

31. 버즈풋 트레포일의 온도 및 시간별 처리에 의한 치사온도 결정

김기용[°] · 강경민 · 김맹중 · 임영철 · 정의수 · 이병현* · 손대영* · 윤대진* · 곽상수**
축산기술연구소, 경상대학교*, 한국생명공학연구원**

내열성 유전자로 형질전환된 버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.)이 고온조건에서 어느 정도 내성을 가지는지를 알기 위해서는 우선 형질전환되지 않은 버즈풋 트레포일의 치사온도가 결정되어 있어야 한다. 본 연구에서는 버즈풋 트레포일의 정확한 치사온도를 결정할 목적으로 버즈풋 트레포일 품종 중 “Au Dewey”을 시험재료로 하여 종자를 petri dish에서 발아시켜 작은 화분에 10개체씩 이식, 생장실에서 4주간 재배하였다. 1차 시험에서, 4주령의 버즈풋 트레포일 식물체를 재료로 하여, 온도조건을 45℃에서 65℃까지 5℃씩 차이를 두고 4처리, 시간조건을 5분에서 60분까지 5분 간격으로 12처리, 전체 48개의 각각 다른 처리조합에서 버즈풋 트레포일 식물체를 처리한 다음, 7일간 매일 동일한 시간대에 식물체의 생육조사를 실시하였다. 45℃, 50℃ 및 55℃에서 처리한 경우에는 60분간 처리했을 때에도 거의 식물체 손상이 없었다. 60℃에서 60분간 처리했을 때에는 잎이 약간 시든 듯한 현상이 있었으나 식물체의 손상은 거의 없는 상태였으며, 65℃에서 60분간 처리했을 때에도 60℃에서 처리한 결과와 마찬가지로 심한 손상은 받지 않았다. 45℃에서 65℃까지 48개의 처리조합으로 시험한 1차 시험에서 정확한 치사온도를 결정할 수 없었던 관계로, 온도를 높여 70℃와 80℃에서 5분 간격으로 60분까지 처리하는 2차 시험을 실시하였다. 2차 시험을 실시한 결과, 70℃에서 60분간 처리했을 때 버즈풋 트레포일은 일부에서 잎만 조금 마른 현상이 나타났다. 하지만 치사온도에는 도달하지 않았다. 80℃에서 처리한 결과에서는 처리 후 1일 이내에 60분 처리에서 거의 죽어가는 현상이 나타났으므로, 7일 정도까지 관찰하면 정확한 치사온도가 결정될 수 있을 것으로 판단된다. 결론적으로 버즈풋 트레포일의 치사온도는 80℃에서 60분 처리 이내에서 알팔파에 비해서는 짧은 시간대에서 결정될 것으로 추정된다.

Key words : 버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.), 고온내성, 치사온도, 생육조사

32. 이탈리아 라이그라스의 온도 및 시간별 처리에 의한 치사온도 결정

김기용[°] · 강경민 · 최기준 · 임용우 · 신재순 · 이병현* · 곽상수** · 박근제
축산기술연구소, 경상대학교*, 한국생명공학연구원**

내열성 유전자로 형질전환된 이탈리아 라이그라스 (*Lolium multiflorum* Lam.)가 고

온조건에서 어느 정도 내성을 가지는지를 알기 위해서는 우선 형질전환되지 않은 이탈리아 라이그라스의 치사온도가 결정되어 있어야 한다. 본 연구에서는 이탈리아 라이그라스의 정확한 치사온도를 결정할 목적으로 이탈리아 라이그라스 품종 중 국내 육성품종인 “화산 10호”(Hwasan 101)를 시험재료로 하여 종자를 petri dish에서 발아시켜 작은 화분에 10 개체씩 이식, 생장실에서 4주간 재배하였다. 1차 시험에서, 4주령의 이탈리아 라이그라스 식물체를 재료로 하여, 온도조건을 45℃에서 65℃까지 5℃씩 차이를 두고 4처리, 시간조건을 5분에서 60분까지 5분 간격으로 12처리, 전체 48개의 각각 다른 처리조합에서 이탈리아 라이그라스 식물체를 처리한 다음, 7일간 매일 동일한 시간대에 식물체의 생육조사를 실시하였다. 45℃, 50℃ 및 55℃에서 처리한 경우에는 60분간 처리했을 때에도 거의 식물체 손상이 없었다. 60℃에서 30분간 이상 처리했을 때에는 잎 끝이 마르고 약간 시들었으나 식물체의 손상은 약한 편이었으며, 65℃에서 처리한 결과에서도 60℃에서 처리했을 때보다는 좀 더 시들었지만 역시 심한 정도는 아니었다. 45℃에서 65℃까지 48개의 처리조합으로 시험한 1차 시험에서 정확한 치사온도를 결정할 수 없었던 관계로, 온도를 높여 70℃와 80℃에서 5분 간격으로 60분까지 처리하는 2차 시험을 실시하였다. 2차 시험을 실시한 결과, 70℃에서 30분간 처리했을 때에 이탈리아 라이그라스는 잎의 중간 정도까지 말랐으며, 60분간 처리했을 때에는 지상부의 잎이 거의 마른 상태였으나 죽는 정도는 아니었다. 80℃에서 처리한 결과에서는 처리 후 1일 이내에 50분 이상 처리에서 지상부의 잎이 완전히 마른 상태였으므로, 7일 정도까지 관찰하면 정확한 치사온도가 결정될 수 있을 것으로 판단된다. 결론적으로 이탈리아 라이그라스의 치사온도는 80℃에서 60분 처리 이내에서 밝혀질 것으로 추정되며, 현재 2일째 생육조사를 실시하고 있다.

