

KAERI/RR-1910/98

최종보고서

621.4837

T373H

GOVP 19917398

방사선 생명과학 기술 개발
Radiation Application for Development of
Bioscience

방사선 유전공학 marker 유전자 개발
Development of Radiation Genetic Marker Genes

연구기관
한국원자력연구소

과학기술부

제 출 문

과 학 기 술 부 장 관 귀 하

본 보고서를 “생명과학 기술개발”에 관한 연구과제(세부과제 “방사선 유전공학 marker 유전자 개발연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 4.

주관연구기관명 : 한국원자력연구소

주관연구책임자 : 이 영 일

연 구 원 : 송 희 섭

” : 김 진 규

” : 신 인 철

” : 이 상 재

” : 임 용 택

” : 이 인 석

” : 김 동 섭

” : 임 용 표

” : 서 용 원

” : 이 정 호

여 백

요 약 문

I. 제목

방사선 유전공학 marker 유전자 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

유전공학기술은 생명공학기술의 핵심기술이고 멘델식 유전학의 한계를 극복할 유일한 수단으로 인정받고 있다. 1970년 중반부터 싹트기 시작한 DNA의 조작기술은 급속히 발전하게 되었으며 특히 식물분야에서 유전공학기술의 파급효과는 어느 분야보다 큰 위치에 있다. 식물 유전공학의 농업분야에의 이용은 생산성 제고는 물론 내병성, 내충성, 바이러스, 저항성, 내염성, 내한성등의 형질개량분야에 매우 큰 역할을 담당하게 될 것이며 식량난 해결에 지대한 공헌을 하게 될 것이다.

특히 유전공학에서 유용 marker 유전자개발은 이 기술을 향상시키는데 매우 중요한 요소가 되고 있을 뿐아니라 직접 농작물의 품종개량에 없어서는 안 될 핵심소재로 자연돌연변이나 인위돌연변이가 이용되고 있다. 자연 돌연변이의 한계성이 드러나면서 인위 돌연변이의 활용이 증가하게 되었고 특히 방사된 돌연변이가 유용유전자원으로 주종을 이루어 왔다.

오는 2,000년 후반에 접어들면서 지구상의 급속 인구증가와 온난화, 오존층 확산, 대기오염, 수질오염, 토양오염등의 위협을 받게 되어 농업환경은 더욱 어렵게 될 전망이다. 지구상의 인구는 2,100년에 12억으로 증가할 추세에 있고 인구 1인당 가용 경지면적도 1960년 0.45ha에서 2025년에는 0.13ha로 더욱 줄어들게 되어 식량난은 심각히 가중될 것으로 전망되고 있다.

국내 식량난도 현재 20%미만의 자급도가 2000년 후반에는 더욱 낮아져 전적으로 외국 농산물에 의존해야 할 처지에 있다. 농산물의 국제 가격의 상승은 물론 수급균형을 잃게 되어 자급도가 낮은 국내 경제적 부담은 매우 클 것으로 전망된다. 더욱이 농산물 개방화 추세에 따라 외국농산물의 무분별한 수입으로 국내 농업기반이 혼란을 겪게 될 것이다. 이를 대비하여 국

내 농업환경에 맞는 체질개선을 위해 농산물의 품질개선은 물론 생략화로 생산비를 절감해야 할 시급한 문제에 직면해 있다. 식물유전공학은 이문제 해결의 최첨경기술로 인정받고 있으며 특히 유전공학marker유전자 개발은 이 분야의 핵심기술이다.

식량난 해결 없이 인류 평온은 유지할 수 없고 질적 삶의 개선을 위해 보다 안정된 식량 공급과 우량품질의 농산물공급은 매우 사회적 안정을 위해 필수적인 요소가 될 것이다.

식물 생명공학기법의 응용은 무엇보다 농업에서의 응용이 가장 관심을 끌고 있는데 특히 내병성, 내충성, 바이러스 저항성, 내염성, 내중금속, 내한성등 분야에 연구가 활발히 진행되고 있으며 곡물에 결핍되기 쉬운 특수 아미노산 함량을 높이는 연구도 진행되어지고 있다. 세계 농약 소비량은 16조 원에 달하고 있으면서도 농작물 손실량은 36%(병해 12%, 충해 14%, 잡초해 10%)에 달하는 것으로 보고되고 있다.

국내에서 식물유전공학기술은 아직 보편화되지 못하고 극히 제한된 소규모의 인력만이 이 분야 연구에 투입되고 있는 실정이다. 선진국 기술과는 상당한 격차를 보이고 있으며 농작물 품종개량은 지역특성에 부합해야 하기 때문에 선진국에서 만들어진 것들은 직접 도입해서 사용할 수 없어 부득이 각 지역에 맞도록 개량해야 한다. 이런 점에서 비추어 식물유전공학의 토착화는 공산품에서처럼 도입해서 쓸 수 없는 특성상 필수적으로 장시간의 연구투자를 거쳐 기술선진화가 반드시 이루어져야 한다.

국내 농업기반은 비교적 선진화되어 있는 잠재력을 지니고 있어 이 기술이 비교적 빠른 속도로 정착할 것이며 농업생산성제고에 획기적인 역할을 담당할 것이다.

농작물 품종은 지역의 기후, 토질, 기호성에 부합되어야 하기 때문에 품종도입으로 해결이 불가능할 것이 특징이다.

농업관련 연구는 선진국에서도 정부주도로 이루어지고 있다. 일부 기업이 참여하고 있으나 특히, 주곡작물의 품종개량은 대부분 정부가 직접 주도하고 있는 것이 현실이다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

구 분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
제1차년도 (1997)	기내세포주선발 기반기술확립	- 미분화 세포집단 획득 - 기내 대량 증식 체계확립 - 기내 세포주 선발 적정 방사선량 - 내성선발 적정 수준 결정
제2차년도 (1998)	- 영양요구성 세포주 선발 - 제초제 내성 세포주 선발	- 5-MT, cysteine 저항성 세포주 선발 - Picloram, paraquate 내성 세포 주 선발 - Sulfonylurea 내성 세포주 선발 - PEG 내성 세포주 선발
제3차년도 (1998)	환경내성 형질 세포주 선발	- Proline 저항성 세포주 선발 - 중금속 내성 세포주 선발

IV. 연구개발결과

1. 고구마의 기내 돌연변이 세포주 선발

올미, White Star의 잎, 엽병 및 경단조직에서 embryogenic callus를 유기하고, 이것을 이용하여 필수아미노산인 lysine 함량을 개선하고자 S-(2-aminoethyl)-L-cysteine(AEC) 저항성 세포주를 선발하였으며, 또한 고구마(*Ipomoea batatas* Lam.)의 돌연변이 유전자원을 확보하기 위해 embryogenic callus에 방사선을 처리하여 식물체 재분화와 AFLP, RAPD marker의 탐색을 통한 체세포 변이의 결과는 다음과 같다.

고구마 유식물체의 잎, 엽병 및 정단분열조직 등을 이용한 embryogenic callus의 유도에는 pH 5.7로 조절된 MS 배지와 1mg/2,4-D 가 첨가된 MS 배지가 효과적이었고, 식물체 재분화도 가능하였다.

유도된 embryogenic callus를 이용하여 S-(2-aminoethyl)-L-cysteine 저항성 세포주 선발이 가능하였고 hydroxyproline에서는 모두가 non-embryogenic callus로 변하였으며, 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2mM 및 1.4mM 농도에서 AEC 저항성 세포주의 50% 성장억제 수준은 0.8mM이고 대조구에서는 0.4mM 이었다.

Hydroxyproline의 50% 생장억제 수준은 AEC 대조구와 비슷하였다.

White Star, 울미 각각의 embryogenic callus에 방사선을 0, 30, 50, 70, 90, 120 Gy 및 180 Gy를 처리하여 재분화 식물체를 얻었으며, 120 Gy 이상에서는 캘러스만 형성되거나 기형인 개체만 유도되었다. White Star, 울미의 재분화 식물체 표현형에서도 변이가 나타났고, 방사선 처리된 somaclonal은 방사선 비처리 somaclonal 보다 RAPD에서 polymorphism이 각각 1.6~8.8배 증가하였고, AFLP에서는 polymorphism이 각각 3.4~3.3배 증가하였다.

2. 수도 NaCl 저항성 계통의 선발

가. 캘러스 생육에 미치는 NaCl 및 γ -ray의 영향

내염성 캘러스의 선발을 목적으로 염이 있는 배지에서 종자를 NaCl 농도별로 치상하여 캘러스를 유기 하였는데 동진, 간척, 오대벼 순위로 캘러스 형성이 우수하였고 또한 벼 캘러스가 어느 수준의 염농도 처리까지 생육할 수 있는가를 조사하기 위하여 0, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75% NaCl을 배지에 각각 첨가시켜 캘러스의 생존율을 측정하였는데 1%이상의 농도에서는 캘러스 생육이 급격히 억제되었고 NaCl 적정 선발 농도를 LD90으로 감안할 때 1.5%임을 알 수 있었다. 캘러스의 방사선 감수성을 조사하였는데 선량이 높아짐에 따라 생체중은 감소하였고, 돌연변이 유기적정선량을 LD50~LD70임을 감안할 때 7~9Kr임을 알 수 있었다.

나. NaCl 저항성 세포주 선발

실제로 γ -ray를 이용하여 내염성 캘러스를 얻기 위해 NaCl 농도를 1, 1.25, 1.5%로 나누고 γ -ray를 0, 3, 5, 7, 9KR로 각각 처리하여 생존율을 조사하였는데 NaCl과 γ -ray 조합처리에서 생존율은 동진 > 간척 > 오대벼 순이었다. 오대벼는 1.5% NaCl 대조구에서 생존한 캘러스가 하나도 없었지만 3KR 방사선 처리구에서 1개의 생존한 캘러스가 있었다. 그리고 5KR 이상의 방사선 처리구에서는 생존한 캘러스가 하나도 없었다. 1, 1.25% NaCl에서는 대체로 3품종 모두 3, 5KR 선량에서는 대조구보다 생존율이 높았고 7KR에서 대조구와 비슷하거나 조금 낮았으며, 9KR에서는 생존율이 낮아졌다. 이러한 경향은 NaCl 농도가 증가할수록 차이가 심하게 나타났다.

다. 계대배양에 의한 내염성 캘러스의 영속성

선발된 캘러스가 지속적으로 내염성이 나타내는지를 알기 위하여 각각 농도에서 150일 동안 유지한 후 생존율을 조사하였는데 1% NaCl에서 동진, 간척은 대조구보다 방사선 조사구 3, 5, 7KR에서 생존율이 2배정도 높았다. 그리고 1.25% NaCl에서 동진은 대조구보다 3, 5, 7KR 조사구에서 생존율이 높았지만 간척에서는 비슷하였고 오대벼에서는 극히 일부만 생존하였다. 1.5%에서 오대벼는 대조구와 방사선 처리구에서 모든 캘러스가 치사하였고 동진이 간척보다 생존율이 조금 우세하였다. 그리고 4개월간 NaCl 무첨가배지(재분화배지)에서 성장한 캘러스를 1% NaCl배지에 배양하였던 바, 대조구 캘러스는 80%까지 치사하였지만 내성 캘러스는 85%까지 성장하였다.

라. Proline 함량 측정

0, 0.25, 0.5, 0.75, 1% NaCl에서 생존한 동진벼 캘러스의 proline 함량을 측정하였는데 proline 함량은 NaCl 농도가 증가할수록 증가하였고, 0.75%에서 급격히 증가하여 1% NaCl에서는 대조구의 8배까지 증가하였다.

1% NaCl에서 선발된 캘러스를 재분화 배지에 옮긴 4개월 후에 캘러스를 회수하여 proline을 측정한 결과 대조구보다 5배 증가함을 알 수 있었다.

마. 내염성 캘러스로부터 식물체 재분화

NaCl 저항성 캘러스에서 식물체로의 재분화를 위하여 BAP(2ppm)+와 NAA(0.5ppm)가 첨가된 MS 배지에 옮겨 재분화 한 결과는 동진이 84, 간척이 77, 오대벼는 7개로 가장 낮았다. 그러나 1.5% NaCl의 방사선 처리구에서는 새싹종 모두 재분화되지 않았다.

NaCl이 식물체의 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 재분화 배지에 NaCl(0.5, 1%)을 첨가시켜 캘러스를 배양한 결과 염농도가 증가함에 따라 분화능이 저하되어 1% NaCl이 첨가된 배지에서는 2개의 식물체를 얻었다. 그리고 이러한 식물체 0.5, 1% NaCl에서는 각각 3개, 2개월까지 생존하였다.

또한 1% NaCl에서 캘러스를 5개월, 11개월간 각각 유지한 다음 재분화 하였는데 5개월간 NaCl에서 유지한 것은 재분화 개체를 13개 얻을 수 있었지만 11개월 유지한 캘러스에서는 단 1개 얻었다.

사. 재분화 식물체의 내염성 정도 및 표현형 조사

대조구와 내염성 캘러스에서 재분화된 식물체를 임의적으로 선발하여 0, 0.5, 1% NaCl이 함유된 배지에서 10주간 배양하였는데 0.5% NaCl 배지에서 6개의 대조구 식물체는 잎이 부분적으로 갈변하였고, 2개는 잎이 전체적으로 갈변하였다. 그리고 1% NaCl 배지에서는 대부분이 고사하였다. 그러나 내염성 캘러스에서 재분화된 식물체는 0.5%에서는 잎이 전체적으로 갈변한 것은 없었고, 1% NaCl 에서도 잎이 전체적으로 갈변한 것은 대조구에 비하여 매우 감소하였다. 선발된 내염성 식물체의 외적인 형태적 특성은 정상 잎 모양인 주, 잎의 폭이 좁고 진한 녹색인 주, 잎의 폭이 넓고 연한 녹색인 주, 잎위 한쪽 부위가 흰줄이 있는 주, 초장이 길고, 짧은 주, 열성인 묘, 종자에 까락이 있는 것, 붙임율이 낮은 것에서 높은 변이주 등으로 구분할 수 있었다. 붙임율은 4.46% ~ 99.7%까지 다양하였다.

사. 약에서 캘러스 유기 및 NaCl 저항성 캘러스 선발

동진, 화성 약을 염이 없는 배지에 치상했을때 캘러스 유기율은 화성이 동진보다 조금 높았으나 0.5% NaCl 이 포함된 배지에서는 동진이 화성보다 2배정도 높았고 1% NaCl에서는 두 품종은 모두 캘러스가 유기되지 않았다.

동진, 화성 캘러스를 1mm크기로 절단하여 1% NaCl 이 포함된 배지에 치상한 후 방사선을 0, 3, 5, 7, 9, 12, 15KR 조사한 다음 40일 후 생존율을 조사한 결과 동진이 화성보다 전체적으로 생존율이 높았다. 100일 후에는 동진, 화성 모두 12KR 이상에서는 생존한 캘러스가 없었으며 3, 5KR에서는 동진이 화성보다 생존율이 높았고 7, 9KR에서는 비슷하였다.

아. NaCl 저항성 캘러스에서 재분화

NaCl 저항성 캘러스를 IAA(0.2ppm)+Kinetin(1ppm)(1), Kinetin(4ppm)+NAA(1ppm)(2), Kinetin(2ppm)+NAA(1ppm)(3)이 들어있는 배지에 각각 치상한 결과 동진 캘러스는 3조합모두에서 green 식물체는 얻지 못하였고 albino만 얻었으며, 화성 내염성 캘러스는 2번 조합에서 1개 식물체와 3번 조합에서 2개 식물체를 얻었다. 그리고 0, 3, 5KR 선량에서는 화성, 동진 모두 식물체를 얻지 못하였고 7, 9KR에서는 화성은 각각 1, 2개씩 녹색 식물체를 얻었으나 동진은 모든 선량에서 albino 식물체만 형성되었다.

3. 영양 요구성 세포주 선발

가. 5-methyltryptophan(5MT) 저항성 세포주 선발

(1) 벼 성숙배를 이용한 5-methyltryptophan 저항성 선발

동진벼, 동안벼, 자광도(야생벼)등 3품종의 종자를 0~1mM 5MT를 첨가한 N6 배지에서 40일간 배양하여 배발생 캘러스를 유기시킨 결과 동진벼의 캘러스 생성율이 다른 두 품종에 비해 높게 나타났고, 캘러스 사태도 양호하였다. 또한, 동진벼의 종자에 감마선을 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30KR 처리하여 0.75mM 5MT 농도에서 배양한 결과 15KR 처리구의 캘러스 생성율이 가장 높은 것으로 나타났으며, 생체중으로 본 캘러스 상태는 10KR, 15KR 처리구가 가장 좋은 것으로 나타났다. 3품종의 캘러스에 감마선을 0, 3, 5, 7, 9KR 처리하여 0.25, 0.5mM 5MT를 함유한 선택배지에서 40일간 배양한 결과, 자광도의 캘러스 생존율이 약 15%정도로 가장 높게 나타났다.

이렇게 얻어진 캘러스는 1~2차례 계대배양을 거친 후, 여러 호르몬 조합에서 재분화 과정에 있고, 현재 동진벼 20개체, 동안벼 40개체, 자광도 20개체를 확보하여 개체별로 육성하여 순화과정에 있다.

(2) 벼 약배양 유래 캘러스를 이용한 5MT 저항성 선발

야생벼인 자광도의 atypical pollen을 채취하여 2mg/l NAA를 첨가한 N6 기본배지에서 캘러스를 유기하여 감마선을 0~15KR 처리한 후 0.25, 0.5mM 5MT를 첨가한 선택배지에서 배양한 결과 15KR 처리구에서 가장 높은 생존율을 얻었다. 생존한 캘러스는 1~2차례 계대배양을 거쳐 증식 후 여러 호르몬 조합에서 재분화 과정에 있다.

나. 고구마 AEC 저항성 선발

울미, White Star의 캘러스에 감마선을 각각 0, 5, 7, 9KR 처리한 후 1mM AEC를 함유한 MS 선택배지에 치상하여 40일간 배양한 결과 울미 품종이 White Star에 비해 저항성이 높은 것을 확인할 수 있었다. 생성된 캘러스의 일부는 1.5mM AEC로 옮겨 강선발을 하였으며, 나머지는 재분화 과정에 있다.

