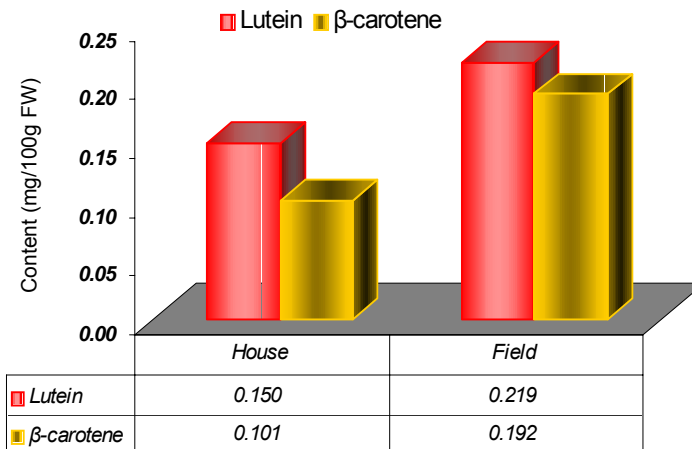


Fig. 34. Comparison of lutein and β -carotene content between different culture systems in 'Hayward' kiwifruit.

Psy gene과 *Chx* gene을 이용하여 형질전환을 실시한 후 PCR로 형질전환이 확인된 식물체 9개체를 GMO 온실에서 재배를 하면서 생육특성을 조사하였다 (Table 6).

대조구의 경우 잎 수는 8.3개를 나타냈으며 대조구보다 잎 수가 같거나 많은 것은 1-C5-2 등 4개의 clone이었다. 최대 엽장과 제 2엽장에 있어서는 7개체가 높게 나타났으며, 엽폭에 있어서는 같은 경향이었다. 줄기 길이는 1-P15에서 130 cm로 가장 길었으나 나머지 개체들에서는 대조구 105.3 cm보다 짧았으며, 특히 대부분이 30~45 cm 사이로 짧게 나타나 앞으로 더 많은 검토가 필요하다고 사료되었다. 경경은 모든 개체에서 대조구와 유사하였고 측지수는 *Chx* gene으로 형질전환이 된 2-*Chx* 1.0-6-5-1과 2-*Chx* 1.0-6-5-2를 제외하고는 유사한 경향이 있었다.

2) 형질전환 식물체의 비타민 A 관련 대사물질 분석

Table 7. Content of lutein and β -carotene in the leaf of transformed plants.

Clone name	Lutein ^a (mg/g)	β -carotene (mg/g)
control	45.29	40.80
1-C1-4(A)	105.23	92.41
1-C5-2	124.85	104.54
1-C14A	114.93	71.80
1-C15-3	135.58	111.92
CHX1.0 ⑥	97.32	62.24
2-CHX1.0-6-5-1	105.99	73.70
2-CHX1.0, 6-5-2	154.70	90.27
1-P14-2(B)	82.66	74.16
1-P-15	101.55	73.85

a: Lutein과 Lutein like substance를 포함한 값임

참다래 형질전환체의 비타민 A 관련 대사물질 함량의 증가 여부를 확인하기 위하여 형질전환체 잎과 비형질전환체의 잎에서 lutein과 β -carotene 함량을 측정하였다. 루테인은 모든 형질전환 식물체에서 대조구보다 2배 이상의 높은 함량을 나타냈으며, 특히 *Chx* gene을 이용하여 형질전환한 식물체들이 *Psy* gene 형질전환체 보다 높았다. β -carotene 또한 대조구가 40.80mg/100g으로 가장 낮았으며, 1-C5-2와 1-C15-3 clone에서 104.54 및 111.92mg/100g으로 높게 나타났다. lutein과 β -carotene 함량을 전체적으로 볼 때 *Chx* gene 형질전환체에서는 1-C15-3이 lutein 135.58 mg/100g, β -carotene 111.92mg/100g으로 가장 양호하였다. *Psy* gene 형질전환체에서는 1-P-15가 lutein 101.55mg/100g, β -carotene 73.85mg/100g으로 가장 양호하였다(Table 7).

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표 달성도

1. 형질전환 비타민 A 및 C 강화 참다래 개발

1차 년도에 아그로박테리움을 이용한 고효율 형질전환 기술을 개발코자 재분화 최적 식물생장조절제 농도, Km 선발 적정농도, 공동배양 기간, AS 적정농도, 균 배양 및 접종 적정농도를 구명하였다. 형질전환으로부터 재분화 개체의 증식과 2차선발, PCR 확인 등에 의한 소요기간이 길어 2차 년도까지 분석이 이루어졌다.