Key words : 이탈리아 라이그라스 (*Lolium multiflorum* Lam.), 고온내성, 치사온도, 생육조사

33. *Escherichia coli*에서 배추 유래 Glutathione Reductase 유전자의 발현과 기능

허인경 · 이인애 · 윤호성 · 이효신** · 조진기 *

경북대학교, 임업연구원**

Glutathione reductase(GR, EC 1.6.4.2)는 모든 동, 식물에 폭 넓게 존재하며, 식물 세포 내에서 GR을 비롯한 항산화효소는 환경스트레스를 방지하는 주요한 요인으로

알려져 있다. 최근까지 보고된 식물 유래의 GR 유전자들은 엽록체에서의 광합성에 의해 야기된 활성산소의 해독을 위한 항상적 발현의 필요성에 기인하므로 그 발현이 외부의 스트레스에 의해 크게 영향을 받지 않는 것으로 밝혀졌다(Edwards 등, 1994). 따라서 본 연구실에서는 배추 유래의 cytosolic GR 유전자(*BrGR4*)를 대장균내에서 과발현시킴으로 항산화기능에 어떤 영향을 주는가에 대한 연구를 하였다. 먼저 배추의 GR 유전자를 도입하여 과발현시키고 이와 비교 연구하기 위하여 대장균 자체가 갖고 있는 GR 유전자도 sense(*EGR8-3*)와 antisense(*EGR1-9*) 방향으로 각각 도입하여 과발현 또는 발현 억제시킴으로 이들 형질변환체들이 hydrogen peroxide, paraquat, diquat, menadione과 plumabagin 등과 같은 다양한 환경적인 산화 스트레스에 의해 어떠한 영향을 받는가에 대하여 연구하였다. 다양한 환경스트레스 처리에 대한 흡광도 측정과 살아남는 생균수 측정방법으로 대장균 세포의 성장과 살아남는 능력의 비교에 의해 과발현시킨 *EGR8-3*과 *BrGR4*에서의 성장률이나 생장률이 야생형이나 발현 억제시킨 형질변환 대장균에서 보다 약 20% 정도 높은 차이를 보임으로 각종 산화 스트레스에 대한 강한 저항성을 보여주었다.

34. Glutamine Synthetase(GS)의 목초 형질전환

이인애 · 윤호성 · 강경민** · 김기용** · 조진기*

경북대학교, 축산기술연구소**

식물의 성장과 발육에 있어서 질소동화는 매우 중요한 메카니즘이다. 식물체내로 무기질소는 Glutamine synthetase(GS), Glutamate synthase(GOGAT), Glutamate dehydrogenase(GDH) 등의 효소에 의해서 glutamine, glutamate, aspartate, asparagine 등의 아미노산으로 동화되며 이들은 식물체내에서 질소운반체로서 역할을 수행하게 된다. 질소는 식물의 생산성, 생체조직특이성, 대사조절, 발육조절 등에 영향을 미치는데, 질소가 부족하면 광합성에 필요한 구성요소인 chlorophyll, rubisco 등의 수준이 감소하여 광합성량이 저하되고, carboxylation 효율도 떨어진다. 따라서 무기질소의 유기질소로의 동화는 식물체내에서 매우 중요하며 식물체가 질소를 이용하기 위해서는 크게 두 가지 경로가 있는데, 흙으로부터 흡수한 nitrate를 암모니아로 환원하는 과정과 그렇게 형성된 암모니아를 아미노산으로 동화하는 과정이다. 대부분의 식물체는 뿌리와 shoot 모두에서 nitrate 대사를 수행할 수 있지만, 그 수준은 뿌리로의 nitrate 공급량이나 식물의 종류와 나이 등의 여러 요인에 의해 좌우된다. 이에 관련된 효소로는 GS, GOGAT, GDH 등이 있고 이들에 의해 형성된 아미노산들은 세포내에서