4. 첨가물질에 의한 염해경감효과

첨가물질에 의한 보리 유묘의 염해경감효과와 품종별 차이를 밝히고자 새쌀보리, 두원참쌀보리, 을보리, 진양, 두산29호 및 두산22호를 공시하여 실험을 수행하였다. 공시 종자를 NaCl 단독처리구와 NaCl과 함께 proline과 putrescine을 처리한 포트에서 발아시켜 7일 경과후 발아율, 초장, 근장, 유리 proline 함량 및 세포구조 등을 조사하였다. proline과 putrescine의 첨가물질에 의해 발아율이 상승하였으며, 새쌀보리와 두원참쌀보리의 쌀보리 계통이 발아율이 우수하였다. 초장은 proline과 putrescine 처리구에서 증가하는 경향을 보였고, 특히 두원참쌀보리와 진양에서 그 경향이 두드러졌으며, 건물중도 역시 첨가물질에 의해 증가하였는데 두원참쌀보리의 경우 proline을 첨가한 처리구에서 그 효과가 뚜렷이 나타났다. 반면, 근장에 있어서는 putrescine 처리구에서 오히려 감소하는 등 뿌리의 생육에는 첨가물질의 효과를 관찰할 수 없었다. 유리 proline 함량은 염해를 받았을 때보다 proline과 putrescine을 함께 처리하였을 때 그 함량이 높게 나타났으며 두원참쌀보리와 두산29호의 경우 putrescine 처리구에서 현저한 차이를 보였다. 엽초와 엽신의 세포구조는 NaCl 단독처리구 보다는 proline과 putrescine 처리구에서 염해경감효과를 관찰할 수 있었으며, 특히 putrescine의 처리가 proline에 비해 효과가 좋았음을 확인할 수 있었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

- 각종 marker 유전자 활용으로 식물 유전자 조작기술 향상
- 농작물 생산비의 대폭 절감
- 고품질 농산물 생산
- 환경내성 품종 육성에 의한 재배한계 극복
- 숙기 조절에 의한 유통 구조 개선
- 저항성 marker 유전자의 작물간 전이 연구
- 유용 유전자 개발의 대상작물 확대
- 유전자 조작기술의 선진화 및 독자개발

S U M M A R Y

I. Project Title

Development of Radiation Genetic Marker Genes

II. Objective and Importance of the Project

As the approaching 21st century, a lot of problems seems to threaten the expanding population, the global warming, the pollution of waters, soil and atmosphere, the declining soil quality. the population of the world will be 12 billion by the year 2100. Desertification, erosion and urbanization have apparently reduced the arable land per person from about 0.45ha/person will be further reduced to only 0.13ha/person. More over, Chemical problems and lack of water affect more than 50%, and only 11% of the world soil presents no limitations for cultivation.

After opening the market of agricultural products under WTO, the foreign imported products are drastically increased in domestic market. Farmers have a lot of problems to keep the domestic market in spite of the considerable achievement during last decades. They have to cultivate new competitive crops for the open market. Improvement of crop plants have the most important roll in the domestic agricultural industries. Even through the most cultivars have been bred by the conventional breeding method, however, breeders have faced to limit for supplement of the useful new genetic resources in natural environment. New genetic resources should be created through the improved cultivar and induction of new variety by the use of radiation for solution of food demand and increasing populations. The man around the world eager to advance the techniques of genetic engineering for

crop improvement through gene transformation in conjunction with the method of conventional plant breeding reached limitation. As the principal purpose of genetic engineering is the induction and selection of mutation and the expression of mutant gene, plant tissue culture and mutation researches have been very important role to develop the genetic engineering in the world, thus it is possible to obtain new improved variety such as disease, pest and chemical resistance and species with new useful agronomic characteristics. All nuclear techniques will essentially need to develop for satisfying these achievements. About 1,800 mutants have been released to farmer as cultivars directly and a lot of the more useful mutants also have been used as marker gene or genetic resources in the genetic engineering experiments in higher plants indirectly on the improvement of plant breeding.

Application of nuclear technique for solution of food problem has been useful to provide an opportunity to acceleration of the plant improvement, present research laid emphasis on the development of techniques of plant tissue culture and on the induction and selection of radiation mutation and on the evaluation of selected mutants for the preservation of gene resources.

III. Scope and Contents of the Project

For induction of mutants by *in vitro* mutagenesis, tissue culture methods were developed in various crops. Optimum dosage of radiation and selection of mutant was investigated to induce mutation by the tissue culture of rice and sweet potato.

Embryogenic calli of Yulmi and White Star were induced from the shoot meristem tip, leaf and petiole tissue of sweet potato. Radiosensitivities of the *in vitro* cultured materials were obtained for the selection of mutants by using *in vitro* techniques. Rice callus

was obtained from the mature embryo and anther culture.

The calli of sweet potato and rice were irradiated with gamma ray from 30~90Gy for mutation induction. Various resistant mutants to saline, 5-MT, cysteine and proline were screened in the calli and selected callus was regenerated into plantlets. Most of the selected mutants cultivated in pot or nursery bed in green house. The morphological characteristics were observed in field, and genetic variation confirmed by using RAPD and AFLP analysis

IV. Results and Proposal for Application

I. Selection of sweet potato induced by *in vitro* mutagenesis

Embryogenic calli of Yulmi and White Star were induced from shoot tip, leaf and petiole. S-(2-aminoethyl)-L-cysteine resistance were selected in order to increase the essential amino acid(lysine) content. To obtain mutation genetic resource of sweet potato, plantlets were regeenerated from the irradiated embrogenic calli and AFLP, RAPD markers were used for selection of somaclonal variation.

Leaf, petiole and shoot tip segments gave rise to great embryogenic calli when they were cultured on MS medium supplemented with 1mg/L 2.4-D.

Induced-embryogenic callus was used for selection of S-(2-amino ethyl)-L-cysteine resistance and all of embryogenic single cells were turned into non-embryogenic callus on the medium containing hydroxyproline. The sensitive cell and resistant cell growths were inhibited 50% by the treatment of AEC concentrations of 0.4mM and 0.8mM, respectively. The concentration of hydroxyproline is similar to that of AEC only for the sensitive cell growth which was inhibited 50%.

Plantlets of Yulmi and White Star were regenerated from the calli irradiated with gamma-rays of 0, 3, 5, 7, and 9KR except the calli irradiated above 12 KR.

Morphological variants of Yulmi and White Star were observed in the plantlets derived from gamma irradiated calli.

RAPD polymorphism of Yulmi and White Star variants induced from irradiated callus was much more than that of non-irradiated variants by about 1.6~8.8 folds. In the case of AFLP, the polymorphism of White Star and Yulmi irradiated variants was about 3.3~3.4 fold compared to non-irradiated variants.

2. Selection of NaCl tolerant lines in rice

(1) Effect of NaCl, γ -ray on the growth of callus

To select salt tolerant callus, seeds of Dongjin, Odae and Karncheog were inoculated on M&S medium containing the various NaCl concentration levels. The frequency of callus induction in Dongjin was more excellent than that of Karncheog and Odae, and the survival rate of callus on the medium supplemented with 0, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 and 1.75% NaCl was decreased as increasing NaCl concentration, markedly reduced in more than 1% and the LD₉₀ value was 1.5% NaCl.

As the increase of irradiation dose, fresh weight of calli decreased and LD₅₀~LD₇₀ of callus was showed in the range of 7-9KR.

(2) Selection of NaCl tolerant cell lines

Callus was treated with gamma ray of 3~9KR on medium containing 1, 1.25, and 1.5% NaCl to obtain NaCl tolerant cell lines, and survival rate of callus was more increased in Dongjin callus than those of Kancheog and Odae.

Non-irradiated callus of Odae died on the medium containing 1.5% NaCl, but one callus survived on the selection medium in the callus irradiated with 3KR and the others could not observed in radiation

dose more than 5KR.

Survival rate of callus on the medium containing 1 and 1.25% NaCl increased rather than that of control(non-NaCl) in treatment with 3 and 5KR, and was similar to that of control in deal with 7KR and was decreased with 9KR in three rice cultivars. The calli of 1.5% NaCl treatment appeared a wide difference.

(3) Durability of NaCl tolerant callus by subculture

For estimating the durability of salt tolerance in selected calli, calli were maintained on each NaCl concentration for 150 days and estimated survival rate of callus. Survival rate of the irradiated calli(3, 5, 7KR) of Dongjin and Kancheog was increased two folds that of non-irradiated calli on the medium containing 1% NaCl. Survival rate of irradiated calli of Dongjin was increased more than that of non-irradiated on médium supplemented with 1.25% NaCl, but survived too few callus in Odae. Non-irradiated and irradiated-callus of Odae died on the medium with 1.5% NaCl and survival rate of Dongjin callus was a higher than that of Kancheog

NaCl tolerant calli cultured on regeneration medium for 4 months was revived about 85%, but control calli died about 80% on medium with 1% NaCl.

(4) Estimation of proline contents

The proline contents of selected callus on the medium containing 0, 0.25, 0.5, 0.75, and 1% NaCl were increased as increasing NaCl concentration, markedly increased in 0.75% NaCl and the survived callus on the medium with 1% NaCl accumulated proline by eight folds than that of control. Proline contents of selected salt tolerant callus cultured on regeneration medium for 4 months were increased five times higher than that of control.

(5) Plantlets regenerated from NaCl tolerant calli

To obtain regenerants, salt tolerant calli were transferred on the medium containing BAP(2ppm) + NAA(0.5ppm). The number of regenerated plant of Dongjin was 84, Kancheog and Odae were 77 and 7, respectively.

When salt tolerant calli were transferred on medium containing 0.5% and 1% NaCl, the regeneration rate was poor as increasing NaCl level. Two plantlets were regenerated on medium supplemented containing 1% NaCl. Their plantlets grew well for 3 months on the medium containing 0.5% NaCl and turned into brown in leaves after two months on medium containing 1% NaCl. When NaCl tolerant calli were maintained for 5 months and 11 months on medium containing 1% NaCl, 13 plantlets were regenerated from the subcultured calli for 5 months but only one plantlet for 11 months.

(6) Estimation of phenotype and salt tolerance degree in regenerants

Control plants and NaCl tolerant plants were randomly selected and cultured on medium containing 0, 0.5, 1% NaCl for ten weeks. 6 control plants were turned into brown partially, two plants were totally browned on 0.5% NaCl and most of plants died on 1% NaCl.

Phenotypic characters of NaCl tolerant plants were observed a normal leaf, narrow and leaf type, white stripe leaf, plant height, awned seeds, partial fertility, complete sterility and rouge. The seed sterilities of NaCl tolerant plants varied from 4.46 to 99.7%.

(7) Selection of NaCl tolerant callus through anther culture

The induction rate of callus in Hawsung was higher than that of Dongjin on medium without salt, but the induction rate of Dongjin was two times higher than that of callus in Hawsung on medium containing 0.5% NaCl and both were not induced callus on medium supplemented with 1% NaCl.

The callus of ca 1mm in diameter of Dongjin and Hawsung was inoculated on medium with 1% NaCl and was treated with γ -ray. The survival rate of Dongjin callus was generally more increased than that of Hawsung callus after 40 day culture. The callus of two cultivars did not survive in higher dose than 12KR after 100 day culture, the survival rate of Dongjin callus was more increased than that of Hawsung callus in radiation doses of 3 and 5KR, and was similar to in 7 and 9KR after 100 day culture.

(8) Regeneration from NaCl tolerant callus.

NaCl tolerant callus was inoculated on medium containing IAA(0.2ppm) + Kinetin(1ppm)(1), Kinetin(4ppm) + NAA(1ppm)(2) and Kinetin(2ppm) + NAA(1ppm)(3) for regeneration.

Dongjin callus was not regenerated into green plants in all of these hormone combination, and only albino plantlets were obtained.

NaCl tolerant callus of Hawsung were regenerated one plantlet in the second hormone combination and two plantlet in the third hormone combination. Both cultivars were not regenerated in radiation dose of 0, 3 and 5KR, Hawsung callus was obtained one and two green plantlets in 7 and 9KR, respectively, and Dongjin callus produced albino plant in all of radiation dose.

3. Selection of nutritional mutants in *in vitro*

(1) Selection of 5-methyltryptophan(5MT) resistant rice (*Oryza sativa* L.) mutant lines in tissue culture

1) Selection of 5-methyltryptophan resistants using rice mature embryo

To select an optimal 5MT concentration, seeds of three rice cultivars, Dongjin, Dongan, and Jakwang, were cultured on N6 medium supplemented with 0~1mM 5MT for 40 days, and then calli were

obtained from various concentrations. Induction rate of Dongjin callus was better as compared with others, and development levels of callus were satisfactory.

Seeds of Dongjin cultivar irradiated with gamma rays of non, 5KR, 10KR, 15KR, 20KR, 25KR, and 30KR were cultured on N6 medium containing 0.75mM 5MT at 27°C for 40 days in dark growth chamber. As a result, callus treated with 15KR gamma ray had the highest induction rate, and development levels of callus were best of all in 10KR and 15KR dosage considering dry weights per clone.

The small pieces of calli were irradiated with gamma rays of non, 3KR, 5KR, 7KR, and 9KR, and cultured on N6 selection medium for 40 days. Calli of Jakwang cultivar were consequently the highest in survival rate.

After calli were subcultured at twice, plantlets were regenerated on Murashige and Shoog(MS) medium supplemented with different hormone combinations, indolacetic acid(IAA), benzylaminopurine(BAP), and kinetin.

Dongjin, Dongan, and Jakwang were regenerated about 20, 40, and 20 plantlets, respectively, and were transferred to soil in greenhouse.

2) Selection of 5MT resistants through anther culture

Haploid calli induced from atypical pollen of Jakwang on N6 basal medium supplemented with 2mg/ℓ α -naphthaleneacetic acid(NAA). They were irradiated with non, 3KR, 5KR, 7KR, 9KR, 12KR, and 15KR of gamma rays, and cultured on N6 selection medium containing 0.25mM and 0.5mM 5MT. As a result, anther callus treated with 15KR gamma ray observed the highest survival rates.

Survived calli were propagated through subculture at twice, and then are being regenerated on the medium with different hormone combinations, IAA, NAA, and kinetin.

(2) Selection of S-(2-aminoethyl)-L-cystein(AEC) resistant

sweet potato(*Ipomoea batatas*) mutants

Embryogenic calli of sweet potato cultivars, Yulmi and White star, were irradiated with gamma rays of non, 5KR, 7KR, and 9KR, then cultured on MS selection medium containing 1mM AEC at 27°C for 40 days. Consequently, Yulmi cultivars showed higher resistance to AEC than White star.

Yulmi calli treated with 5KR and 9KR were over 70% and 80%, respectively in survival rates.

One part of propagated calli were transferred on 1.5mM AEC for powerful selection, the others are being regenerated on MS medium(hormone free).

4. Alleviation effect by additives on NaCl stress

To determine the varietal responses for the alleviation effect of additives, proline and putrescine, on NaCl stress in barley (*Hordeum vulgare* L.), six barley varieties were grown in 129mM NaCl, 129mM NaCl + 7mM proline and 129mM NaCl + 7mM putrescine for 7days. The germination rate, seedling height and free proline contents in the seedling shoots increased after treatment with the additives. Also, the cell structures of the leaf sheath and the blade, through microscopic observation, were stabilized by the additives in all varieties. Putrescine seemed to be more effective than proline for the alleviation of NaCl stress. In varietal response, the additives were more effective in naked barley varieties on the growth of the seedlings, and the Doowonchapssal variety had the most effective response to the additives.

여 백

CONTENTS

SUMMARY	3
Chapter 1. Introduction	25
Chapter 2. State of the art	27
Chapter 3. The contents and results of the research	35
Section 1. The contents and methods of the research	35
1. Selection of <i>in vitro</i> mutation cell lines	
in sweet potato	35
1.1. Plant material and reagent	35
1.2. Analysis of somaclones using AFLP and RAPD	38
2. Selection of NaCl tolerant lines in rice	40
2.1. Induction of callus in mature embryo	40
2.2. Effect of γ -ray on the growth of callus	40
2.3. Effect of NaCl on the growth of callus	40
2.4. Selection of NaCl tolerant cell lines	41
2.5. Proline content analysis of NaCl tolerant callus	
and plantlets	41
2.6. Induction of callus in anther	41
2.7. Selection of NaCl tolerant lines in anther callus	41
2.8. Regeneration in NaCl tolerant callus of embryo ..	41
2.9. Regeneration in NaCl tolerant callus of anther ..	42
2.10. Estimated phenotype and salt tolerant degree	
of regenerants	42
3. Selection of nutritional mutants isolated in vitro	42
3.1. Selection of 5-methyltryptophan(5MT) resistant rice	
(<i>Oriza sativa</i> L.) mutant lines in tissue culture	42
3.2. Selection of S-(2-aminoethyl)-L-cystein(AEC) resistant	
sweet potato(<i>Ipomoea batatas</i>) mutants	44
4. Alleviation effect by additives on NaCl stress	44
Section 2. The results and discussions of the research ...	45

1. Selection of <i>in vitro</i> mutation cell lines	
in sweet potato	45
1.1. Development of embryogenic callus	45
1.2. Regeneration and propagation of embryogenic callus in suspension culture	48
1.3. Analysis of somaclones using AFLP and RAPD	51
2. Selection of NaCl tolerant lines in rice	65
2.1. Effect of NaCl on the growth of callus	65
2.2. Effect of γ -ray on the growth of callus	68
2.3. Selection of NaCl tolerant cell lines	68
2.4. Durability of NaCl tolerant callus by subculture	71
2.5. Proline content analysis of NaCl tolerant callus and plantlets	71
2.6. Induction of callus in anther and selection of NaCl tolerant lines	74
2.7. Regeneration in NaCl tolerant callus of embryo	74
2.8. Regeneration in NaCl tolerant callus of anther ..	77
2.9. Estimated phenotype and salt tolerant degree of regenerants	83
3. Selection of nutritional mutants isolated <i>in vitro</i> ..	83
3.1. Selection of 5-methyltryptophan(5MT) resistant rice (<i>Oryza sativa</i> L.) mutant lines in tissue culture ...	83
3.2. Selection of S-(2-aminoethyl)-L-cystein(AEC) resistant sweet potato(<i>Ipomoea batatas</i>) mutants	94
4. Alleviation effect by additives on NaCl stress	98
Chapter 4. Objectives of R&D and possible contribution	107
Chapter 5. Application	109
Chapter 6. References	111