또한 2차 년도에는 비타민 합성관련 유전자 전환체 대량생산을 위하여 감귤에서 클로닝된 PSY 및 CHX 유전자 형질전환체 양성에 주력하였다. 3차 년도에 PCR 분석 결과로 확인한 최종 형질전환체는 PSY 유전자 전환체 61개체, CHX 유전자 전환체 64개체, 총 125개체를 확보하였다. 또한 이들 형질전환체의 발근을 유도하고 순화과정을 거쳐 성공적으로 포ット 육묘하였다.

3차 년도에 PSY 22개체, CHX 30개체, 총 52개체들을 포ット 육묘하였다. 이중 9개체는 난지농업연구소의 GMO 온실에 재식되어 전이유전자 발현분석을 위한 연구단체를 거치고 있다. 일부는 서어던 분석을 수행하여 목적 유전자의 안정적 전이 여부를 확인하기 시작하였다. 서어던 분석에는 높은 순도의 많은 량의 DNA가 필요한데, 계절적으로 식물체들이 낙엽 및 휴면 단계로 진입하여 서어던 분석 및 노오던 분석에 의한 형질전환체 확인 및 발현분석 작업이 지연되고 있는 실정이나, 충분한 형질전환체를 획득하였다고 판단된다. 전이 유전자의 RNA 발현분석을 통한 우량계통의 선발에 앞서 성분분석을 통한 카로티노이드 및 루테인 등의 비타민 계열의 성분 증진 계통의 선발을 시도하여 1차적으로 2배 이상의 높은 계통들을 확인할 수 있었다.

항생제 선발 대체기술을 개발하기 위한 sorbitol-sucrose 적정 농도를 설정하여 형질전환체 선발을 시도하였으나, 형질전환체 획득에는 성공하지 못하였다.

2. 참다래의 비타민 A 및 C 합성관련 유용 유전자 개발

당초 계획하였던 숫자에 비해 적은 카로티노이드 생합성 및 비타민 C 생합성 유전자를 분리하였다. 비타민 C 생합성 관련 유전자의 경우에는 2종류(GMPP 및 GDH)의 유전자를 분리하여 형질전환용 벡터를 제작하였다. 그 반면에 카로티노이드 생합성 관련 유전자는 2개의 단편을 분리하였고, 이를 이용하여 형질전환용 벡터를 제작 중에 있다. 카로티노이드 관련 문헌정보 검색을 통해 토마토 등의 경우를 살펴볼 때, 자신의 유전자를 자신의 식물체에 도입하여 유전자의 발현을 유도한 경우, 예상과는 달리 유전자의 발현이 억제되는 경우(PTGS 현상)가 발생하는

것을 볼 수 있었다. 이를 극복하기 위해 기확보하고 있던 감귤로부터 분리한 Psy 및 Chx, GGPS 유전자를 사용하여 식물형질전환용 벡터를 제작하여 키위 형질전환에 사용하였다. 이러한 다양한 접근 방법을 통해 본 연구의 목적인 카로티노이드 및 비타민 C 함량이 높은 형질전환 키위품종이 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

3. 참다래 과실의 비타민 A 및 C 대사조절 구명

1차 년도에 참다래 주품종들의 생육특성에 대한 조사를 실시하고, 참다래에서 비타민 C와 carotenoid 분석에 대한 방법을 확립하였으며, ‘헤이워드’와 ‘해남’ 등 주품종들에 대한 비타민 C, lutein과 β -carotene에 대한 분석을 통하여 고품량 계통들을 선발하였다. 또한 발육단계에서부터 수확 후 저장기간 동안의 함량변화에 대한 분석을 실시하여 이들 비타민이 어떻게 축적되는지, 그리고 왜 후숙을 제대로 시켜야하는가를 성분학적으로 밝혔다. 이 연구는 참다래 수확시기가 10월말에서 11월초까지 실시되기 때문에 2년차까지 계속 분석하여 얻어진 결과이다.

2차 년도에는 1차 년도에서 수확된 과실에 대한 분석과 함께 재배환경에 따른 참다래 재배지내 온도와 토양수분 등에 대한 조사를 실시하였으며, ‘헤이워드’ 품종을 대상으로 하여 재배환경에 따른 비타민 함량의 변화 양상을 분석하였다. 생육 상황은 비가림 하우스가 노지재배보다 좋으나, 비타민 함량은 노지재배가 약간 높음을 밝혔으며 이는 3차 년도까지 계속 수행된 결과이다.

3차 년도에는 2차 년도에서 수확된 과실에 대한 분석과 함께 비타민 A관련 대사물질의 합성과 관련된 유전자가 삽입된 참다래 형질전환체의 GMO 온실로의 육묘 시 생육특성과 비타민 함량분석을 실시하였다. 참다래 형질전환체 10개체를 대상으로 생육특성을 조사한 결과 비형질전환체보다 생육상황이 좋고, 또한 lutein과 β -carotene 함량이 높은 클론들을 다수 확인하였다.