중요한 질소공여자로 작용을 하게 된다. 본 연구에서는 질소동화관련효소들 중에서 특히 GS(EC 6.3.1.2)가 무기질소를 유기질소로의 동화에 있어서 제한요소일 것이라는 가정 하에 GS를 형질 전환에 이용하여 성장과 발육이 우수한 목초를 개발 중에 있다.

35. Proteomics 기법을 이용한 식물의 저온 스트레스 관련 조직 특이적인 단백질 분리동정

이동기 · 강규영 · 이증주* · 이병현

경상대학교 응용생명과학부, 농생물학과*

저온은 작물의 생존과 생산량의 감소에 직결되는 중요한 환경요인이므로 저온 장애를 극복할 수 있는 내재해성 작물의 분자육종을 위하여 저온 스트레스 특이적인 단백질의 proteome 분석을 실시하였다. 실험재료로는 이미 genome project이 끝나 data 분석이 용이한 벼 (*Oryza sativa* L. cv. Dongjinbyeo)를 이용하였다. 동진벼를 growth chamber에서 28℃로 20일간 생육시킨 뒤 10℃에서 5일 동안 저온처리한 후 조직부위별 proteome 분석을 실시하였다. 잎, 줄기 및 뿌리에서 total soluble protein을 분리하였으며, 분리한 단백질 중 잎조직은 15% PEG로 prefractionation 후 이차원 전기영동으로 분석하였다. 줄기와 뿌리는 total soluble protein으로 분석하였다. 저온처리 후 조직부위에서 특이적으로 증가 또는 감소하는 단백질은 MALDI-TOF mass spectrometry를 이용하여 동정하였다. 동정되어진 단백질들 중에서 저온 특이적인 증가를 보인 단백질에는 chloroplast Cu-Zn SOD, elongation factor-Tu, 및 Ran (Ran-related nuclear small GTP-binding protein) 등, 스트레스, 신호전달 및 아미노산 대사에 관련된 단백질들이 발견되었다. (본 연구는 한국과학재단 목적기초연구지원으로 수행되었음)

36. Glutathione 벼의 생산을 위한 vector의 구축

이승민° · 이인애 · 윤호성 · 김혜기 · 조진기

경북대학교 동물공학과

Glutathione은 노화를 억제하고 백혈구를 증식시켜 병에 잘 걸리지 않게 하며 퇴행적 신경질환의 발병을 막는 등의 중요한 기능을 한다. 본 실험은 glutathione을 과

량 합성하는 벼 품종을 개발하기 위한 실험이다. 이를 위해 종자 특이적으로 glutathione을 생산하는 식물 형질 전환용 vector를 구축하는 실험이다.

GeneBank로부터 찾아낸 벼 genomic glutelin 유전자는 종자에서만 특이적으로 발현하는 GluB-1 이었으며 이 유전자의 의 총 길이는 3373 염기쌍으로 되어 있었다. 이를 벼의 genomic DNA를 이용하여 sense 및 antisense primer를 제작하였다. 이를 이용해 PCR하여 약 0.9 kb product를 합성하였다. 또한 배추의 γ -ECS cDNA library로부터 sense 및 antisense primer를 제작하였다. 이를 이용하여 1.8 kb의 product를 합성하였다. 각각을 pGEM-T Easy vector를 이용하여 ligation과 transformation을 거쳐 plasmid DNA를 정제하여 sequence를 확인한 후 이 각각을 다시 *Mlu*I를 이용하여 ligation 하여 전반부는 GluB-1 promoter로 후반부는 γ -ECS로 하여 결합시킨 뒤에 이를 pIG121-Hm vector에 *Hind*III와 *Sac*I를 이용하여 Gus를 제거 후 그 자리에 결합시켰다.