목 차

요 약 문	3
SUMMARY	11
제 1 장 서 론	25
제 2 장 국내외 기술개발 현황	27
제 3 장 연구개발 수행과 결과	35
제 1 절 연구내용 및 방법	35
1. 고구마의 기내 돌연변이 세포주 선발	35
가. 식물 재료 및 시약	35
나. AFLP와 RAPD를 이용한 체세포 clone의 분석	38
(1) 재분화체의 genomic DNA 추출	38
(2) RAPD 분석	39
(3) AFLP 분석	39
2. 수도 NaCl 저항성 계통의 선발	40
가. 벼 성숙배에서 캘러스 유기	40
나. 캘러스 생육에 대한 γ -ray의 효과	40
다. 캘러스 생육에 대한 NaCl의 효과	40
라. NaCl 저항성 세포주 선발	41
마. 내염성 캘러스 및 재분화체의 proline 함량 측정	41
바. 벼 약에서 캘러스 유기	41
사. 약 캘러스에서 NaCl 저항성 선발	41
아. 벼 내염성 캘러스의 식물체 재분화	41
자. 약 내염성 캘러스의 식물체 재분화	42
차. M ₀ 재분화 식물체의 내염성 정도 및 표현형 조사	42
3. 영양 요구성 세포주 선발	42
가. 5-methyltryptophan 저항성 세포주 선발	42
(1) 벼 성숙배를 이용한 5MT 저항성 선발	42
(2) 벼 약배양 유래 캘러스를 이용한 5MT 저항성 선발 ...	43
나. 고구마의 AEC 저항성 선발	44
4. 첨가물질에 의한 염해 경감 효과	44

가. 식물재료 및 배양	44
나. 생육조사 및 proline 함량 검정	44
다. 세포구조 조사	45
제 2 절 연구결과 및 고찰	45
1. 고구마의 기내 돌연변이 세포주 선발	45
가. Embryogenic callus의 발생	45
나. 현탁배양에서 embryogenic callus의 증식 및 식물체 재분화 ..	48
다. AFLP와 RAPD를 이용한 체세포 clone의 분석	51
(1) Embryogenic callus에 방사선 처리 및 재분화 유도 ..	51
(2) 체세포 clone 특이 밴드의 탐색	51
2. 수도 NaCl 저항성 계통의 선발	65
가. 캘러스의 유기 및 캘러스 생육에 미치는 NaCl의 영향..	65
나. 캘러스 생육에 대한 γ -ray의 효과	68
다. NaCl 저항성 세포주 선발	68
라. 계대 배양에 의한 내염성 캘러스의 영속성	71
마. 내염성 캘러스 및 재분화체의 proline 함량 측정.....	71
바. 약에서 캘러스 유기 및 NaCl 저항성 캘러스 선발.....	74
사. 배 내염성 캘러스로부터 식물체 재분화.....	74
아. 약 내염성 캘러스로부터 식물체 재분화.....	77
자. M ₀ 재분화 식물체 내염성 정도 및 표현형 조사.....	83
3. 영양 요구성 세포주 선발	83
가. 5-methyltryptophan 저항성 세포주 선발	83
(1) 벼 성숙배를 이용한 5MT 저항성 선발	83
(2) 벼 약배양 유래 캘러스를 이용한 5MT 저항성 선발 ...	90
나. 고구마의 AEC 저항성 선발	94
4. 첨가물질에 의한 염해 경감 효과	98
가. 발아율, 초장, 근장 및 건물중	98
나. Proline 함량 변화	98
다. 세포구조의 변화	103
제 4 장 연구개발 달성도 및 대외기여도	107
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획	109
제 6 장 참 고 문 헌	111

제 1 장. 서 론

오는 2,000년 후반에 접어들면서 지구상의 급속한 인구 증가와 온난화, 오존층 산, 대기오염, 수질오염, 토양오염 등의 위협을 받게 될 것은 자명한 일이다. 지구상의 인구는 1650년에 5억에 불과하던 것이 1930년 20억으로 4배가 증가하는데 250년이 소요되었으나, 그 후 67년만에 68억으로 3배가 증가했고 2100년에 120억으로 증가할 추세에 있어 식량난은 심각히 가중될 전망이다. 그러나 갈수록 농업 환경은 어렵게 되어가고 있는 실정이다. IAEA 보고에 의하면 초당 1,000톤의 토양 유실과 3,000㎡의 산림이 훼손, 2,000㎡의 농경지 황폐화, 1,000톤의 유해 gas, 1,000톤의 폐기물이 생산되고 있으며 매일 100종의 생물이 멸종되고 있는 실정이다. 인구 1인당 가용 경지면적이 1960년에 0.45ha이었으나 1995년에는 0.24ha로 줄었으며 2025년에는 0.13ha로 급격히 줄어들 전망이다. 더욱이 가뭄과 화학약품오염 문제가 전체 경지면적의 50%를 차지하고 있으며 그밖에 저습, 냉해 지역이 28%를 차지하고 있어 농경지로 적합한 면적은 11%에 불과하다. 이러한 상황에서 농업발전에 의한 식량난 해결은 당면한 가장 중대한 문제가 아닐 수 없으며 이 문제 해결 없이 인류의 평안한 생존은 바랄 수 없을 것이다.

미국 농무성조사에 따르면 1950년부터 1980년까지 세계 곡물 증가율은 3%, 1980년 후반까지는 1%로 인가 증가율에 크게 뒤지는 실정이다. 1970년 세계 곡물이 급속히 증가한 것은 1960년대 멕시코 육종학자 노만 보라그 박사의 밀 품종개량에 의해 재래종 밀에 비해 3배나 증가한 밀 품종을 육성해 내었던 결과 이것을 제 1의 녹색혁명이라 부르게 되었던 것이다. 농작물 육종은 멘델의 유전법칙 발견 이후 획기적인 공헌을 했고 모든 작물에서 지대한 성과를 거두어 왔으며 농작물의 단위 면적당 수량을 현저히 상승시켜 놓았다.

그러나 기존 육종가들은 멘델식 교잡육종의 한계를 느끼기 시작했고 더 이상 획기적 생산성 제고에는 기존 방법과 다른 수단이 등장해야 할 것으로 공감하던 중 생명과학기술이 싹트기 시작했고 1970년대 중반부터 생명과학기술의 요소가 되는 DNA 조작기술이 본격적으로 개발되어 급속히 발전하게 되었다. 미생물 대상의 유전자 조작이 1980년 후반부터 식물분야에 전격 도입되어 식물 생명공학 기법이 기초 응용 면에서 연구가 활발히 진척되어가

게 되었다. 식물분야에서의 유전공학의 파급효과는 그 어느 분야보다도 넓고 커서 인류 생존에 직결되는 식량 문제를 해결하는 21세기의 가장 희망적인 기술이라 할 수 있겠다.

식물 유전공학의 특징은 세포수준에서 유전자 조작에 의해 형질전환을 시키고 그 형질전환 세포에서 완전한 식물체로 재분화 시킬 수 있는 전체형성능(totipotency)이 있다는 것이다. 이러한 현상은 동물에서는 불가능한 것으로 식물 유전공학의 큰 이점이 되고 있다. 생명공학기법도 다양한 유전 정보를 시험관내에서 분리해내고 그것을 증폭 또 복제해서 자유자제로 변형시킬 수 있을 뿐 아니라 생물 중에 제한 없이 자유로 옮겨 넣을 수 있다는 것이다. 식물은 식량자원 뿐만 아니라 산림자원, biomass, 관상자원, 약용자원, 신생물질 생산 등 다양한 응용면을 가지고 있기 때문에 타 어느 분야보다 관심이 높다.

식물 생명공학기법의 응용은 무엇보다 농업에서의 응용이 가장 관심을 끌고 있는데 특히 내병성, 내충성, 바이러스 저항성, 내염성, 내중금속, 내한성등 분야에 연구가 활발히 진행되고 있으며 곡물에 결핍되기 쉬운 특수 아미노산 함량을 높이는 연구도 진행되어지고 있다. 세계 농약 소비량은 16조원에 달하고 있으면서도 농작물 손실량은 36%(병해 12%, 충해 14%, 잡초해 10%)에 달하는 것으로 보고되고 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

식물생명공학 연구는 독일의 Max-Plank 식물 육종 연구소, 영국의 John Jones Center, 미국의 Mosanto, Dupont, 스위스의 Ciba-Geigy, 벨지움의 Plant Genetic System, 일본의 NIARS, 三井石油化學등이 있다. 스위스는 National Priority Program, 캐나다는 Agro Biotechnology Center가 있어 정부 차원에서 연구비가 지원되고 있다.

1996년 7월 현재 생명공학기법으로 만들어진 작물 육종 현황을 보면 전 세계에서 3,600여건이 포장실험 수행 중에 있거나 포장실험을 완료한 상태이다.

이 중 67%가 북미, 서유럽, 일본, 호주 등 선진국에서 67%를 점하고 있어 아직까지 식물 생명공학기법은 보편화하지 못하고 있음을 시사하고 있다. 유전공학기법에 의해서 탄생한 품종들을 당국의 허가를 받아야 포장실험이 가능하였으나 1993년부터 옥수수, 토마토, 콩, 감자, 목화, 담배, 당근 등 8개 작물에 관해서는 허가제에서 신고제로 완화되었다. 이들을 작물별로 분류하면 옥수수 40%, 토마토 14%, 콩 12%, 감자 11%, 목화 9%, 담배 5%, 기타 9%이다(표 2). 육종 목적별로는 내제초제의 육성이 31%, 내충성 23%, 품질개선 22%, 내병성 13%, 기타 11%이다.

1. 환경내성 유전자

전 세계의 경지 면적 가운데 25%는 과도한 염분 함유 경지이고 25%는 산성토질이며 40~60%는 가뭄에 시달리고 있는 경지이다. 식물조직 배양의 발달로 배양세포에서 이들 환경에 잘 견디는 돌연변이를 선발하는 연구가 시작되었고, 현재 활발히 이 분야의 연구가 진행되고 있다. 특정 환경 저항성 세포주를 선발하고 이 세포주에서 재분화시킨 식물이 그 환경에 저항성을 나타내는 것으로 알려졌고(Nabors *et al.*, 1980), 특히 내염성에 관한 연구가 매우 활발하게 진행되어 왔다(Flowers *et al.*, 1986 ; Epstein and Rains, 1987 ; Shannon, 1985 ; Rana, 1985 ; Winicov, 1995 ; Chen *et al.*, 1995, Ramos-Leal *et al.*, 1995).

Woo *et al.*(1985)과 Wong *et al.*(1986)은 1.5% NaCl 농도에서 내성 셀러

스를 선발하는 데 성공했고 그 캘러스로부터 재분화시킨 것중의 일부는 염분 내성이 증가한 것으로 나타났다.

Pandey and Ganapathy(1984)는 *Cicer arietinum*의 NaCl 내성 캘러스를 선발하였고 내성은 12주동안 유지되는 것을 확인하였다. Salgado-Garcigila et al.(1985)은 *Ipomoea batatas* L.의 캘러스에서 같은 결과를 얻었다고 보고하였다. 그러나 Chandler and Vasil(1984)은 1.25% NaCl이 함유된 배지에서 30~40주동안 Napier풀의 캘러스를 배양하고 점차 NaCl 농도를 2%까지 올렸을 때 내염성 캘러스는 괴사증상을 나타냈고 이것을 NaCl이 결여된 배지에 옮겼을 때 되살아났으나 내염성은 없어졌으며 이 캘러스에서 재분화시킨 식물의 내염성은 원래의 것보다 약화되는 것을 보았다. McCoy(1987) 4주동안의 배양으로 NaCl에 내성을 띄는 알팔파 세포주를 선발하여 재분화시킨 개체들은 매우 변이가 많았으며 어떤 계통은 내염성이 강한 것들도 있었으나 불임 때문에 개체를 유지할 수 없었다고 하였다. Pua and Thorpe(1986)과 Chandler et al.(1986)은 *Beta vulgaris*, *Brassica napus*에서 Na_2SO_4 와 NaCl내성 캘러스를 선발하였고, Ye et al.(1987)은 Na_2SO_4 가 첨가된 배지에 보리의 약을 배양하여 내염성 캘러스를 선발하였다. Singh et al.(1977)은 abscisic acid(ABA)가 NaCl에 대한 담배세포의 적응성을 촉진하는 효과가 있다고 주장하였다. ABA는 NaCl과 26kDa 단백질 합성에 합류되는데 ABA는 내염성에 관여하는 단백질 생산과 관계가 있는 것으로 여겨진다. 토마토(Huang et al., 1987), *Datura inoxia*(Jackson et al., 1984)에서 cadmium 내성 세포주를 분리해 냈는데 내성이 오랫동안 지속되는 것이 관찰되었다.

Proline이 내성을 증가시키거나 (Panday and Ganapathy, 1985 ; Watad et al., 1983) 감소시키는 효과 (Chandler and Thorpe, 1987 ; Jain et al., 1987)가 있다고 보고한 바 있고 Shevyakova et al.(1984)은 담배의 저항성 세포주에서 Spermidine 생합성이 13배나 증가된다는 사실을 알아냈다. Lone et al.(1987)은 보리의 배배양에 proline과 glycinebetaine을 첨가해줌으로써 NaCl 존재 하에서 줄기의 신장이 촉진되는 것을 관찰할 수 있었다. Proline을 과잉 생산하는 돌연변이는 내염성을 나타낼지도 모른다는 생각을 갖게되었다. Van Swaaij et al.(1986)은 감자에서 hydroxyproline 저항성 세포주를 선발한 결과 proline 과잉생산 세포주의 선발가능성을 제시하였는데 이 저항성 세포주의 일부는 NaCl에 내성을 나타냈고 재분화 식물체 중에

서 한 개체는 저항성이 계속 유지되는 것을 관찰할 수 있었다.

Handa *et al.* (1983)은 polyrythypene Glycol(PEG)에 내성 담배 세포주는 세포의 생리적 적응력이 생기게 되어 PEG내성을 띄게 된다고 하였다. Singh *et al.* (1985)은 PEG와 NaCl에 노출시킨 세포는 몇 개의 새로운 polypeptide band가 나타나는 것을 확인하였다. Conner and Meredith. (1985ab)는 담배 세포배양에서 aluminium 내성세포주를 선발했고 40개체의 재분화 식물체를 얻었는데 모두 aluminium에 내성을 나타내었으며 우성 단인자성 유전을 한다고 보고하였다.

Preil *et al.* (1988)은 X-선 처리한 국화 세포배양에서 저온에 내성 세포주를 획득했으며 Orr *et al.* (1986) ABA가 저온 내성에 관여하는 것 같다고 추정했다. Heuss *et al.* (1987)은 고온에 내성을 띄는 것중에서 38℃온도에서만 나타나는 단백질 band를 관찰하였다.

2. 저장 단백질 개선 유전자 개발

종자 저장 단백질은 육류 단백질에 비해 값싸고 고급 단백질로서 매우 중요한 단백질 공급원이 된다. 그러나 곡류에는 비교적 몇 가지 필수 아미노산의 함량이 낮은 것이 있는데 화곡류에 lysine, tryptophan이 낮고 두류에는 methionine, cysteine 같은 아미노산이 낮게 함유되어 있다. 작물 육종가들에 의해 곡류 저장 단백질 함량을 높이려는 노력이 이어져 왔기에 돌연변이 육종에 의해 lysine 함량이 높은 옥수수, 보리 개발된 바 있으나 (Nelson, 1968 ; Bright and Shewry, 1983) 불행히도 수량성이 낮고, 병충해에 약한 결점들이 동반되어 실용화되지 못했다.

최근 DNA 재조합 기술로 종자 저장 단백질의 질적 개선을 할 수 있는 분자 수준의 접근 방법이 개발되고 있다. 종자 저장 단백질은 용해성에 의하여 염용해성인 globuline, 알코올 용해성인 prolamines, 산 또는 알칼리 용해성인 glutelins, 수용성인 albumins로 나누어지는 데 globuline은 쌍자엽 식물의 자엽에 주저장 단백질이다. 이들은 침전계수로 11S, 7S, 2S로 분류되고 있다. 종자 저장 단백질은 amide amino acid인 glutamine과 asparagine이 풍부하여 거의 40%에 가깝다. 두류 종자 저장 단백질에는 sulfur amino acids계의 methionine, cysteine이 낮게 함유되고 있다. Cysteine은 부분적으로 methionine을 대신하기로 한다. 화곡류 저장 단백질

은 매우 낮은 필수 아미노산을 함유하는 데 1.5~4.5% lysine, 0.8~2.0% tryptophan, 2.7~3.9% threonine을 함유하고 있다(Bright and Shewry, 1983). FAO에서 추천한 이들 필수 아미노산의 이상적인 함량은 methionine 3.5%, lysine 5.5%, tryptophan 1.0%, 4.0% threonine이다. 영양 성분 개성 변이주와 영양요구성 변이 세포주의 선발 예는 표 5, 6과 같다.

1) 아미노산 요구성 및 아미노산 analog 내성주

식물의 배양세포 중에는 아미노산 analog의 내성주는 일찍부터 주목되어 기히 다수의 변이주가 분리되고 있다. 적당한 변이원 처리에 의하여 내성변이주의 유발 예를 보았으나 상당수의 변이주가 배양세포를 직접 약물이 함유된 선택배지에 배양하여 분리시키고 있다. 물론 변이원 처리는 변이의 빈도를 높이는데 도움이 되고 있다. 예컨대 Cella와 Ladarola(1983)에 의하면 *D. carota*의 5-methyl tryptophan 내성주의 출현빈도는 직접선발때 3.3×10^{-8} 이며, 자외선조사 ($3,600 \text{ erg/mm}^2$) 하면 약 11배의 3.7×10^{-7} 까지 높아진다고 한다. Widholm(1977)도 같은 정도의 변이율의 상승을 관찰하고 있다. 세포가 아미노산 analog 저항성을 획득하는 기구로서 가장 예가 많은 것은 직접 선발과 유기원 처리에 불구하고 대사 analog에 길항하는 아미노산의 과잉생산이다. 그 때문에 분리된 변이주의 성질을 야생주와 비교할 때 먼저 유리 아미노산을 조사하는 것이 필요한 절차로 되어 있다. *D. carota*의 세포를 예로 들면 methionine 내성주에서는 정상세포에 비하여 10배의 methionine이 hydroxyproline 내성주에서는 15~30배의 proline이 또 5-methyltryptophan 내성주에서는 tryptophan 함량이 내성의 정도에 비하여 상승하여 세포주에 따라 야생형 세포의 2배에서 8배의 증가를 보였다. 아미노산 analog에 의한 세포의 성장저해 작용의 원인은 일률적이지 못하여 본래의 대사산물인 아미노산의 함유량이 증대하는 것은 아미노산 analog의 저해작용을 억제하는 결과 때문이라고 생각된다. 정상적인 세포에서는 아미노산의 생성계는 최종산물에 의한 feedback 저해에 의하여 조절되고 있다. 예컨대 tryptophan의 합성계에 있어서 그 고유의 대사계 최초의 효소라고 생각되는

anthranilic acid 합성효소를 tryptophan 에 의하여 강하게 저해된다. 그런데 *N. tabacum*, *D. carota*, *Datura*의 5-methyltryptophan 내성주에 대하여 조사한 것에서는 어느 경우도 다량의 유리 tryptophan이 축적되어 있어

anthranilic acid 합성효소의 활성이 높고 똑같이 tryptophan에 대한 감수성이 저하하고 있었다. 효소활성의 50% 저해를 일으킬 때의 tryptophan 농도로 비교하면 내성주의 효소는 야생주에 비하여 *D. carota*에서는 5배, *N. tabacum*에서는 10배, *Datura*의 어느 세포주에서는 20배의 농도를 필요로 한다.