제 2 절 관련분야에의 기여도

국내 작물별 형질전환 기술개발은 2가지 이용 측면이 있다. 하나는 교배육종을 대체 도는 보완할 우량 GMO 계통의 개발이고, 다른 하나는 특정 작물에서의 유용 유전자 개발을 촉진하는 것이다. 작물 GMO 개발의 경우, 특이적인 발현조절 프로모터의 이용이 필수적이고, 식용으로 이용하는 경우는 항생제 대체 기술이 필수적으로 요구되고 있어, 아직은 시기적으로 성숙한 단계에 이르지 못하고 있다. 그러나, 세계적으로 이 분야에 대한 투자가 지속적으로 이루어지고 있고 가까운 장래에

해결될 것으로 보아진다. 그러므로 미리 이에 대한 기술확보 차원에서 GMO 개발 기술이 우선적으로 필요하다고 하겠다.

본 연구결과 참다래의 형질전환체를 대량 양성할 수 있는 시스템이 확보되게 되었고, 순화 및 육묘가 정상적으로 수행할 수 있어, 향후 유용 유전자 및 특이발현 프로모터 개발 등의 완료되는 시점에 언제든지 GMO 작물 개발에 뛰어 들 수는 준비를 마쳤다고 볼 수 있다. 앞으로 참다래의 유용 유전자 개발은 물론 타작물의 유용 유전자의 기능분석 및 유전자 개발에도 활용할 수 있을 것으로 기대되어, 유용 유전자 개발을 촉진할 것으로 판단되어진다. 특히, 과수의 형질전환은 매우 어려운 기술로 인식되고 있는 가운데, 국내에서는 사과에 이어 참다래가 두 번째 형질전환 기술이 개발된 작물로 자리매김하게 되었다.

참다래는 사과 등의 장미과 과수와는 광합성 최종산물과 전류 특성이 다르고, 또한 식용부위의 기원이 다르며, firmness 및 연화 등 과실의 특성에 차이가 많아 유전자 상호보완 이용가치가 매우 높다. 본 연구결과 참다래의 잎과 과실로부터 cDNA library가 제작되어 비타민 A 및 C 관련 유전자 개발은 물론 다양한 유용 유전자를 개발할 수 있는 기반을 갖추게 되었다. 그러므로 사과와 참다래 간에는 기 확보된 형질전환기술과 유전자 공유를 통한 대사조절 연구 및 기능성 품종개발을 활발히 수행할 수 있을 것으로 보아진다. 또한 본 연구결과에서 경험한 다당류, 폴리페놀류 등의 다량 함유되어 RNA 순도의 불충분성에 기인하여 유전자 개발이 어려운 작물에서의 효율적인 RNA 추출법 확보는 배 등 유사한 과수를 비롯한 원예작물에 적용하여 분자생물학 및 생명공학 연구를 수행하는데 많은 도움을 줄 수 있을 것이다.

본 연구 결과 참다래 주요품종들에 특성분석과 비타민 분석법 확립은 앞으로 참다래 육종에 중요한 자료로서 이용될 수 있을 것이다. 또한 최근 친환경 농업의 중요성이 부각됨에 따라, 이들 재배법에 따른 기능성 성분의 분석을 통한 농민지도 및 친환경 농산물과 국내 농산물의 마케팅에도 충분히 기초자료를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

과수에서는 처음으로 기능성 유전자를 전환한 형질전환체의 확보가 이루어졌고, 온실에서의 포장발현 분석을 수행하게 되었다. 금후 이들 계통들은 기능성 참다래 개발에 유용하게 이용될 것이라 판단된다. 그러나 연구기간이 짧아 참다래 과실로의 비타민 축적기작에 대한 보다 세밀한 연구가 이루어지지 못하였는데 앞으로 이 분야에 대한 생리생화학적인 연구가 병행되었으면 하는 바람이다. 한편 형질전환체에서 착과를 유도하여 과실내의 비타민 함량을 확인하지는 못하였으나 이는 참다래 품종 육성을 담당하는 기관이기 때문에 충분히 가능할 것으로 사료된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 개발기술의 활용계획

본 연구결과 양성된 형질전환체는 난지농업연구소의 GMO 온실에서 육묘할 예정이다. 발현분석 후 고비타민 계통들은 신품종 개발의 교배친으로 활용할 계획으로 있다.

참다래에서 개발한 유전자들은 국내 과수 또는 원예작물의 형질전환 작물개발 및 비타민 대사조절 연구진과의 공유를 통한 대사조절 연구 및 고비타민 형질전환 작물개발에 활용토록 할 것이다.

형질전환 기술은 참다래는 물론 사과, 감귤 등 타작물로부터의 크로닝한 유전자의 기능탐색 및 기능이 알려진 유전자들의 효과를 분석하는 시스템으로 활용할 계획이다.