현재는 구축된 재조합 vector pIG121-Hm을 freeze-thaw method를 이용하여 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 도입하였으며, 벼 종자 유래의 캘러스를 생산하고 있다.

37. γ -glutamylcysteine synthetase 유전자의 cloning과 담배 형질전환

신재천 · 이인애 · 윤호성 · 배은경 · 조진기

경북대학교

인체에 흡수된 대부분의 산소는 생체물질을 직접 산화하는 일없이 안전하게 사용되지만 흡수된 전체 O₂의 약 1% 정도는 인체에 해로운 활성산소종으로 된다. 사람의 경우 노화가 진행되면 활성산소의 제거기능이 약화되어 활성산소와 과산화지질이 축적된다. 이것들을 신속히 제거하기 위해서는 항산화물질들이 많이 생성되어야 하지만 그렇지 못할 경우에는 부득이 외부로부터 이들을 인위적으로 보충해 주어야 한다. Glutathione(GSH)은 대부분의 식물에서 대표적인 저분자량 thiol compound로서, sulfur transport, protein disulfide reductant, 제초제와 같은 xenobiotic의 해독 및 유전자 발현 조절 등의 기능을 가지는 필수대사산물이며 대표적인 항산화물질이다. 그리고, 이 GSH 합성의 핵심 enzyme이 γ -glutamylcysteine synthetase(γ -ECS)이다. 본 연구에서는 이 노화방지에 효과적인 glutathione을 많이 합성하는 벼와 목초를 생산하여 인체에 있는 활성산소를 제거하고 좀 더 건강한 삶을 영위하게 하기 위해 연구중이며, 이에 앞서 모델식물인 담배에 도입하려고 한다. 먼저, 고등식물 유래의 cytosolic γ -ECS 유전자의 선발을 위하여, GenBank에 등록된 여러 식물

의 γ -ECS 아미노산 sequence를 align하여 상동성이 가장 높은 염기서열을 찾아 primer를 제작하였고, 시금치로부터 분리한 total RNA를 RT-PCR로 증폭시킨 다음, pGEM T-Easy vector로 subcloning하였다. 이 subcloning된 cDNA 단편을 probe로 이용하여 배추 cDNA library에서 screening하였다. 그 결과, 총 길이 1.86 kb 크기의 γ -ECS cDNA를 dideoxy chain termination법으로 DNA 염기서열을 결정할 수 있었다. 현재, 이 유전자를 식물형질전환 vector인 pBI121에 cloning하여 담배에 형질전환 중에 있다.

38. 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.) 종자유래의 캘러스로부터 고효율 재분화 체계 확립

김범수 · 이동기 · 김진수 · 이상훈 · 우현숙 · 이병현
경상대학교 동물자원과학부

들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)는 공원, 운동장, 정원, 사방공사 등 지피식물로 이용되고 있으며 우리나라를 비롯해 전 세계적으로 그 이용성이 증가됨에 따라 경제작물로서의 중요성과 분자유종기법을 이용한 환경적응성이 우수한 고품질 잔디 품종개발의 필요성이 중요하게 대두되고 있다. 따라서, 본 연구에서는 들잔디의 종자로부터 단기간 내에 고효율 캘러스 유도 및 식물체 재분화 효율을 극대화 하고자 하였다.

들잔디의 성숙종자로부터 캘러스 유도 및 증식에 효율적인 배지의 종류, 식물 생장조절제의 종류, 기타 첨가물에 대한 연구를 수행하였다. 성숙종자로부터 캘러스 유도를 위한 적정배지로는 MS 배지에 2,4-D 3 mg/l를 첨가했을 때 70% 이상의 가장 높은 캘러스 형성율을 나타내었으며, 조직적으로도 치밀하여 재분화 능력이 우수한 캘러스를 형성하였다. 식물체 재분화율을 조사해 본 결과 캘러스를 0.1 mg/l 2,4-D, 5 mg/l BAP가 첨가된 MS 재분화 배지에 이식하여 2주간 배양했을 때 70% 이상의 가장 높은 재분화율을 나타내었다. 본 연구를 통하여 들잔디 성숙종자로부터 효율적인 캘러스 유도 조건 및 고효율 재분화 체계를 확립함으로써 분자유종 기법을 이용한 외래의 유용유전자를 도입하여 신품종 형질전환 들잔디를 생산할 수 있는 기반을 확립하였다. 현재 본 연구에서 확립된 재분화 조건을 바탕으로 유용유전자를 이용한 신품종 들잔디를 개발 중에 있다.