아미노산 analog 내성주에서 과잉 생산하는 것은 대사 analog에 직접 길항하는 아미노산 뿐만은 아니다. 5-methyltryptophan 내성의 *D. carota*의 세포는 tryptophan 이외에 proline의 축적이 두드러져 있어 2-analog인 acetydil carbonic acid에도 내성이 있었다. *N. tabacum*의 glycinehydroxamic acid 내성주에서는 glycine 뿐만 아니고 전 아미노산 평균함량이 3.6배 증가하고 있었다. 그 이유로서 특정의 아미노산만이 증가하여 아미노산 pool의 불균형을 초래하지 않도록 세포가 반응한 결과일 것이라고 설명되고 있으나 그 기구는 분명하지 않다.

내성의 다른 기구로서 약물의 세포 내의 투과성의 감소에 의한다고 생각되는 경우가 있다. 유발돌연변이는 아니지만 *D. carota*의 amino ethylcysteine 내성주나 *N. tabacum*의 p-fluorophenyl alanine 내성주에서는 아미노산이나 analog의 흡수활성이 현저히 저하하고 있다. 흡수의 감소가 특정 아미노산만이 아니고 전체 아미노산 흡수가 저하하는 경우는 여러 가지 아미노산 analog에 대해서도 내성을 보이게 된다. 이에 대하여 *N. sylvestris*의 proline analog 내성주에서는 proline과 acetydil-2-carbonic acid의 투과성만이 야생주의 1/4로 감소하고 있었다. 흡수활성의 저하는 세포막 성질의 변화에 의한 것일 것이다. 그 기구는 변이주의 종류에 따라 달라 똑같지는 않은 것으로 생각된다.

미생물의 약내성주에는 약물을 분해 또는 불활성화 할 경우가 다수 알려지고 있으나 식물에서의 예는 비교적 없는 편이다. Berlin과 Widholm(1977)은 *N. tabacum*의 p-fluorophenylalanine 내성주 중에 내성과 평행하여 phenylalanine amonialase의 활성이 현저히 증대하고 있는 것이 있어 그것에 수반하여 세포내에 phenol성 화합물의 축적이 일어나고 있는 것을 볼 수 있다. 이 효소는 phenylpyruvate나 그와 관련하는 2차 대사계의 제1단계로서 식물에서는 중요한 역할을 지니고 있으나 phenylalanine 이외에 p-fluorophenylalanine에도 작용하는 것이 알려져 있다. 따라서 이 효소의 활성증가는 독성이 있는 analog의 불활성화에 관계가 있는 것이라고 생각되

어 해독적 작용하는 것으로 추정되고 있다.

약물내성의 외관상의 변이세포주 중에는 불안정하여 배양중에 그 성질을 상실하는 것이 적지 않는 것은 기히 언급한 바 있다. 그러나 배양세포에서 재생시킨 식물에서도 안정하여 변이형질이 유지되는 예도 많다. 그 일부는 유전적인 해석도 이루어지고 있다. Carlson(1973)은 *N. tabacum*의 반수성 세포에 EMS를 처리하여 methionine 내성을 유발시켰다. 대부분 외관상의 내성 변이주는 배양중에 내성을 상실하였으나 3주는 2배체의 재생식물에서도 내성이 유지되어 있었다. 이 3주의 변이식물은 야생주와 교배하여 유전 분석을 하였는데 2주는 단인자성의 반수성 유전을 하는 것으로 나머지 1주는 2개의 열성인자가 관여하는 것으로 생각되고 있다. 아미노산 analog 내성주에서 재생시킨 식물은 농경상 유용한 것이 있는데 이 *N. tabacum*의 내성주도 그 한 예이며, 재생식물은 methionine 구조와 유사한 *Pseudomonas tabaci*의 독성에도 저항성을 나타냈다. 곡류에 부족한 methionine 함량을 증가시키는 시도도 배양세포의 변이를 이용하여 이루어지고 있다. Hibberd 와 Green(1982)은 azide 처리한 *Z. mays*의 세포에서 lysine과 threonine에 내성을 갖는 변이주를 분리해 냈으나 그중 1주는 재생식물에서도 내성을 보였다. 변이주의 lysine 함량은 야생주와 차이가 없으나 threonine이 높고 그 성질은 재생식물에서도 유지되고 있어 특히 곡류에서는 threonine이 야생형 식물보다 75~100배나 함유되어 있었다. 이 내성은 재생식물과의 교배에 의하여 우성형질인 것이 확인되었다. 그러나 세포단계에서 선발된 형질이 재생식물에 발견되었다 해도 그것이 안정하여 후대에 전해진다고 만은 할 수 없다. Schaeffer(1981)는 2-aminoethylcysteine에서 선발한 *O. sativa*의 내성주에서 재생개체의 종자단백질중의 lysine 함량이 10% 증가하고 있는 것을 보고하고 있으나 다음 세대에서는 야생형과 거의 차이가 없었다. Bourgin(1978)은 *N. tabacum*의 반수성 protoplast에 자외선을 조사하여 valine 내성주를 얻었으나 그중의 2주는 재생식물에서도 내성을 유지하고 있었다. 2종의 재생개체에 형태적인 이상은 없었으나 1개체는 2배($2n=48$)였는데 나머지는 옹성불임이며 염색체 이상이였다. 어느 쪽도 우성형질이며 Mendel 식의 유전을 하고 있었다.

원형질체 융합을 이용한 상보성 실험에서는 아미노산 analog 내성주에서도 간혹 이루어지고 있다. Harms 등(1981)은 *D. carota*의 2-aminoethylcysteine 내성주와 5-methyltryptophane 내성주의 원형질체를

PEG 법으로 융합시켜 다수의 2중 내성변이주를 얻었다. 내성은 안정하며 잡종세포를 장기간 약물이 존재하지 않는 배지에서 배양한 후에도 특성이 유지되고 있었다. 잡종세포의 염색체수는 일정하지 않으나 4배체의 것이 대부분이며 그 외에 2배체, 중간의 이수체의 것도 포함되어 있었다. 두가지 내성이 원형질 융합후에도 발현하고 있는 것은 어느 쪽도 우성형질인 것을 나타내고 있다.

2) 핵산염기 analog 내성주

Purine이나 pyrimidine의 analog에 저항성을 갖는 변이주는 아미노산 analog 내성주와 같이 일찍부터 주목을 끌고 있었다.

동물의 배양세포에서는 많은 BUdR이나 8-azaguanine 내성주가 분리되고 있으나 그 내성은 thymidine kinase나 hypoxanthine phosphoribosyltransferase의 결핍에 따른 것이 많다. 이들 효소를 없애면 purine이나 pyrimidine의 analog가 소위 재생경로를 거쳐 nucleoside의 대사에 들어갈 수가 없다. 식물세포에서도 BUdR이나 8-azaguanine 내성주가 분리되었을 때 동물세포와 유사한 내성기구가 예상도 없나 현재까지 보고되고 있는 식물내성주의 대부분은 동물세포와는 다소 다른 기구에서 내성을 획득한 것 같이 보였다. *G. max.*와 *A. pseudoplatanas*의 BUdR 내성주는 어느쪽도 thymidine kinase 활성이 있어 thymidine의 흡수도 정상이었다. *A. pseudoplatanas*의 8-azaguanine 내성주에는 phosphoribosyl transferase의 활성이 야생주의 50%로 저하하고 있었으나 내성을 설명하는데는 충분하지 않다. *H. gracilis*의 세포에서는 오히려 내성주 쪽에 높은 활성이 발견되고 있다. Ohyama(1976)는 *G. max.*의 BUdR 내성주에 대하여 관련효소의 활성변동을 다시 검토한 결과 이 내성주가 야생주에 비하여 3배의 thymidylic acid(dTMP) 합성효소와 50배의 dihydrofolate dehydrogenase 활성을 갖는 것을 확인하여 내성의 기구는 오히려 dTMP의 과잉생산에 의한 것이라고 생각되고 있다.

HAT 배지라는 것은 hypoxanthine, aminobutyric acid, thymidine을 함유하는 배지에서 동물세포의 체세포잡종 선발에 잘 이용되고 있다. 식물세포에서도 HAT 배지의 이용이 시험되고 있으나 식물세포의 BUdR이나 8-azaguanine에 대한 γ 내성기구는 동물의 경우와 반드시 일치하지 않으므로, HAT 배지에서의 내성주의 거동도 세포주에 따라 달라 더욱 많은 내성주

에 대하여 검토가 필요하다.

*Z. mays*에서는 수종의 아미노 analog 내성주가 분리되고 있다. 그중에는 불안정한 것도 있으나 생화학적 특징으로서는 dihydrofolate dehydrogenase의 활성이 상승하고 있는 것과 이 효소의 핵산 analog에 대한 감수성이 감소하고 있는 것이 발견되었다. 약물의 투과성도 조사하고 있으나 내성을 설명할 수 있는 정도의 차이는 없다. 핵산 analog 내성주의 유전적 성질은 거의 조사되지 않았다. *N. tabacum*의 BUdR 내성주에서는 재생식물의 교배에 의하여 내성이 우성형질이며 Mendel형 유전을 하고 있음이 확인되었다.

3) 기타의 내성 및 생화학적 변이세포주

항생체 저항주 중에 streptomycine 내성에 대하여는 Maliga 등(1981)에 의하여 상세히 연구되었다. Streptomycine은 캘러스에서 재생하는 잎의 녹색화를 저해하므로 엽록체에 대한 작용이 예상되었으나 *N. tabacum*에서 분리된 내성주에서는 엽록체 DNA에 의하여 지배되는 세포질 유전을 하고 있었다. 그러나 *N. sylvestris*의 반수체 엽육세포에서 분리된 내성주는 열성이며 Mendel식 유전을 하는 것으로 보고되었다.

Catt(1981)는 식물세포벽에 이상이 있는 변이주를 분리하기 위하여 세포벽 효소의 배지내 방출을 이용하였다. *D. innoxia*의 세포벽 중에는 알칼리성 phosphatase, β -galactosidase나 β -glucosidase 등이 존재하지만 정상세포에서는 이들 효소는 세포벽과 결합하고 있어 배지중에 유리해 나오지 않는다. 그런데 변이세포에서는 이 효소를 세포밖으로 방출하는 것이 있어 계대배양 중에도 그 성질을 유리하고 있는 것이 각각 1 세포주가 분리되었다.

일반적으로 배양세포는 설탕 또는 glucose에 배양되고 있어 기타 탄소원을 이용할 수 없는 것이 많다. 미생물에서는 탄수화물의 이용능력을 중요한 생리적 성질이라고 취급하고 있으나 식물에서는 그에 관한 연구가 비교적 적다. *G. max.*에서는 maltose에 생육할 수 있는 변이주가 EMS 처리에 의하여 분리되고 있으나 그 생화학적 성질은 검토되어 있지 않다. *N. tabacum*에서는 glycerol을 이용할 수 있는 변이가 분리되고 있다. 이 성질은 재생식물에서는 확인되지 않았으나 그 식물에서 유기시킨 캘러스에서는 인정되어 유전적 해석으로 우성형질인 것이 밝혀졌다.

제 3 장 연구개발 수행 및 결과

제 1 절. 연구내용 및 방법

1. 고구마의 기내 돌연변이 세포주 선발

가. 식물재료 및 시약

본 연구에 사용한 공시품종은 각각 White Star와 울미이며, dNTP와 DNA *Tag* polymerase는 promega에서, RAPD random primer (12mer)는 Wako사에서 각각 구입하여 사용하였고(Table 1), AFLP oligonucleotide adapters와 preamplification, selective primers는 GBCO BRL에서 구입하였다(Table 2). 그 외의 시약은 Sigma사와 BMS사로부터 구입하였다.

(1) Embryogenic callus의 유도

고구마 줄기를 마디마다 잘라 거즈에 싼 다음, 흐르는 물에 3~4시간 정도 수세하고 표면살균을 하기 위해 70% 에탄올에서 1분간, tween20 이 2~3 방울 첨가된 3% sodium hypochlorite 용액에서 10분간 각각 처리한 다음 멸균 증류수로 5회 수세하였다.

살균된 마디는 MS(Murashige and Skoog., 1962) 기본배지에 치상하여 발아를 유도하였다. 발아된 유식물체의 정단분열조직(1~2mm), 엽병과 잎(5mm)을 0, 0.5, 1, 2mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 배지와 pH 4.7, 5.7, 6.7 로 조정된 MS 배지에 치상하여 embryogenic callus를 유도하였다. 유도된 embryogenic callus는 1mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 배지에 계대배양 하였다.

(2) 현탁세포 배양의 유도 및 아마노산 analogue 저항성 선발

계대배양한 embryogenic callus를 메스로 작게 자른 후, 1mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 현탁배지를 100ml의 삼각 플라스크를 이용하여 26℃ 암소에서 125 rpm으로 진탕하고 계대배양은 2주 간격으로 수행하면서 단일세포의 증식을 유도하였다.

증식된 단일세포를 1mg/L 2,4-D와 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2mM 및

Table 1. Random primer sequences used for RAPD analysis

Code	5' to 3'
B21	AAG CCT ATA CCA
B22	GGT GAC TGG TGG
B27	GGC GGT TAT GAA
B31	CAC AAG GAA CAT
B32	ATC GCG GCT TAT
B41	GGC GAG GGA GGA
B43	ACT GGC CGG CAT
B44	GAG ACT GCT GAT
B45	ATC AAC ACT TTC
B46	TCC TGG GGC GTT

Table 2 . Oligonucleotide adapters and primers used for AFLP analysis

<i>Eco</i> RI-adapters ^a	CTCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGGTTAA
<i>Mse</i> I-adapters ^a	GACGATGAGTCCTGA GTA CTCAGGACTCAT
AFLP primers ^b	<i>Eco</i> RI+1 : GACTGCGTACCAATTC+A <i>Mse</i> I+1 : GATGAGTCCTGAGTAAT+C
<i>Eco</i> RI+3 E1 GACTGCGTACCAATTC+ACG	<i>Mse</i> I+3 M1 GATGAGTCCTGAGTAA+CAT M2 GATGAGTCCTGAGATT+CAA M3 GATGAGTCCTGAGATT+CAG M4 GATGAGTCCTGAGATT+CTC
Primer combinations analyzed in this experiment E1/M1, E1/M2, E1/M3, E1/M4	

a : *Eco* RI and *Mse* I adapters were ligated onto the ends of restriction fragments of template genomic DNAs.

b : *Eco* RI+1 and *Mse* I+1 primers were used in the preamplification of template DNA. The AFLP fingerprint was generated using *Mse* I+3 primers.

1.4mM S-(2-aminoethyl)-L-cysteine(AEC)와 hydroxy-proline이 첨가된 MS 현탁 배지에 옮긴 후 방사선 90 Gy 조사한 다음 embryogenic callus를 유도하고 저항성 식물체의 특징을 조사하였다.

(3) Embryogenic callus에 방사선 처리 및 somaclonal variants 유도

유도된 embryogenic callus를 MS 기본배지에 옮긴 후 방사선을 0, 30, 50, 70, 90, 120 Gy 및 180 Gy를 조사해 somaclonal variants의 형태적 특징을 조사하였다.

나. AFLP와 RAPD를 이용한 체세포 클론의 분석

(1) 재분화체의 genomic DNA 추출

Genomic DNA는 Saghai-Marooof등 (1984)의 방법을 조금 변형하여 추출하였다. 고구마를 이틀동안 암처리한 다음 잎조직 1g을 채취한 즉시 액체질소를 사용하여 얼린 다음 막자사발에서 마쇄하여 50ml 원심분리관에 옮긴 후, 10ml의 추출용액(50mM Tris-Cl pH8.0, 25mM EDTA pH8.0, 0.35mM sorbitol, 5% (PVP-40) polyvinylpyrrolidone, 1% sodium bisulfite, 0.2% 2-mercaptoethanol)을 첨가한 다음, 4°C 원심분리기에서 5,000rpm으로 10분 동안 원심분리하였다. 상층액을 버린 다음에 아래 pellet은 추출 용액(100mM Tris-Cl pH8.0, 1.4mM NaCl, 20mM EDTA, 2% CTAB, 1% 2-mercaptoethanol)으로 다시 녹여 60°C에서 30분 동안 반응 후 동량의 chloroform/ isoamylalcohol (24:1)을 넣고 서서히 5분 동안 흔들고, 상온에서 5,000rpm으로 10분 동안 원심분리 하였다. 이 과정을 2회 반복한 후 상층액의 2/3량의 isopropanol을 넣고 DNA를 회수하였다.

회수된 DNA는 건조시킨 후 1ml의 멸균수를 넣고 녹인 다음에 RNase (DNase-free) 25 μ l을 넣고 충분히 혼합한 다음 37°C에서 1시간 동안 반응하였다. 동량의 phenol, phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1), chloroform을 각각 1회씩 처리한 다음에 2/3량의 isopropanol을 넣고 DNA를 재회수하였다. 재 회수된 DNA는 70% 에탄올로 2회 수세하고 물기를 완전히 제거한 다음에 400 μ l T₁₀E₁에 녹여 냉동 보관하여 사용하였다.

(2) RAPD 분석

재분화 식물체로부터 추출한 genomic DNA을 이용하여 다음과 같이 RAPD 분석을 수행하였다. DNA 증폭반응을 위하여 PCR 반응용액을 총 25 μ l을 기준으로 했을 때 DNA 15ng, 10X PCR buffer 2.5 μ l, dNTP 200 μ M, DNA Taq polymerase 1 unit, primer 0.2 μ M, MgCl₂ 2mM를 가하여 혼합물을 만들었다. Thermocycler는 Perkin Elmer 480을 사용하였으며, 증폭조건을 초기에 94 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 denaturation을 시킨 후 94 $^{\circ}$ C (denaturation time) 5초, 36 $^{\circ}$ C (annealing time) 30초, 72 $^{\circ}$ C (extension time) 1분의 반응시간을 총 55 cycles로 한 후 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 반응시켰다. 반응 후 반응물 중 20 μ l를 취한 다음 0.5X TBE buffer가 첨가된 1.5% agarose gel에서 전개하고 ethidium bromide(EtBr)로 염색 후 UV transilluminator에서 증폭된 DNA polymorphism을 확인하였다.