본 연구에서 확립된 비타민 C와 carotenoid 분석 방법은 앞으로 참다래 교배육종 및 기능성 형질전환 분야에서 활용 가치가 클 것으로 판단된다. 주요 품종별과 과실의 특성과 비타민 함량에 대한 분석 결과는 기능성 참다래의 조기 육종에 기여할 것이다. 또한 생육환경에 따른 식물체의 생육특성과 비타민 함량에 대한 분석은 참다래 재배농가에 좋은 자료가 될 수 있을 것이다.

제 2 절 추가연구의 필요성

본 연구결과 형질전환체의 발현분석이 충분치 못하여, 이에 대한 추가적인 연구가 필요한 것으로 생각된다. 특히 과실의 비타민 증진을 목표로 하고 있으므로 형질전환체 온실육묘 및 개화촉진, 과실내 성분 분석 등의 지속적인 연구가 5년 이상 필요한 실정이다.

또한 항생제 선발대체 시스템 개발은 가능성이 매우 높음에도 불구하고 연구가 충분치 못하여 결실을 얻어내지 못하였다. 그러므로 이에 대해서도 지속적인 지원과 연구가 필요할 것으로 생각된다. 식용 대상의 GMO는 비항생제 선발표지 이용 또는 교배를 통한 항생제 유전자의 제거를 시도해야 하는데, 과수에서의 교배 및 항생제 선발표지 제거는 거의 실효성이 없기 때문에 항생제 선발대체 기술의 개발은 절실하다 하겠다.

본 연구에서 참다래 유전자 개발이 지연되어 이들 유전자의 식물발현벡터 제작에도 불구하고 형질전환에 이용하지 못하였다. 지속적으로 형질전환체 확보는 본 연구진에서 수행할 예정이나, 발현분석 등의 연구에는 지원방안이 강구되어야 할 것으로

보아진다.

그 외에도 비타민 대사에 관여하는 유전자의 식물체내 발현분석과 성분분석의 비교분석을 통한 대사조절 구멍이 충분히 이루어지지 못하였다. 추후 대사관련 효소활성 분석 및 관련 유전자의 시기별, 기관별 발현분석이 병행되어 참다래 식물에서의 비타민 대사조절이 명확히 구명됨은 물론 이들 정보의 타 작물에서의 활용도를 높이기 위해서도 지원방안이 필요하다고 보아진다. 특히 소비자들의 건강 기능성에 대한 관심도가 증대되면서 과수 등의 신품종 개발에서는 향후 항산화 기능 및 비타민 함량 증진이 반드시 고려되어야 할 것이므로 비타민 대사조절 구멍의 중요성이 매우 높다고 하겠다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

연구기간 중 참다래 형질전환 연구 및 비타민 C와 비타민A 대사관련 물질에 대한 논문을 50여편 수집하였으며, 이는 앞으로 이 분야의 연구에 중요한 기초자료로 이용 가능할 것으로 판단된다. 특히 연구기간 동안 참다래 생명공학 연구의 메카인 뉴질랜드 원예연구소를 방문하여 연구진과의 네트워킹을 구축하였다. 또한 참다래의 기원지로 알려져 있는 중국의 정주 과수연구소와 무한식물원을 방문하여 그곳에서 중국의 자생다래나무 수집과 보존 및 육종체계에 대한 정보를 교환하였다.

뉴질랜드의 참다래 신품종 육종 및 유전자원 관리정보를 분석하였다. 신품종 육종의 주요 목표는 고당도, 고향기, 대과이며 주요 육종기술은 교배육종 및 배수체 육종에 중점을 두고 있었다. 연구기관간 역할분담이 잘 이루어지고 있었다. 교배육종은 주로 Te Puke 원예연구소에서 수행하고 있는데, 다래에 대한 품종육성 관심이 매우 지대하며 이미 중간모본을 육성하여 세대를 진척시키고 있는 단계에 있었다. 유전자원 관리는 안전보존을 위하여 육종담당인 Te Puke과 Kerikeri에서 이중으로 보유 관리하고 있으며 지역 차에 따른 특성발현을 평가하고 있다. 현재 60여 종 1500 계통 이상의 유전자원을 보유하고 있다. 유전자원 포장 규모는 20ha 이상의 보존포장을 가지고 있으며 2주씩 식재하여 관리하고 있다.

외국의 유전자원 수집은 중국에서 주로 이루어지고 있다. 중국과의 국제공동연구 형태로 현지 유전자원 분포 및 특성조사를 병행하여 야생의 다양한 유전자원을 수집하고 있었다.