(3) AFLP 분석

재분화 식물체로부터 추출한 genomic DNA를 이용하여 다음과 같이 AFLP 분석을 수행하였다(Vos et al., 1995). 총 반응용액은 500ng의 genomic DNA, Eco RI(2.5units), Mse I(2.5units)의 제한효소, 나머지 멸균수를 첨가하여 혼합한 25 μ l을 12시간 반응한 후 제한효소를 불활성화 하기 위해 70 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 반응시켰다. 완전히 절단된 genomic DNA에 T₄ DNA ligase buffer 2X, T₄ DNA ligase 1 unit, Eco RI adapter 50 pmoles, Mse I adapter 50 pmoles, 나머지 멸균수를 혼합한 25 μ l을 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 adapters을 ligation한 후 반응물을 10배 희석하였다. preamplification 반응을 위해 51 μ l를 기준으로 했을 때, 위의 10배 희석한 template DNA 5 μ l, 10X PCR buffer(15mM MgCl₂) 5 μ l, DNA Taq polymerase 1unit, dNTP 2.5mM, Eco RI primer 30ng, Mse I primer 30ng, 멸균수를 첨가한 후, 혼합물을 94 $^{\circ}$ C 30초, 56 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 1분의 조건으로 20회 반응하고, 반응이 끝나면 멸균수로 10배 희석하였다.

Eco RI primer 하나를 선택하여 T₄ kinase buffer 1X, T₄ kinase 20 units, γ -³²P ATP 10 μ l, Eco RI primer 500ng, 나머지 멸균수를 혼합한 50 μ l을 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 표지하였다. Selective amplification는 20 μ l을 기준으로 10배 희석한 template DNA 5 μ l, 10X PCR buffer(15mM MgCl₂) 2 μ l, labelled Eco RI primer 0.5 μ l, Mse I primer 30ng, dNTP 200 μ M, Taq

polymerase 0.4 unit, 멸균수를 혼합한 것을 94℃ 60초, 65℃ 60초, 72℃ 90초 1회 합성한 후, 9회 동안 annealing 온도를 56℃까지 1℃씩 낮추면서 시행하고, 94℃ 30초, 56℃ 30초, 72℃ 1분간 33회 반복하여 DNA를 합성하였다. 증폭된 DNA를 95℃에서 5분간 변성시켜 denaturing polyacrylamide gel에서 1,700V로 3시간 전기영동 후 X-ray 필름에 3일 동안 노출시켰다.

2. 수도 NaCl 저항성 계통의 선발

가. 벼 성숙배에서 캘러스 유기

본 연구에 사용된 재료는 동진, 간척, 오대벼의 성숙배이며, 성숙배에서 캘러스 유도는 5% sodium hypochlorite 용액에 15분 침전 시킨 후 멸균 증류수로 4회 세척한 후, 2mg/ℓ 2,4-D가 첨가된 N₆배지에 1개월 치상하여 캘러스를 유기시켰고, 유기된 캘러스는 1회의 계대배양을 통하여 증식하였다.

나. 캘러스 생육에 대한 γ -ray의 효과

방사선 조사는 본 연구소에 설비된 ⁶⁰Co선원으로 약 1mm로 절단한 캘러스를 캘러스 유기배지에 치상한 후 0, 3, 5, 7, 9, 12, 15KR로 조사한 후 40일 후에 생체중을 조사하였다.

다. 캘러스 생육에 대한 NaCl의 효과

캘러스를 약 1mm 크기로 절단한 후 NaCl이 각각 0, 0.5, 0.75, 1, 1.23, 1.5, 1.75%의 수준으로 첨가된 캘러스 배양배지(N₆)에서 배양하여 40일 후 각각의 캘러스 생존율을 조사하고 1%이상에서 생존한 캘러스를 이용하여 비 방사선 조사 NaCl 내성 세포주 선발에 이용하였다.

라. NaCl 저항성 세포주 선발

방사선 이용 내염성 캘러스를 선발하기 위하여 1, 1.25, 1.5% NaCl 이 함

유된 배지에 캘러스를 치상한 뒤 방사선을 0, 3, 5, 7, 9KR로 조사하여 생존율을 40일 후에 1차 조사하고 계속 계대배양하여 150일 뒤에 다시 조사하였다.

마. 내염성 캘러스 및 재분화체의 proline 함량측정

Proline 함량 측정은 Troll & Lindsley의 방법을 사용하였다. 캘러스 1g에 추출용액인 MCW (MeOH : Chloroform : water = 12 : 5 : 1) 5ml을 첨가하여 캘러스를 마쇄시킨 후 2000rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액 2ml과 acetic acid 3ml, ninhydrin reagent [ninhydrin(g) : acetic acid(ml) : 6M phosphoric acid(ml) = 1.25 : 30 : 20]을 혼합한 후 95°C에서 45분 동안 증탕한 다음 spectrophotometer를 이용하여 520nm에서 proline 함량을 측정하였다. 표준용액은 L-proline을 사용하였다.

바. 벼 약에서 캘러스 유기

벼 이삭의 선단부가 지엽 아랫잎의 잎귀와 일치 했을 때 (10cm) 즉 1헥기에 해당하는 약을 채취하여 8°C에서 10일 동안 저온처리한 뒤 NAA 2ppm이 포함된 N6배지에 치상한 뒤 캘러스를 유기하였다.

사. 약 캘러스에서 NaCl 저항성 선발

유기한 캘러스를 1% NaCl 이 함유된 배지에 치상한 후 방사선을 0, 3, 5, 7, 9, 12, 15KR 처리하여 NaCl 저항성 캘러스를 선발하였고 선발된 캘러스는 100일 동안 계대배양 하였다.

아. 벼 내염성 캘러스의 식물체 재분화

NaCl에 내성을 지닌 캘러스를 식물체로 재분화시키기 위해 0, 0.5, 1% NaCl이 첨가된 재분화 배지(MS + 2ppm BAP + 0.5ppm NAA)에서 배양하여 shoot 및 root를 유도하였다. 재분화된 유식물체는 1/2MS배지에서 10cm 내외로 키운 다음 상온에서 순화하고 일반포장에 정식하였다.

자. 약 내염성 캘러스의 식물체 재분화

NaCl에 내성을 지닌 캘러스를 식물체로 재분화시키기 위해 재분화 배지에서 배양하여 shoot 및 root를 유도하였다. 재분화된 유식물체는 1/2MS배지에서 10cm 내외로 키운 다음 상온에서 순화하고 일반포장에 정식하였다.

차. M₀ 재분화 식물체의 내염성 정도 및 불임을 조사

대조구와 NaCl 저항성 캘러스에서 재분화된 식물체를 0, 0.5, 1% NaCl이 첨가된 MS배지에서 10 주간 배양한 후 내염성 정도를 조사하였고 각 객체에서 수확한 종자의 불임을 조사하였다.

3. 영양 요구성 세포주 선발

가. 5-methyltryptophan 저항성 세포주 선발

(1) 벼 성숙배를 이용한 5-methyltryptophan 저항성 선발

국내 벼 품종인 동진벼, 동안벼, 자광도(야생벼)등 3품종을 분양받아, 70% ethanol로 적신 뒤 10% sodium hypochlorite에 tween 40을 3~4방울 떨어뜨린 용액으로 약 30분간 종자소독을 하였다. 소독된 종자는 멸균수로 세척한 뒤 0.1g/l myo-inositol, 0.7g/l proline, 0.1g/l casein hydrolysate, 30g/l sucrose, 4g/l phytigel과 hormone(2mg/l 2,4-D)을 첨가한 N6 기본배지에 5MT에 대한 저항성 선발기준을 정하고 5-methyltryptophan을 각각 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1mM 첨가하고 종자를 치상하여 25℃ 암조건하의 growth chamber에서 배발생 캘러스를 유기하였다.

캘러스는 미분화 세포상태로 5-methyltryptophan에 대한 감수성이 성숙배와는 다를 것으로 생각되어, 대조구(5-methyltryptophan free)에서 유기된 캘러스를 2mm크기로 잘게 잘라 각각 0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1mM 5-methyltryptophan을 함유한 상배지에 옮겨 저항성 선발의 적정농도를

정하였다.

또한 대조구의 캘러스를 계대배양을 통해 증식하여 방사선 조사를 위한 재료로 사용하였다. 방사선 조사는 캘러스를 9cm petri-dish에 일정하게 옮긴 후, 감마선을 조사하였다. 이때 선량은 3, 5, 7, 9KR를 각각 처리하였고 처리된 캘러스는 0, 0.125, 0.25, 0.5mM을 함유한 N₆배지에 옮겨 25°C 암조건하에서 배양하였다. 여기서 선발된 캘러스는 두차례의 계대배양을 거쳐 재분화 과정에 들어갔다. 재분화 배지는 Murashige & Skoog 기본배지에 30g/l sucrose, 5g/l phytagel을 첨가하고 hormone(0.5mg/l NAA + 2mg/l BAP)을 넣어 사용하였고, 재분화 조건은 27°C 온도조건에서 일장을 1일(주/야) 16/8 시간으로 조절하여 배양하였다. 또한 감마선이 조사된 캘러스의 재분화율을 높이기 위해 NAA, IAA, BAP, Kinetin 등의 호르몬을 여러 조합으로 나누어 재분화시켰다. 선발된 재분화체는 hormone이 없는 1/2 MS 기본 배지에서 약 한 달간 생육시킨 후, 물로 배지를 깨끗이 닦아 내고 포트에 옮겨 일장을 1일(주/야) 16/8 시간으로 조절하여 *in vitro* 상태에서 순화시켰다.

(2) 벼 약배양 유래 캘러스를 이용한 5-MT 저항성 선발

야생벼인 자광도의 atypical pollen을 채취하여 N₆ 기본배지에 1g/l casein hydrolysate, 50g/l sucrose, 0.25g/l proline, 5g/l phytagel과 hormone(2mg/l NAA)를 첨가한 후 치상하여 25°C 암조건하의 growth chamber에서 캘러스를 유도하였다. 얻어진 캘러스는 계대배양을 통해 증식 후 방사선 조사를 위한 재료로 사용하였다. 방사선 조사는 캘러스를 9cm petri-dish에 일정하게 옮긴 후 감마선을 3, 5, 7, 9, 12, 15KR 처리하였다.

조사된 캘러스는 3일 후 0.25, 0.5mM 5-methyltryptophan을 함유한 상기 동일 배지에 옮겨 저항성 미분화 세포 집단을 선발하였다. 선발된 캘러스는 1~2차례 계대배양을 통해 증식하여 재분화 과정을 수행하였다. 재분화 배지는 N₆ 기본배지에 1g/l casein hydrolysate, 0.25g/l proline, 50g/l sucrose(or 30g/l glucose), 10g/l phytagel과 hormone은 1mg/l NAA + 2mg/l kinetin 또는 0.2mg/l IAA + 2mg/l kinetin 두조합을 첨가하였다. 재분화 조건은 27°C 온도조건에서 일장을 1일(주/야) 16/8시간으로 조절하여 배양하였다.

나. 고구마의 AEC 저항성 선발

류 등에 의해 보고된 고구마 품종 부여재래, 울미, White star의 배발생 캘러스를 분양 받아 Murashige & skoog 기본배지에 30g/ℓ sucrose와 1mg/ℓ 2,4-D를 포함한 배지에 계대배양하여 방사선 조사를 위한 재료로 사용하였다. 방사선 조사는 캘러스를 9cm petri-dish에 일정하게 옮긴 후, 감마선을 조사하였다. 이때의 선량은 5, 7, 9KR을 각각 처리한 후, 1mM S-(2-aminoethyl)-L-cysteine을 함유한 상기 배지에 치상하여 25℃ 압조건하의 growth chamber에서 배양하였다. 선발된 저항성 캘러스는 일부를 떼어 재분화 배지 MS 기본배지(hormone free)에 옮겨 재분화를 유도시켰다. 재분화 조건은 27℃ 온도조건하에서 1일 일장(주/야) 16/8시간으로 조절하였다.

4. 첨가물질에 의한 염해경감효과

가. 식물 재료 및 배양

품종간 염해 경감 효과를 위해 쌀보리인 새쌀보리와 걸보리인 울보리, 그리고 맥주보리인 진양, 두산 29호, 두산 22호등 6품종을 분양받아 공시재료로 사용하였다.

보리 종자 소독은 각각 70% ethanol에 1분가량 침종한 후 10% sodium hypochlorite와 tween 40(3~4방울)을 혼합한 용액에 담그고 약 15분가량 잘 흔들어 준 뒤 증류수로 약 30분 가량 세척하였다. 소독이 완료된 종자는 품종별로 대조구, NaCl 129mM, NaCl 129mM + proline 7mM, NaCl 129mM + putrescine 7mM 이 첨가된 배지에 3반복으로 치상한 후, 배양중의 일장을 1일(주/야) 16/8 시간으로 조절하여 27℃온도 조건에서 7일간 배양하였다.

나. 생육조사 및 Proline 함량 측정

7일간 배양된 식물체의 물리적 특성인 발아율, 초장 근장, 건물중을 조사한 뒤 Proline 분석은 Troll hindsley(1955)의 방법을 사용하였다. 작업

시료를 각 0.5g 씩 평량하여 liquid nitrogen 과 섞어 막자에서 분쇄후 M·C·W buffer 5ml(Methanol :Chloroform: D·W=12: 5: 1)로 잘 섞어 주었다. 이상의 용액을 4℃에서 10분간 10,000rpm 으로 원심분리후 상등액을 떠내어 전체 부피 500 μ l가 되도록 $\times 2$, $\times 4$, $\times 8$, $\times 16$, $\times 32$ 의 비율로 증류수로 희석하였다. 각 튜브에 acidic ninhydrin reagent (Acetic acid: 6M phosphoric acid: Nihydrin=3: 2: 125 mg)1.5ml를 첨가하고 100℃에서 1시간동안 가열 뒤 상온에서 충분히 식힌 후에 80 μ l toluene을 첨가하여 잘 섞은 다음 30분동안 정치한 후 520nm 파장에서 spectrophotometer (SHIMADZU UV-160A)로 O.D 값을 측정하고 순수 L-proline 표준값과 비교해 proline 함량을 계산하였다.

다. 세포구조 조사

엽초와 엽신을 증류수로 세척 후 1.5% agarose 로 굳힌후, 예리한 칼로 절개하여 각각 100배와 400배율로 광학현미경(Nikon Eelipse TE 300)을 사용해 관찰하였다.

제 2 절 연구결과 및 고찰

1. 고구마의 기내 돌연변이 세포주 선발

가. Embryogenic callus의 발생

식물체 엽병, 잎 및 정단분열조직의 절편 중 embryogenic callus는 pH 4.7, 5.7, 6.7과 1mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 배지 중 pH 5.7로 조절된 배지에 치상된 정단분열조직, 잎, 엽병이 pH 4.7, 6.7로 조절된 배지 보다 증식율이 각각 11, 12, 34배 높았으며(Table. 3,) 2,4-D가 각각 0, 0.5, 1, 2mg/L 이 첨가된 MS 배지중에서는 2,4-D 1mg/L가 첨가된 배지에서 다른 농도의 배지 보다 embryogenic callus의 형성이 정단분열조직, 엽병, 잎에서 약 2~2.5배 증가하였다(Table. 4,). MS 기본배지에서는 callus 및 embryogenic

Table 3. Frequency of embryogenic callus formation from explants of sweet potato cultured on MS medium adjusted various pH level

pH	Cultivars		Yulmi						White Star					
			S, A, M		L		P		S, A, M		L		P	
	A	B(%)	A	B(%)	A	B(%)	A	B(%)	A	B(%)	A(%)	B(%)	A(%)	B(%)
4.7	1/15	6.6	1/35	2.9	0/29	0	1/15	6.6	1/35	2.9	0/29	0		
5.7	11/15	73.3	13/35	37	10/29	34.5	12/15	80	12/35	34	9/29	31		
6.7	2/15	13.3	0/35	0	0/29	0	1/15	6.6	1/35	2.9	0/29	0		

A : Total no. Embryogenic callus/Total no. Inoculated explants

B : Frequency (%) of embryogenic callus formation

S,A,M : Shoot apical meristem, L ; leaf, P ; petiole

Table 4. Frequency of embryogenic callus formation from explants of sweet potato cultured on MS medium supplemented with various 2,4-D levels

Cultivars	Part of explants	2,4-D concentration(mg/L)							
		0		0.5		1		2	
		A	B	A	B	A	B	A	B
Yulmi	1	0/10	0	3/15	20	11/15	73	5/15	33.0
	2	0/20	0	4/30	13	11/30	36	7/30	23.3
	3	0/20	0	3/30	10	10/30	33	7/30	23.3
White Star	1	0/10	0	4/15	26	12/15	80	4/15	26.6
	2	0/20	0	4/30	13	9/30	30	6/30	20.0
	3	0/20	0	2/30	6.6	10/30	33	5/30	16.6

1, Shoot apical meristem; 2, Petiole; 3, Leaf

A : Total no Embryogenic callus/Total no Inoculated explants

B : Frequency(%) of embryogenic callus formation

callus의 형성을 관찰할 수 없었다. White Star, 을미의 정단분열조직, 잎, 엽병을 이용한 embryogenic callus의 유도는 pH 5.7로 조절된 MS 배지와 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 배지에서 가장 양호한 것으로 나타났는데 이는 Liu *et al.* (1992)의 결과와 일치하였다. 정단분열조직에서는 embryogenic callus가 80%이상 나타나고 잎, 엽병에서 약 30%가 나타나는 것으로 보아 정단분열조직이 잎, 엽병 보다 embryogenic callus 형성에 효율적이라고 사료된다. Zheng 등(1996)은 2,4-D(2.5mg/L)와 BAP(0.25mg/L)로 혼합된 MS 배지에서 PI-318846-3 계통의 잎, 엽병조직을 이용하여 약 78%의 embryogenic callus를 얻었고, Motoyasu 등(1996)은 고계품종의 정단분열조직을 이용한 결과 1mg/L Dcamba, 4FA, Picloram 등에서는 90% 이상 embryogenic callus을 얻었지만 2,4-D에서는 10% 미만의 embryogenic callus을 얻었다.

본 실험과 Zheng 및 Motoyasa 실험결과의 차이는 배양의 재료로 이용된 고구마의 품종간 차이, 호르몬 및 환경조건 등에서 비롯된 결과로 사료된다. Embryogenic callus의 유도에서 동일시기에 발아한 유식물의 잎, 엽병 및 정단분열조직을 동일한 배지에 치상하여도 캘러스, 배발생 캘러스, 체세포 배 등의 각기 다른 조직이 유도되었는데, 이러한 결과는 초기 배양 재료로 이용한 유식물의 생리적 단계가 embryogenic callus 발생 과정에 영향을 미쳐 각기 다른 조직이 유도되는 것이라고 보고하였다(Scarpa *et al.*, 1993).

잎, 엽병 및 정단분열조직에서 유도된 embryogenic callus는 투명한 노란색을 띄고, 매끈하며, 단단하고, 느리게 성장하는 특징이 있고, non-embryogenic callus는 흰색, 노란색, 약간 갈색, 거친모양 등이 나타나고 쉽게 부스러지고 빠르게 성장하는 특징이 있다.

나. 현탁배양에서 embryogenic callus의 증식 및 식물체 재분화

고구마의 embryogenic callus 형성이 잘되는 장점을 이용하여 직접적으로 교잡이 불가능한 고구마에서 유전자원의 다양성증대 및 육종의 방안으로 somaclonal variations 유기 및 amino acid analogue 저항성 세포주 선발에 이용하였다.

1mg/L 2,4-D와 S-(2-aminoethyl)-L-cysteine(AEC), hydroxyproline이 첨가된 현탁배지에서 4주 동안 단일세포(약 8×10^7 cells)를 유도하였으며, 4주 정도

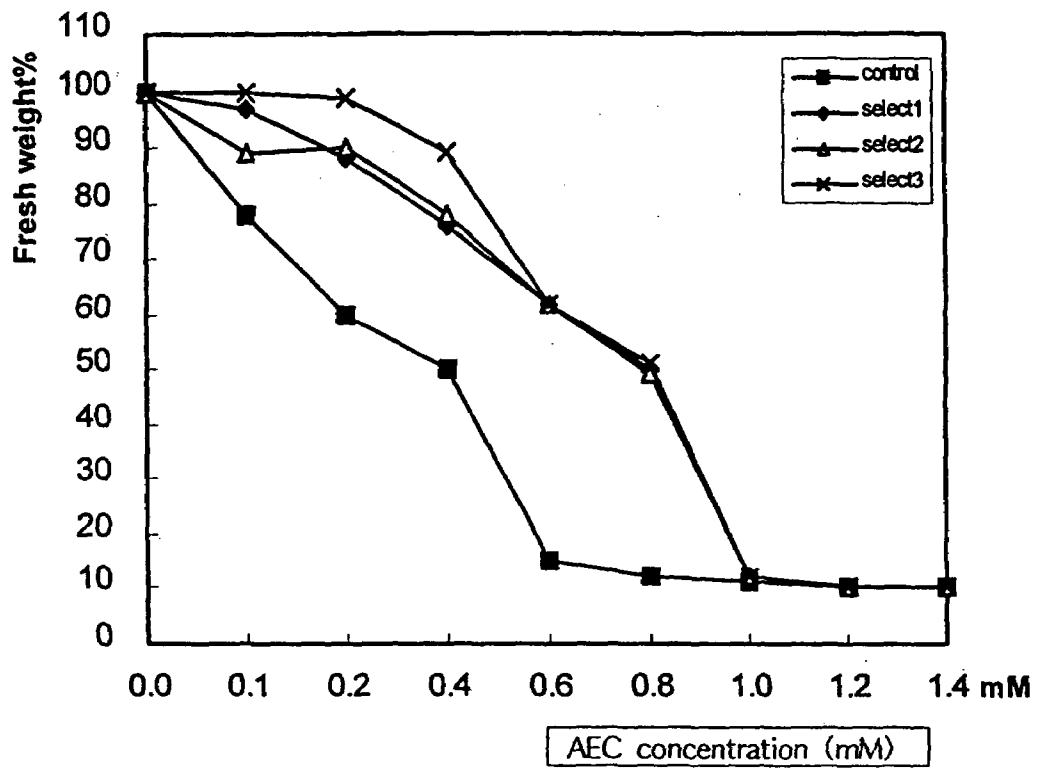


Fig 1. The effect of S-2-aminoethyl-L-cysteine (AEC) on the growth of sweet potato callus. Growth was measured of 28 days after inoculation.

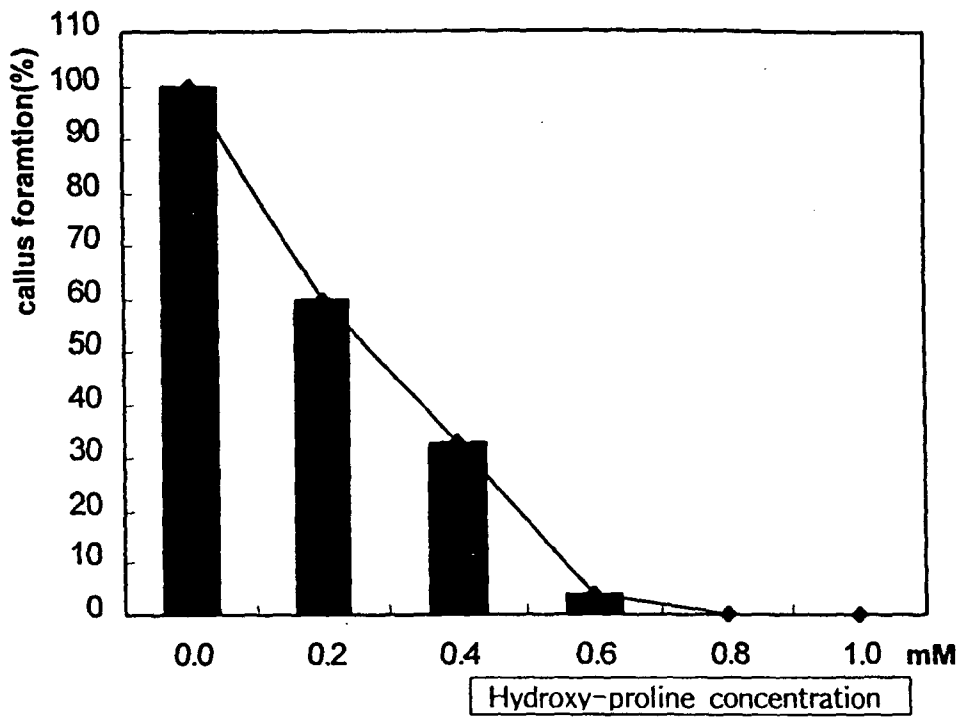


Fig 2. The effect of hydroxy-proline on the growth of sweet potato callus
Growth was measured of 28 days after inoculation.

가 지나면 embryogenic callus가 이상 캘러스의 형태로 변형되면서 고사하였다. 2,4-D와 hydroxyproline, 2,4-D와 AEC가 첨가된 현탁배지에 방사선을 90 Gy 조사하여 1주 동안 유지하고 증식된 embryogenic callus는 1mg/L 2,4-D, AEC가 첨가된 MS배지에서 한 달 동안 성숙하여 발아한 후 MS 기본배지에 옮겨 재분화 개체를 얻었다. AEC가 첨가된 MS 배지에서 방사선을 조사하지 않은 단일세포의 50% 성장억제 수준은 0.4mM이었고, 3개의 돌연변이 세포주는 0.8mM이었으며(Fig.1), 0.8mM에서 방사선을 조사하지 않은 단일세포의 성장은 약 35% 감소하였다. 그리고 hydroxyproline에서는 모두 non-embryogenic callus로 변하였고, 50% 성장억제 수준은 AEC 대조구와 비슷하였다(Fig. 2).

다. AFLP, RAPD를 이용한 체세포 clone의 분석

(1) Embryogenic callus에 방사선 처리 및 재분화 유도

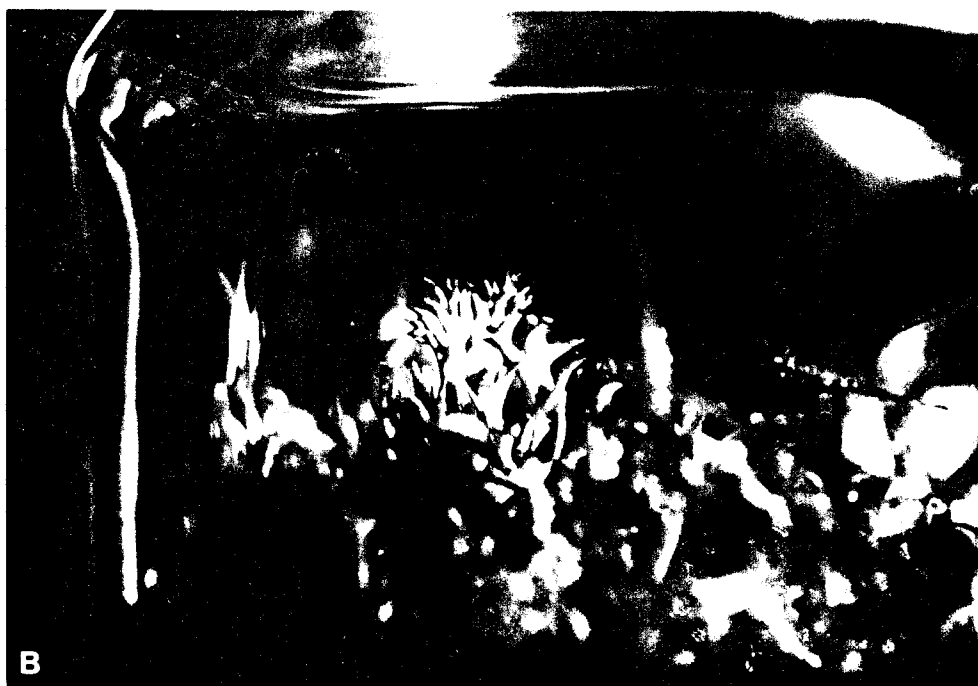
유도된 embryogenic callus를 2mm 정도의 두께로 절단하여 MS 배지에 옮긴 후 방사선을 0, 30, 50, 70, 90, 120 Gy 및 180 Gy을 조사하여 재분화된 식물체를 얻었다. 120 Gy 이상에서는 캘러스만 생성되거나 완전 기형인 개체만 얻었다(Fig.3). Embryogenic callus에 의하여 얻어진 somaclonal variations은 형태적으로 거의 차이가 없었고, 방사선을 조사하여 얻은 재분화 식물체는 절간길이, 절간수, 엽록소결핍, 잎모양, 괴경모양 등 다양한 변이체가 얻어졌다. 특히 White Star의 경우 괴경모양이 정상적인 고구마 모양이 아니고, 나무뿌리처럼 땅속깊이 뻗은 것이 발견되었다(Fig 4). 울미와 White Star의 형태적 차이는 각각 대조구와 비교하여 7~73배 높았다(Table 5, Fig 5-7).

(2) 체세포 clone 특이 밴드의 탐색

AFLP, RAPD 기술의 장점은 시간, 경제적 부담이 RFLP보다 적게 들고, 단 시간에 많은 band 확인이 가능하여, 유전자 다양성, fingerprinting, 연관 지도 체세포 잡종 동정, 종간, 종내 변이체를 확인하는 등 다양한 분야에 유용하게 이용되고 있다. 또한, 이들은 실험결과에 대한 정보를 빠르게 관찰할 수 있고, 상업적으로 판매하는 non-species specific primer의 사용



A



B

Fig 3. Abnormal plantlets formed on MS basal medium.

A: Control plant

B: The calli irradiated above 120 Gy were incapable to regenerate normal plantlets.

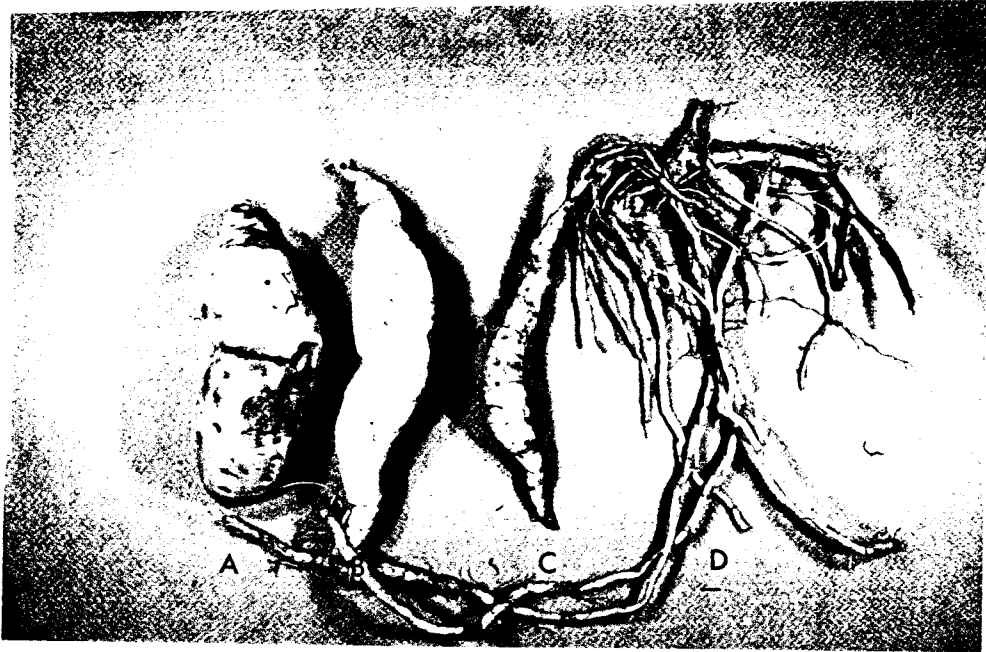


Fig 4. Morphological variation of White Star roots.

A : Control root-tuber B, C, D : Abnormal root shape

Table 5. Morphological variants of sweet potato observed in the regenerated plants derived from gamma-rayed calli

Cultivars	Radiation dose(Gy)	Plants	Total No. of variants				Total	%
			Chlorophyll deficient	Stem color	Leaf type	Plant type		
Yulmi	0	260	1	-	-	1	2	0.08
	30	215	2	-	2	3	7	3.26
	50	65	2	-	-	2	4	6.15
	70	60	1	-	-	2	3	5.00
	90	85	1	1	-	3	5	5.88
White Star	0	175	1	-	1	-	2	1.14
	30	330	1	4	3	2	10	3.03
	50	135	2	3	2	2	9	6.67
	70	185	3	4	4	3	14	7.57
	90	90	1	3	2	1	7	7.78

이 가능하고, 이들 marker를 cloning하여 RFLP probe로 전환이 가능하며, 이와 같은 PCR-based 기술들은 다른 기술과 비교해서 somaclonal variations 찾기가 효과적이다. RAPD 단점은 염기서열의 증폭이 가능한 mutant alleles에서 band를 나타내는데 효과적이지 못하고, 또한 새로운 band의 출현을 나타내는데 효율적이지 못하기 때문에(Vaileria et al., 1997), AFLP를 이용하여 돌연변이를 판단하는데 RAPD의 단점을 보완하였다. Embryogenic callus로부터 재분화되어 토양에 순화된 고구마 중 White Star 15개체, 울미 13개체를 대상으로 AFLP, RAPD 분석을 수행한 결과, primer #B21의 경우 White Star의 방사선 무처리 2번 somaclone은 약 900bp에서 특이 band가 나타났고, 방사선 처리 somaclones은 1.1Kbp, 1Kbp, 900bp 등에서 특이 band가 발견되었다. 울미의 경우 방사선 무처리 somaclones들은 대조구와 polymorphism이 없었고, 방사선 처리 somaclones중에서는 1.7kbp, 1.1kbp에서 차이를 보여주고 있다.

Primer #B44의 경우 White Star의 방사선 처리, 무처리 somaclons들은 대조구와 차이가 없었고, 울미의 방사선 처리 somaclones 중 1, 2번에서 특이 band가 나타나고 있으며, 방사선 무처리 somaclones들은 대조구와 차이가 없었다. 울미의 총 RAPD band 79개중 방사선 처리 somaclones들에서 polymorphism을 나타낸 band는 7개(8.8%)였고, 방사선 무처리 somaclones들은 polymorphism이 없었다. White Star의 방사선 처리 somaclones들은 65개의 RAPD band 중 polymorphism band가 4개(6.1%)였고, 방사선 무처리 somaclones들은 2개(3%)였다. #B22, 31, 46, primer에서는 RAPD를 수행한 모든 somaclonal variations에서 대조구와 비교하여 polymorphism이 나타나지 않았다. #B41 primer에서는 최고 13개의 band가 나타났고, #B45 primer에서는 3개로 가장 적은 band의 수가 증폭되었다.