참다래 생명공학 연구는 Mt. Albert에서 수행하고 있는데, 사과 유전체 연구 경험

을 이용하여 참다래 유전체 연구로 발전시키고 있었다. 유전자 개발 면에서는 BAC library를 보유하고 있으며 EST의 microarray를 통한 발현분석 및 유용 유전자 탐색을 수행하고 있다. 유전자 지도 작성은 200개 이상의 마커를 가진 유전자 지도를 작성하였으며 QTL 분석까지 접근하고 있는 실정이다. 참다래 EST를 담배와 애기장대에서 형질전환으로 유전자 발현조절을 연구 중에 있으며, 참다래 형질전환은 매우 제한적으로 수행하고 있었다. 이는 GMO 관리규정이 매우 엄격하고 발현분석에 소요되는 기간이 길기 때문에 모델 식물체에서 검정된 유용 유전자를 대상으로 참다래 형질전환을 수행하고 있는 것이며, 유묘 상태에서 발현분석이 가능한 유전자를 우선적으로 연구하고 있는 것이다.

생명공학 기술 분야는 교배육종을 지원하는 체제로 구성되어 있으며, 교배육종의 핵심 목표인 고당도, 고향기, 고비타민, 대과 등에 대한 유전정보를 구명하는 데 주안점을 두고 있다. 특히, 다래속 식물의 꽃 향기 성분을 산업화에 이용하는 연구가 매우 활발하게 수행되고 있다.

제 7 장 참고문헌

- André, E. 1898. *Actinidia Kolomikta*. *Revue Horticole* 70:36-37.
- Atkinson, R.G. and R.C. Gardner. 1993. A polygalacturonase gene from Kiwifruit. *Plant Physiol.* 103(2):669-670.
- Atkinson, R.G., C.J. Candy, and R.C. Gardner. 1990. Agrobacterium infection of five New Zealand fruit crops. *N. Z. J. Crop Hort. Sci.* 18:153-156.
- Bibikaw, Y.A., I.I. Chakalinskaya, and I.P. Dudzinskaya. 1969. The accumulation of ascorbic acid in fruit and leaves of some species of vines. *Vestsi Akademii Navuk Belaruskai SSR, Serya Bialogichnykh Navuk.* 2:37-41.
- Cano, M.P. 1991. HPLC separation of chlorophyll and carotenoid pigments of four kiwi fruit cultivars. *J. Agric. food Chem.* 39:1786-1791.
- Chang, Q.Q. 1982. The Actinidias in Fujian. *Wuyi Sci. Journal* 2: 25-35.
- Chat, J., L. Chalak, and R.J. Petit. 1999. Strict paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in intraspecific crosses of kiwifruit. *Theor. Appl. Genet.* 99: 314-322.
- Conklin, PL et al. 1999. Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant

- ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. USA* 96:4198–4203.
- Collins, A.R. and V. Harrington. 2002. Antioxidants; not the only reason to eat fruit and vegetables. *Phytochem. Rev.* 1:167–174.
- Gross, J. 1982, Pigment changes in the pericarp of Chinese gooseberry of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) cv. Bruno during ripening. *Gartenbauwissenschaft* 47:162–167,
- Cui Z.X. 1993. *Actinidia* in China. Shandong Scientific Press, Jinan, Shandong.
- Darrow, G.M. 1975. Minor temperate fruits. In: *Advances in Fruit breeding* (Janick, J. and J.N. Moor, eds.). Purdue University Press, West Lafayette, Indiana. pp. 269–284.
- Dunn, S.T. 1911. A revision of the genus *Actinidia*, Lindl. *J. Linn. Soc. Lond. Bot.* 38:350–373.
- Endo, S., T. Kasahara, K. Sugita, E. Masunaga, and H. Ebinuma. 2001.
- Ferguson, A.R. 1984. Kiwifruit: a botanical review. *Hort. Rev.* 6: 1–64.
- Ferguson, A.R. 1999. The 4th international symposium on kiwifruit—an overview. *Acta Hort.* 498: 17–22.
- Ferguson, A.R. and M.A. McNeilage. 1999. *Actinidia* Germplasm for Kiwifruit Breeding. *Acta Hort.* 498:37–42.
- Ferguson, A.R., A.G. Seal and R.M. Davison. 1990. Cultivar improvement, genetics and breeding of kiwifruit. *Acta Hort.* 282:335–347.
- Ferguson, A.R. and E.G. Bollard. 1990. Domestication of the kiwifruit. In: *Kiwifruit: science and management* (Warrington, I.J. and G.C. Weston, eds.), Ray Richards Publisher in association with the New Zealand Soc. *Hort. Sci.*, Auckland. pp. 165–246.
- Ferguson, A.R., A.G. Seal, M.A. McNeilage, L.G. Fraser, C.F. Harvey, and R.A. Beatson. 1996. Kiwifruit. In: *Fruit breeding. Vol. 2. Vine and small fruit sp.* (J. Janick and J.N. Moore, eds.). Wiley, New York. pp. 371–417.
- Fraser, LG et al. 1997. Molecular investigation into dioecy in *Actinidia chinensis*. *Acta Hort.* 444:79–83.
- Fraser, P.D. and P.M. Bramley. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Res.* 43:228–265.
- Fraser, P.D., J. Kent, and C.F. Harvey. 1995. Transformation studies of *Actinidia chinensis* Planch. *N. Z. J. Crop Hort. Sci.* 23:407–413.
- Frédérique, O.S., J.M. Legave, M.F. Nicole, and A.M. Hirsch. 1994. Use of flow

- cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus *Actinidia*. *Scientia Hort.* 57: 303–313.
- Fuke, Y., K. Sasago, and H. Matsuoka. 1985. Determination of chlorophylls in kiwifruit and their changes during ripening. *J. Food Sci.* 50:1220–1223.
- Fung, R., B.J. Jansen, B.A. Morris, and R.C. Gardner. 1998. Expression and inheritance of transgenic in kiwifruit. *N. Z. J. Crop Hort. Sci.* 26:169–179.
- Gill, G.P., C.F. Harvey, R.C. Gardner, and L.G. Fraser. 1998. Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia*. *Theor. Appl. Genet.* 97: 439–445.
- Giuliano, G., G.E. Bartley, and P.A. Scolnik. 1993. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *The Plant Cell* 5:379–387.
- Gui, Y.L., S.K. Mu, and T.Y. Xu. 1982. Studies on morphological differentiation of endosperm plantlets of Chinese gooseberry *in vitro*. *Acta Bota. Sinica* 24:216–221.
- Hao, R. 1982. Gerplasm resources of wild fruits in the Chang Bai Shan mountain region. *Acta Hort. Sinica* 9:9–16.
- Harvey, C.F., G.P. Gill, L.G. Fraser, and M.A. McNeilage . 1997. Sex determination in *Actinidia*. 1. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*. *Sex plant Reprod.* 10:149–154.
- Hirsch, A.M., D. Fortune, and P. Blanchet. 1990. Study of dioecism in Kiwifruit, *Actinidia deliciosa* Chevalier. *Acta Hort.* 282:367–376.
- Hirsch, A.M., R. Testolin, S. Brown, J. Chat, D. Fortune, J.M. Bureau and D.D. Nay. 2001. Embryo rescue from interspecific crosses in the genus *Actinidia*(kiwifruit). *Plant cell Rep.* 20(6): 508–516.
- Hirschberg, J. 1999. Production of high-value compounds: carotenoids and vitamin E. *Current Option in Biotechnology* 10:186–191.
- Huang, H., J. Li, P. Lang, and S. Wang. 1999. Systemetic relationship in *Actinidia* as revealed by cluster analysis of digitized Morphological descriptors. *Acta Hort.* 498: 71~78
- Huang, Z.F., M.Y. Liang, C.G. Huang, and R.G. Li. 1983. A preliminary study on the character and nutritive composition of *Actinidia* fruits. *Guihaia* 3:53–56.
- Janssen, B.J. and R.C. Gardner. 1993. The use of transient GUS expression to develop an Agrobacterium-mediated gene transfer system for kiwifruit. *Plant Cell Rep.* 13:28–31.

- Kim I-J., K-C Ko, C-S. Kim, W-I. Chung. 2001. Isolation and expression patterns of a cDNA encoding phytoene synthase in *Citrus*. *Journal of Plant Physiology* 158(6): 795-800.
- Kim I-J., K-C. Ko, C-S. Kim, W-I. Chung. 2001. Isolation and characterization of cDNAs encoding β -carotene hydroxylase in *Citrus*. *Plant Science* 161(5): 1005-1010.
- Kim, J.Y., M. Jung, H.S. Kim, Y.H. Lee, S.H. Choi, Y.P. Lim, B.W. Min, S.G. Yang, and C.H. Harn. 2002. A new selection system for pepper regeneration by mannose. *J. Plant Biotech.* 4:129-134.
- Kim S.C., Y.H. Jung, M. Kim, C.H. Kim, S.C. Koh and S.H. Kang. 2003. Genetic relationships of Genus *Actinidia* based on random amplified polymorphic DNA analysis. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 44: 340-344.
- Kim S.C., Y.H. Jung, M. Kim, S.C. Koh, K.J. Song and H.B. Kim. 2004. Characterization of a RAPD fragment unique to species with hairy fruit skin in the genus *Actinidia*. *J. Plant Biol.* 47: 210-215.
- Kobayashi, S., C.K. Ding, Y. Nakamura, I. Nakajima, and R. Matsumoto. 2000. Kiwifruits (*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid (resveratol-glucoside). *Plant Cell Rep.* 19:904-910.
- Kosman T.A., N.M. Tarlin, F.A. Loewus, V.R. Franceschi. 2001. Biosynthesis of l-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of l-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts. *Plant Physiol.* 125, 634-640.
- Kusava, S., Y. KanopMurakami, M. Matsumoto, N. Matsuta, T. Sakamoto, and M. Fukumoto. 1999. Expression of the rice homeobox gene, OSH1, causes morphological changes in transgenic kiwifruit. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 68:482-486.
- Kvestitadze, G.I., A.G. Kalandiya, S.G. Papunidze, and M.R. Vanidze. 2001. Identification and quantification of ascorbic acid in kiwifruit by high-performance liquid chromatography. *Appl. Biochem. Microbiol.* 37:215-218.
- Li, H.L. 1952. A taxonomic review of the genus *Actinidia*. *J. Arnold Arbor.* 33:1-6.
- Liang, C.F. 1982a. An addition to the infraspecific taxa of *Actinidia chinensis* Planch. *Acta Phytotaxonomica Sinica* 20:101-104.