Williams 등(1991)은 primer 염기의 미세한 차이에 의하여 PCR 결과 양상이 완전한 다르게 나타나며 12개의 염기중 하나만 바뀌어도 RAPD band의 양상은 완전히 다르게 나타난다고 하였으며, Fritsh 등(1993)은 primer에 G+C의 수가 많을수록 DNA 증폭이 매우 유리하게 일어난다고 하였다. #B41 primer (G+C=9)와 #B45 primer (G+C=4)의 band 수 차이는 이러한 이유 때문에 일어난다고 사료된다. AFLP selective primer E1/M1, E1/M2, E1/M3, E1/M4 조합에 의해, White Star, 울미에서 각각 총 336, 348의 band가 나타났다. White Star 대조구와 방사선 비처리군의 somaclones들 사이에서

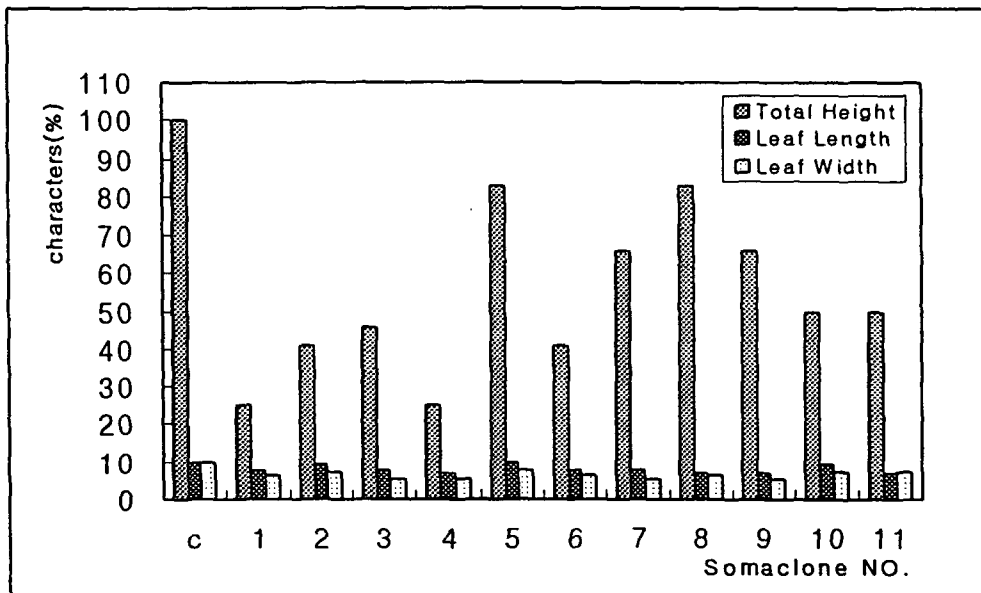


Fig 5. Comparison of phenotypic variation among White Star somaclones. Symbols are somaclone height, length and width. C: Control plant, 1-11: Somaclone plant

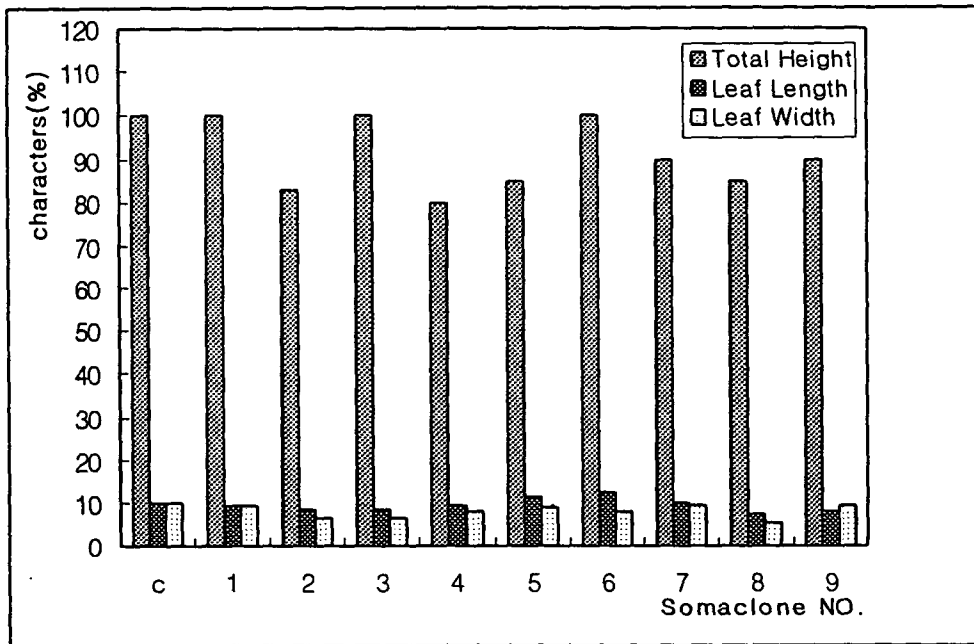


Fig 6. Comparison of phenotypic variation among Yulmi somaclones.
 Symbols are somaclone height, length and width.
 C: Control plant, 1-9: Somaclone plant

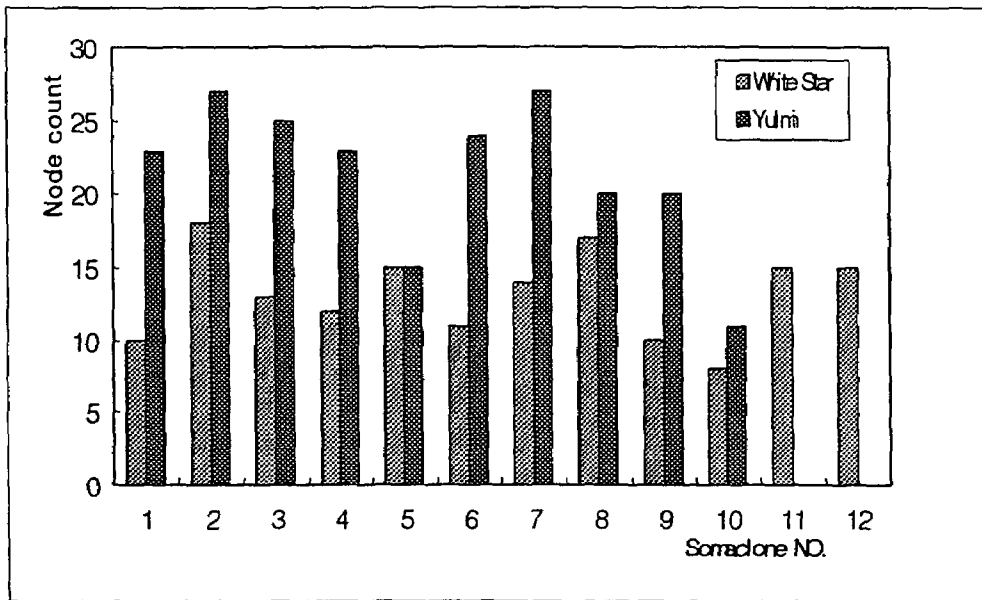


Fig 7. Comparison of node count among White Star, Yulmi somaclones.
 C: Control plant, 1-11: Somaclone plant

polymorphism은 16개(0.04%)였고 대조구와 방사선 처리된 somaclones들 사이에서는 polymorphism이 57개(0.17%)였다. 울미 대조구와 방사선 비처리된 somaclones 사이에서 polymorphism은 20개(0.06%)였고, 방사선 처리된 somaclones들 사이에서 polymorphism은 68개(0.2%)였다(Fig 8, 9).

따라서, 본 연구결과는 고구마에 있어서 조직배양 동안에 발생하는 somaclones variation rate가 *in vitro* mutagenesis을 사용할 경우 방사선 무처리에 비해 White Star에서는 1.6배(RAPD)~3.4배(AFLP), 울미에서는 8.8배(RAPD)~3.3배(AFLP)로 각각 증가한 것으로 보아 방사선을 작물육종에 이용할 경우 직·간접적으로 이용할 수 있는 돌연변이 출현이 높다는 것을 시사한다.

자연상태에서의 돌연변이 빈도는 10^{-4} ~ 10^{-6} 으로 알려져 있고(Yonesawa and Yamagata 1977 ; Brock 1979), 조직배양에 의한 somaclonal variations은 약 0.2~5%정도로 나타났으며(Larkin and Scowcroft, 1981), X-ray(60 Gy)를 이용한 돌연변이 확률은 8.9%까지 발생한다고 보고되고 있다(Kleffel *et al.*, 1986). 그러나 Levall 등(1994)은 callus에 UV 처리하여 얻은 beet 재분화 식물 42개와 50개의 probes를 사용하여 얻은 7,644 bands 중 단 3개 bands(0.03%)에서 polymorphism이 나타났다고 보고하였다.

Wang 등(1993)은 *Lolium*에서 polymorphism을 발견하였고, Munthali 등(1996)은 beet에서 RAPD을 이용한 somaclones polymorphism은 0.05%, isozyme을 이용한 polymorphism은 0.06%, RFLP을 이용한 polymorphism은 0.1%라고 보고하였다. Wang and Tanksley(1989)는 RFLP를 이용하여 벼 somaclonal variations에서 26%의 이질성(heterogeneity)을 보고하였다.

그러나 Shoyama 등(1997)은 인삼의 RAPD band에서 polymorphism을 찾지 못하였으며, Valles 등(1993)은 RAPD 기술을 이용하여 *Lolium*, *Festuca* 재분화체에서 variants를 찾지 못했고, Isabel 등(1993)은 *Picea* 재분화 식물의 900 RAPD band 중 polymorphism을 발견하지 못했다. Devaux 등(1993)은 *Hordeum* somaclonal variations을 이용하여 273 RFLP, 89 RAPD marker(total scored for RFLP=16,380 and for RAPD=5,340) 중 단 하나의 polymorphism도 찾지 못했다. 이상 문헌의 결과와 본 논문의 결과를 비교해 보면 *in vitro* mutagenesis가 작은 공간에서 연중 돌연변이 창성에 유용한 것으로 사료되어 다른 작물에서도 적용이 가능하리라 생각된다. Muller 등(1990)은 벼 somaclonal variations 의 RFLP 결과 DNA rearrangement와

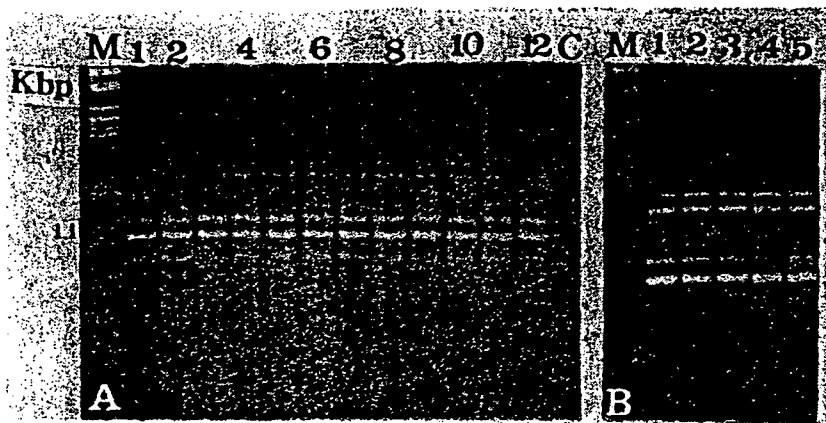


Fig 8. RAPD analysis in somaclones of sweet potato using wako random primres #B44.
 A : Radiated somaclones, B ; Non-radiated somaclones
 M : DNA size maker(Lamda DNA+ *pst 1 + Hind III*)
 C : Control (no genomic DNA)
 I : White Star control, 2-12 ; Somaclones(A) 2-5 ; Somaclones(B)
 Arrow indicate the specific band.

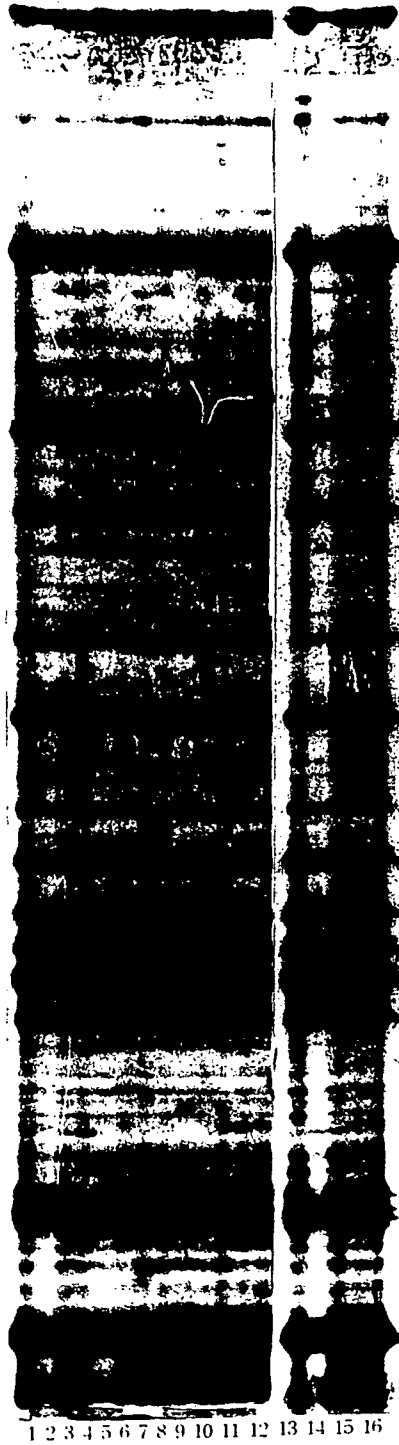


Fig. 9 The DNA fingerprints were generated using primer pair E1 + E2 to amplify genomic fragments from White Star
1 : control, 2-12 : Irradiated somaclonal variation
13-16 : Non-irradiated somaclonal variation

methylation이 존재한다는 결과를 보고하였지만, DNA polymorphism과 표현형 사이의 관계를 결론 내리지 못하였다. Brown 등(1993)은 *Triticum somaclonal variations*이 RAPD band에서 polymorphism이 나타나지만 표현형에서는 polymorphism이 나타나지 않았다고 보고하였다.

이와 같이 somaclonal families가 RAPD band에서는 polymorphism이 나타나지만 표현형에서 차이가 없다고 Devos and Gale (1992)이 밑에서 보고하였다. 그 이유는 1) highly repeated sequence DNA 부분에 많은 비율의 RAPD locus가 분포하고 있고 2) PCR의 반응에 의해 나타나는 RAPD band가 실제로 high copy sequence이기 때문이며 3) 전사단계에서 DNA 불활성화 등이 표현형 변이를 유발하지 못한다고 하였다. 또한, non-coding sequences에 변화가 생긴 silent mutation과 같은 것은 단기적으로 phenotype에 영향을 끼치지 않는다고 사료된다.

확실하지는 않지만 somaclonal variations에서 polymorphism이 발견된 문헌 중 90% 이상이 잠재적 mutagen인 2,4-D를 사용하였으며, polymorphism이 나타나지 않은 것은 2,4-D외 다른 호르몬을 사용한 것으로 보아 2,4-D가 염색체, DNA 안전성에 영향을 주지 않나 사료되고 계대배양 기간도 유전형 및 표현형 변화의 관여인자로 생각된다. 한편 본 실험에서와 같이 고선량의 방사선을 이용하여 돌연변이 유기에 이용하기도 하지만 저선량의 방사선을 이용하여 식물에서 성장촉진등 다양한 곳에 이용할 수 있다.

실제로, 포도에서 embryogenic callus 유도가 3~4개월 정도 소유되지만 저선량(10 Gy)에서는 embryogenic callus가 2주만에 유도되었다고 보고하였다(Vaileria et al., 1997).

고구마와 같은 서류작물은 곡류와 두류에 비해 필수아미노산이 전무한 상태이므로 영양적 가치가 낮아 식용 및 가공용으로 활용하는데 문제가 있어 이러한 단점을 개선하고자 lysine analogue 계통인 AEC를 사용하여 재분화 식물체를 얻었고, 내염성을 증진시키고자 proline analogue 계통인 hydroxyproline에서는 non-embryogenic callus로 모두 변하여 식물체를 얻지 못했다.

본 연구에서 탐색한 특이 AFLP, RAPD marker의 염기서열 분석이 이루어질 경우, RAPD marker와 표현형상의 차이를 나타내는 유전자와의 관련성 여부가 밝혀질 수 있을 것이다. 또한, in situ hybridization을 이용하여 이들 marker의 염색체상의 위치를 밝히고, 체세포 클론 변이체와 정상개체의

Table 6. Effects of NaCl concentration on the growth of survived rice callus on the medium supplemented with NaCl concentration

NaCl Con(%)	Cultivars	No. of inoculated seeds	No.of survival	Callus induction from seeds
0	Kancheog	160	159	++++
	Dongjin	160	160	++++
	Odae	160	154	+++
0.75	Kancheog	160	148	+++
	Dongjin	160	155	+++
	Odae	160	121	+
1	Kancheog	160	116	++
	Dongjin	160	143	++
	Odae	160	97	+
1.25	Kancheog	160	30	-
	Dongjin	160	87	+
	Odae	160	3	-
1.5	Kancheog	160	1	-
	Dongjin	160	5	-
	Odae	160	0	=

a: Callus induction from seeds was investigated in 40 days after culture to NaCl (++++:Very good, +++:Good, ++:Fair, +:Poor, -:Very poor and =:None)

Table 7. Effects of radiation dose of growing callus on the medium supplemented with NaCl concentration

Radiation Dose (Kr)	Cultivars	Survival rate of callus to NaCl					
		1%		1.25%		1.5%	
		A	B	A	B	A	B
0	Dongjin	30/150	8/20	25/150	4/20	15/150	2/20
	Kancheog	27/150	5/20	21/150	3/20	9/150	2/20
	Odae	26/150	2/20	19/150	1/20	0/150	0
3	Dongjin	78/150	17/20	63/150	8/20	20/150	5/20
	Kancheog	77/150	16/20	59/150	3/20	12/150	4/20
	Odae	69/150	4/20	50/150	1/20	1/150	0
5	Dongjin	54/150	19/20	51/150	7/20	14/150	2/20
	Kancheog	52/150	16/20	48/150	4/20	12/150	1/20
	Odae	46/150	6/20	38/150	1/20	0/150	0
7	Dongjin	33/150	15/20	21/150	5/20	8/150	1/20
	Kancheog	25/150	11/20	17/150	3/20	5/150	1/20
	Odae	20/150	2/20	14/150	1/20	0/150	0
9	Dongjin	18/150	7/20	12/150	4/20	3/150	1/40
	Kancheog	19/150	5/20	10/150	2/20	2/150	1/40
	Odae	15/150	1/20	6/150	0/10	0/150	0

A: Number of initial callus was 150 and estimated survival callus in 40 days culture.

B: Number of initial callus was 150 and estimated survival callus in 150 days culture.

게놈 DNA와의 genomic subtraction(Straus *et al.*, 1990)을 이용한다면 체 세포 클론 변이원의 추적에 AFLP, RAPD marker의 이용 가능성이 더욱 확실해질 수 있을 것이다.

이 문제는 앞으로 수행해야 할 과제라고 생각되며, 고구마와 같이 영양번식하는 작물의 삽목 및 괴경에 방사선을 이용하여 돌연변이 유기가 가능하지만, 재료의 부피가 커서 다루는데 제한이 따르고, 또한 하나의 괴경 및 줄기에서도 돌연변이 sector가 다르게 나타나 여러 세대를 선발해야 하는 어려움이 있다. 그러나 embryogenic callus를 이용한 식물체 재분화는 거의 단일세포에서 유래하기 때문에 위에서 언급한 단점을 보완할 수 있다고 사료되며, 고구마를 포함한 다른 영양번식 작물의 육종에 방사선 처리 somaclonal variations을 이용한다면 고전육종 방법의 좋은 대안이 될 것이라 사료된다.