- Liang, C.F. 1982b. New taxa of the genus *Actinidia* Lindl. *Guhaia* 2:1-6.
- Liang, C. F. 1983. ON the distribution of *Actinidias*. *Guhaia* 2: 1-6.
- Liang, C.F. 1984. *Actinidia*. In: Flora reipublicae popularis sinicae. Vol. 49(2). (Feng, K.M., ed.). Beijing Science press, Beijing. pp. 196-268.
- Loewus, F.A. 1999. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochem.* 52:193-210.
- Marsh, K., S. Attanayake, S. Walker, A. Gunson, H. Boldingh, and E. MacRae. 2004. Acidity and taste in kiwifruit. *Postharvest Bio. Tech.* 32:159-168.
- Masuda, R., A. Hayakawa, N. Kakiuchi, and M. Iwamoto. 1988. HPLC determination of total ascorbic acid in fruits and vegetables. *Rep. Natl. Food Res. Inst.* 52:30-35.
- Matsuta, N., H. Iketani, T. Hayashi. 1990. Effect of acetosyringone on kiwifruit transformation. *Jpn. J. Breed.* 40:184-185.
- McGhie F.K., G.D. Ainge. 2002. Color in fruit of the Genus *Actinidia*: carotenoid and chlorophyll compositions. *J. Agric. Food Chem.* 50:117-121.
- McNeilage, M.A. 1991. Sex expression in fruiting male vines of kiwifruit. *Sex Plant Reprod.* 4:274-278.
- Messina, R., R. Testolin, and M. Morgante. 1991. Isozymes for cultivar identification in kiwifruit. *Acta Hort.* 297:63-69.
- Mii, M., H. Ohashi. 1988. Plantlet regeneration from protoplasts of kiwifruit, *Actinidia chinensis* Planch. *Acta Hortic.* 230:167-170.
- Mu, X.J., D.R. Tsai, H.X. An, and W.L. Wang. 1992. Embryology and embryo rescue of interspecific hybrids in *Actinidia*. *Acta Hortic.* 297:93-97.
- Nakamura, Y., H. Sawada, S. Kobayashi, I. Nakajima, and M. Yoshikawa. 1999. Expression of soybean β -1,3-endoglucanase cDNA and effect on disease tolerance in kiwifruit plants. *Plant Cell Rep.* 18:527-532.
- Negrotto, D., M. Jolley, S. Beer, A.R. Wenck, and G. Hansen. 2000. The use of phosphomannose-isomerase as a selection marker to recover transgenic maize (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep.* 19:798-803.
- Oliveira, M.M., J. Barroso, and M.S. Pais. 1991. Direct gene transfer into kiwifruit protoplast: analysis of transient expression of the CAT gene using TLC autoradiography and a GC-MS based method. *Plant Mol Biol.* 17:235-242.
- Oliveira, M.M. and M.H. Raquel. 2002. Genetic transformation of kiwifruit

- (*Actinidia* species). p. 407-420. In: Khachatourians, G.G., R. Scorza, W-K. Nip, and Y.H. Hui (eds.). Transgenic plants and crops. Marcel Dekker, Inc.
- Oliveira, M.M. and M.S.S. Pais. 1991. Plant regeneration from protoplasts of long-term callus cultures of *Actinidia deliciosa* var '*deliciosa*' cv 'Hayward'(Kiwifruit). *Plant Cell Rep.* 9:643-646.
- Okie, W.R. and J.H. Weinberger. 1996. Kiwifruit. In: Fruit breeding: vine and small fruit (Janick, J. and N. Moore, eds.). John Wiley & Sons, Inc., New York. pp. 371-417.
- P'ei, C. and Y.W. Law. 1948. Notes on *Actinidia* of Szechuan and Sikang. *Bot. Bul. Acad. Sin.* 2: 25-33
- Pogson, G, K.A. McDonald, A. Truong, G. Britton, and D. DellaPenna. 1996. Arabidopsis carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. *Plant Cell.* 8:1627-1639.
- Raquel, M.H. and M.M. Oliveira. 1996. Kiwifruit leaf protoplasts competent for plant regeneration and direct DNA transfer. *Plant Sci.* 121:107-114. 1996.
- Rietjens, I.M.C.M., M.G. Boersma, L. de Haan, B. Spenkelink, H.M. Awad, N.H.P. Cnubben. J.J. van Zanden, H. van der Woude, G.M. Alink, and J.H. Koeman. 2002. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 11:321-333.
- Rizzolo A., E. Formi, and A. Polesello. 1984. HPLC assay of ascorbic acid in fresh and processed fruit and vegetables. *Food Chem.* 14:189-199.
- Rizzolo, A. and A. Polesello. 1992. Chromatographic determination of vitamins in foods. *J. Chromatogr.* 624:103-152.
- Rodrigo, M.J., J.F. Marcos, and L. Zacarias. 2004. biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of Orange (*Citrus sinensis* L.) during fruit development and maturation. *J. Agric. Food Chem.* 52:6724-6731.
- Sambrook J. and D.W. Russell. 2000. Molecular cloning: A Laboratory Manual (3rd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Schröder, R., R.G. Atkinson, G. Langenkämper, and R.J. Redgwell. 1998. Biochemical and molecular characterisation of xyloglucan endotransglycosylase from ripe kiwifruit. *Planta* 204:242-251.
- Seong, E.S., J-E. Cha, S-W. Park, C-Y. Yu, and K.J. Song. 2003. The effect of

- Agrobacterium density on transformation efficiency in apple. *Kor. J. Plant Biotech.* 30:215-219.
- Shaw, P.E. and C.W. Willson III. 1982. Ascorbic acid content of some tropical fruit products determined by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 30:394-396.
- Shim, K.K., Y.M. Ha, D.H. Son, and K.H. Chung. 1998a. RAPD variation in *Actinidia chinensis* clones collected from mountainous regions of China. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 39(4):460-463.
- Shim, K.K., Y.M. Ha, D.H. Son, and K.H. Chung. 1998b. Comparison of Morphological characteristics of leaf, stem, flower, and fruit between *Actinidia chinensis* and *A. deliciosa*. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 39(5):537-541.
- Song, K.J., S.W. Park, S.Y. Ahn, J.H. Hwang, and Y.U. Shin. 2001. Effect of Agrobacterium incubation conditions on gene transfer efficiency from 'Gala' and 'McIntosh Wijcik' apple. *Acta Hort.* 560:211-214.
- Tabata K, K. Oba, K. Suzuki, and M. Esaka. 2001. Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for l-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Plant J.* 27(2), 139-148
- Testolin, R., G. Cipriani, and G. Costa. 1997. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in the genus *Actinidia*. *Theor. Appl. Genet.* 94:897-903.
- Uematsu, C., M. Murase, H. Ichikawa, J. Imamura. 1991. Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of kiwifruit. *Plant Cell Rep.* 10:286-290. 1991.
- Warrington, I.J. and G.C. Weston. 1990. *Kiwifruit science and management*. Ray Richards Publisher, Palmerston North. pp. 21-31
- Watanabe, K. and B. Takahashi. 1999. Chlorophylls and carotenoid pigments in green- and yellow fleshed kiwifruit during fruit development and storage. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 68:1038-1043.
- Wheeler, G.L., M.A. Jones, and N. Smirnov. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393:365-368.
- Whittaker, D.J., G.S. Smith, and R.C. Gardner. 1997. Expression of ethylene biosynthetic genes in *Actinidia chinensis* fruit. *Plant Mol. Biol.* 34:45-55.
- Xiao, X.G., L.S. Zang, S.H. Li, B. Wang, R. Testolin, and G. Cipriani. 1999. First step in the search for AFLP markers linked to sex in *Actinidia*. *Acta Hort.*

- 498:99-104.
- Yamakawa, Y. and L-H. Chen. 1996. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) by direct formation of adventitious buds. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 64:741-747.
- Yan G.J., A.R. Ferguson, M.A. McNeilage. 1994. Ploidy races in *Actinidia chinensis*. *Euphytica* 78 : 175-183.
- Zhang, R.M. 1981. Selected varieties of kiwifruit. In: Mihoutaode Zaipei he Liyong(Qu, Z.Z., ed.). Beijing, Nongye Chubanshe. pp. 134-141.
- Zhixue, C., H.W. Huang and X.G. Xiao. 2002. *Actinidia* in China. China Agricultural Science and Technology Press. Beijing
- 崔政學. 1993. 中國猕猴桃. 山東科學技術出版社, 濟南
- 김영숙, 오성도. 1998. 참다래의 엽 및 엽병배양에 의한 식물체 재분화. 식물조직배양학회지 26(5):305-308.
- 이창복. 1982. 대한식물도감. 향문사, 서울. pp 541-542.
- 농림부. 1997. 참다래 조생종 신품종 육성기술 개발. 농림수산 특정연구사업 보고서.
- 渡辺慶一. 1992. 키위フルーツ의 増殖並びに 開花・結實に 關する 生理生態學的 研究. 博士學位論文. 日本大學. 日本