2. 수도 NaCl 저항성 계통의 선발

가. 캘러스 유기 및 캘러스 생육에 미치는 NaCl의 영향

캘러스는 벼종자를 2,4-D 2ppm이 포함된 N6 배지에 치상한 후 4주만에 유기하였고 한 번의 계대배양을 통하여 증식 하였다.

염이 있는 배지에서 종자의 캘러스 유기정도를 알기 위하여 NaCl 농도별(0, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5% NaCl)로 종자를 치상하여 캘러스형성상태를 조사한 결과는 table 6과 같다. 오대벼 종자는 1% NaCl에서 캘러스 형성이 저조하였으며 1.5%에서는 모두 치사하여 캘러스가 형성되지 않았고 품종별로는 동진 > 간척 > 오대벼 순위로 나타났다. 내염성 캘러스의 선발을 목적으로 벼 캘러스가 어느 수준의 염농도 처리까지 생육할 수 있는가를 조사하기 위하여 0, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75% NaCl을 배지에 각각 첨가시켜 40일 배양 후 캘러스의 생존율을 측정하였던 바, 그 결과는 Fig.10과 같았다. 1%이상의 농도에서는 캘러스 생육이 급격히 억제되었고, 오대벼는 1.5%이상에서는 생존한 캘러스가 없었고, 동일 농도에서 동진과 간척은 생존율이 비슷하였다. 그리고 캘러스 생장은 품종에 따라 약간 차이가 나는데 무염이나 염이 있든 간에 동진과 간척은 비슷하면서 오대벼보다는 좋은 것으로 나타났다.

NaCl 적정 선발 농도를 LD90으로 감안할 때 1.5%에서 동진, 간척, 오대벼

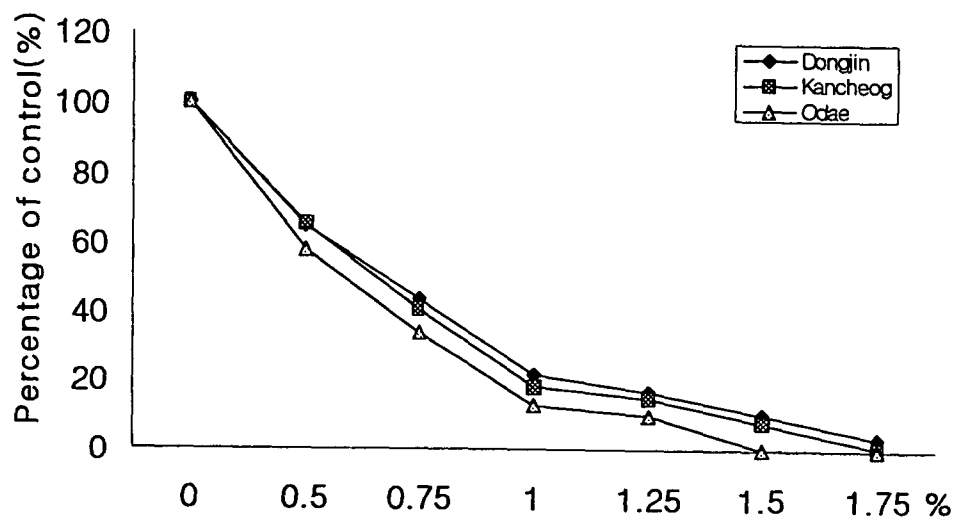


Fig 10. Effects of NaCl concentration on the survival ratio on rice callus for 40 days after culture.

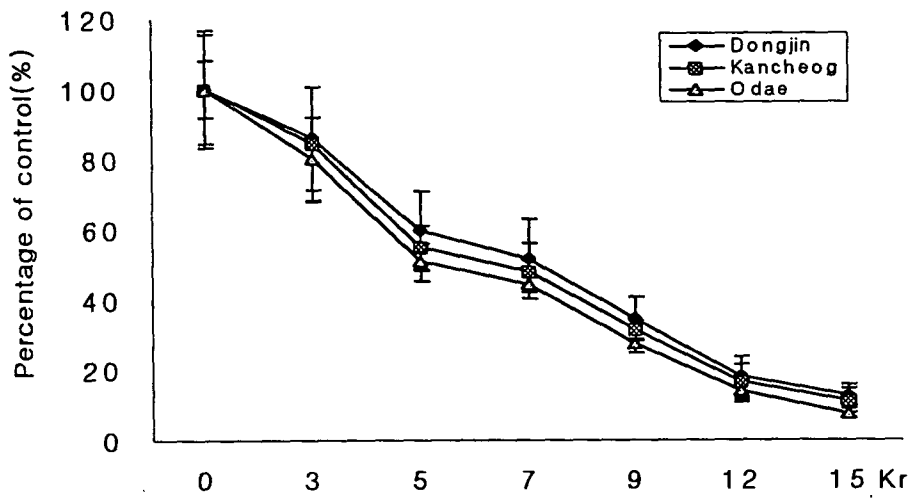


Fig 11. Effect of gamma-ray on the growth inhibition of callus in rice for 40 days after culture.

생존율이 각각 10과 8.0%로 나타나 벼 캘러스를 이용한 NaCl적정 선발 농도는 1.5%임을 알 수 있었다. NaCl이 첨가된 배지에서의 캘러스 생존이 저조한 경향은 Croughan. *et. al*(1978), Rangan and Vasil(1983), Ben-Hayyim *et. al*(1985)의 보고와 일치하였다.

NaCl은 캘러스 및 식물체의 모든 부위에 발육 억제 및 치사를 일으키는데, 이러한 NaCl 피해는 이온자체의 독성과 이온으로 인한 낮은 삼투 potential에 의한 해로운 영향으로 사료된다. 그리고 내염성 캘러스의 선발을 위한 NaCl농도는 종(種) 및 연구자에 따라 상이하여 담배의 경우, 200mM(Watad *et. al*, 1983), 벼는 1.5%(Croughan *et. al*, 1981), 200mM(Kishor, 1988), 고추는 1%(Dix and Street, 1975), 오렌지는 1%(Kochba *et. al*, 1982)에서 각각 선발하였다.

나. 캘러스 생육에 대한 γ -ray의 효과

벼 캘러스에 γ -ray를 조사하여 NaCl 저항성 변이체를 유도하기 위하여 벼 캘러스의 방사선 감수성을 조사하였는데 그 결과는 Fig 11와 같았다. 선량이 높아짐에 따라 생체중은 감소하였고 3, 5, 7, 9KR까지는 동진이 간척, 오대벼보다 생체중이 조금 증가하였지만, 고선량인 12, 15KR에서는 동진, 간척은 생체중이 비슷하였고 오대벼 보다는 조금 우세하였다. 7, 9KR에서는 동진이 오대벼보다 생체중이 각각 약 5% 증가하는 경향이 나타났다. 돌연변이 유기적정선량을 LD50~LD70임을 감안할 때 7KR에서 동진, 간척, 오대벼 생존율이 53과 49, 48%, 9KR 조사구에서는 35, 33, 30%로 나타나 벼 캘러스를 이용한 변이 유기적정 조사선량은 7~9KR임을 알 수 있다.

다. NaCl 저항성 세포주 선발

실제로 γ -ray를 이용하여 내염성 캘러스를 얻기 위해 NaCl 농도를 1, 1.25, 1.5%로 나누고 γ -ray를 0, 3, 5, 7, 9KR로 각각 처리하여 40일 후에 생존율을 조사하였는데 그 결과는 Table 7와 같다. NaCl과 γ -ray 조합처리에서 생존율은 동진 > 간척 > 오대벼 순이었다. 오대벼는 1.5% NaCl 대조구에서 생존한 캘러스가 하나도 없었지만 3KR 방사선 처리구에서 1개의 생존한 캘러스가 있었다. 그러나 150일 후에는 치사하였다. 그리고 5KR 이상의 방사선 처리구에서는 생존한 캘러스가 하나도 없었다. 1, 1.25% NaCl에서는 대체로 3품종 모두 3, 5KR 선량에서는 대조구보다 생존율이 높았고 7KR에서

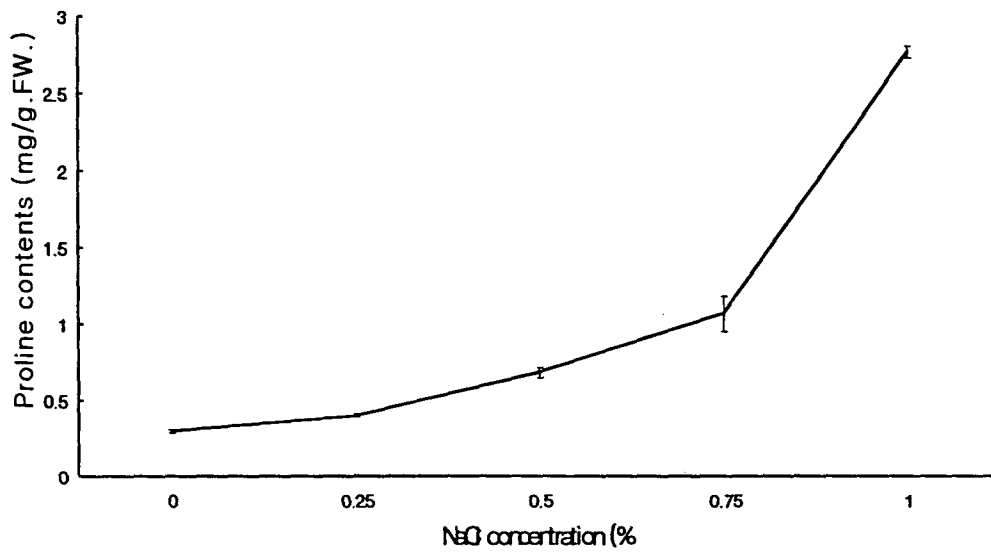


Fig. 12. Effects of NaCl on the contents of free proline in rice callus for 4 months after culture. The values are means of three replicates.(30 calli per plate).Values= \pm (SE)

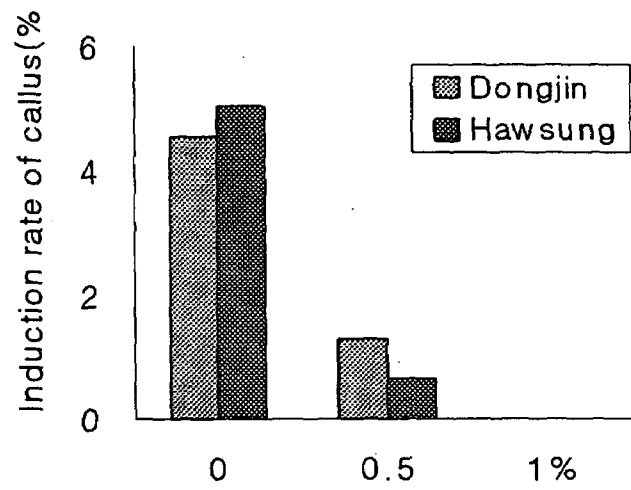


Fig 13. Induction of callus from rice anthers on the medium containing NaCl for 50 days after culture.

대조구와 비슷하거나 조금 낮았으며, 9KR에서는 생존율이 낮아졌다. 이러한 경향은 1% NaCl 보다 1.5% NaCl에서 차이가 심하게 나타났다. 캘러스의 NaCl 저항성 기작은 생리적 적응인 후생적 변이와 유전적 변이가 나타나는데 후생적 변이를 제거하고 진정한 유전적 변이가 발생한 캘러스만을 선발하기 위해서는 방사선과 같은 돌연변이원의 사용이 요구된다.

라. 계대배양에 의한 내염성 캘러스의 영속성

선발된 캘러스가 지속적으로 내염성을 나타내는지 알기 위하여 Table 7A에서 얻은 것은 각각 농도에서 150일 동안 유지한 후 생존율을 조사하였던 바 Table 7B와 같은 결과를 얻었다. 1% NaCl에서 동진, 간척은 대조구보다 방사선 조사구 3, 5, 7KR에서 생존율이 2배정도 높았다. 그러나 1.25% NaCl에서 동진은 대조구보다 3, 5, 7KR조사구에서 생존율이 높았지만 간척에서는 비슷하였고 오대벼에서는 극히 일부만 생존하였다. 1.5%에서 오대벼는 대조구와 방사선 처리구에서 모든 캘러스가 치사하였고 동진이 간척보다 생존율이 조금 우세하였다. 1, 1.25, 1.5% NaCl 모든 농도에서 동진 > 간척 > 오대벼 순으로 생존율이 조사되었다.

Lee et al(1998)은 식물체에서 간척 > 동진 > 오대벼 순으로 내염성 정도를 판정하였는데 동진, 간척만을 보면 본 결과와 상반되었다. 이는 캘러스와 식물체의 내염성 기작이 다르다는 것을 시사한다.

마. 내염성 캘러스 및 재분화체의 proline 함량 측정

식물의 아미노산은 식물체내의 대사중 단백질 합성과 분해 및 식물 기관간의 수송과정이 정상 상태를 이룬 결과라고 하였다(Mezu-Basso et. al, 1986). 따라서 아미노산 함량이나 조성은 식물의 생리적 특성이나 발달단계 및 환경요인의 영향을 크게 받는다.

0, 0.25, 0.5, 0.75, 1% NaCl에서 생존한 동진벼의 캘러스를 1g씩 회수하여 proline 함량을 측정한 결과는 Fig 12와 같다. proline 함량은 NaCl 농도가 증가할수록 증가하였고, 0.75%에서 급격히 증가하여 1% NaCl에서는 대조구의 8배까지 증가하였다. Watad 등(1983)도 선발된 담배 세포에서 염의 농도가 증가하면 proline 함량이 증가하였다고 보고하였다.

1% NaCl에서 선발된 캘러스를 재분화 배지에 옮긴 4개월 후에 캘러스를 회수하여 proline을 측정한 결과 대조구보다 5배 증가함을 알 수 있었다

Table 8. Comparison of free proline contents of control callus, salt tolerant callus 1^a and salt tolerant callus 2^b

Items	Proline contents (mg/g. F.W.)
Control callus	0.32 (\pm 0.01)
Salt tolerant callus 1 ^a	1.61 (\pm 0.06)
Salt tolerant callus 2 ^b	2.76 (\pm 0.04)

The values are means of three replicates. Values=Means \pm (SE)

a; Selected salt tolerant callus cultured on regeneration medium for 4 months

b; Selected salt tolerant callus cultured on section medium containing 1.0% NaCl

Table 9. Compared control calli with NaCl tolerant calli cultured on regeneration medium for 4 months to revival on medium containing 1% NaCl

Calli sources	No. of inoculated calli	No. of survival calli	Survival rate of calli(%)
Control calli	150	31	20.7
Salt tolerant calli	150	128	85.3

(Table 8). 그리고 4개월간 NaCl 무첨가배지(재분화배지)에서 성장한 캘러스를 1% NaCl배지에 배양하였던 바, 정상 캘러스는 80%까지 치사하였지만 내성캘러스는 85%까지 성장하였다(Table 9). 이와 같은 결과로 내염성이라고 선발한 캘러스는 진정한 유전적으로 변이된 캘러스만 존재하는 것이 아니라 염이 없는 배지에서는 내염성이 상실되는 후생적 변이도 같이 존재한다는 것을 시사한다.

Chae 등(1990), Lerner(1985), Reddy와 Vaidyannayh(1986), Reinold 등(1984), Treichel(1986), Heu 등(1994)은 세포가 염분에 노출되었을 때 세포내에는 proline 함량이 증가되며, 이 proline 축적은 유전적 조절에 의한다고 하였고, proline 축적량으로 내염성 세포주를 선발할 수 있다고 하였다. 그리고 무염배지에서 3번 또는 그 이상 계대배양한 후에도 내성이 소실되지 않고 유지되었다는 보고가 있다(Dix and Street, 1975; Rangan and Vasil, 1983; Pandey and Ganapathy, 1984).

바. 약에서 캘러스 유기 및 NaCl 저항성 캘러스 선발

동진, 화성 약을 NAA 2PP이 포함된 N6배지에 치상한 결과와 0.5, 1% NaCl 이 포함된 N6배지에서의 캘러스 유기율은 Fig 13과 같다. 화성이 동진 벚가 캘러스 유기율이 조금 높았으나 0.5% NaCl 이 포함된 배지에서는 동진이 화성보다 2배정도 높았고 1% NaCl에서는 두 품종은 모두 캘러스가 유기되지 않았다. 두 품종간에 동진이 화성보다 내염성이 높다는 것을 알 수 있다.

NaCl이 포함되지 않은 N6배지에서 유기된 동진, 화성 캘러스를 1mm크기로 절단하여 1% NaCl 이 포함된 N6배지에 치상한 후 방사선을 0, 3, 5, 7, 9, 12, 15KR조사한 다음 40일 후 생존율을 조사한 결과는 table 10과 같다. 동진이 화성보다 전체적으로 생존율이 높았고 15KR에서는 동진은 한 개가 생존하였으나 화성에서는 생존한 캘러스가 없었다. 100일 후에는 동진, 화성 모두 12KR 이상에서는 생존한 캘러스가 없었으며 3, 5KR에서는 동진이 화성보다 생존율이 높았고 7, 9KR에서는 비슷하였다.

사. 배 내염성 캘러스로부터 식물체 재분화

NaCl 저항성 캘러스에서 식물체로의 재분화를 위하여 BAP(2ppm)+와 NAA(0.5ppm)가 첨가된 MS 배지(salt free)에 옮겨 재분화 한 결과는 Table

Table 10. Effects of radiation dose of growing anther callus on the medium supplemented with 1% NaCl concentration

Radiation Dose (Kr)	Cultivars	1% NaCl	
		A	B
0	Dongjin	18/150	5/20
	Hawsung	12/150	3/20
3	Dongjin	55/150	12/20
	Hawsung	47/150	11/20
5	Dongjin	38/150	8/20
	Hawsung	29/150	5/20
7	Dongjin	19/150	4/20
	Hawsung	11/150	3/20
9	Dongjin	7/150	3/20
	Hawsung	3/150	1/20
12	Dongjin	3/150	0/5
	Hawsung	1/150	0/5
15	Dongjin	1/150	0/5
	Hawsung	0/150	0

A: Number of initial callus was 150 and estimated survival callus in 40 days culture.
 B: Number of initial callus was 150 and estimated survival callus in 100 days culture

Table 11. Plants regeneration from the selected calli on the NaCl medium

Dose (Kr)	Cultivars	No. of regenerated plants		
		1% NaCl	1.25% NaCl	1.5% NaCl
0	Dongjin	4	5	0
	Kancheog	4	5	0
	Odae	0	0	0
3	Dongjin	7	6	0
	Kancheog	5	3	0
	Odae	0	0	0
5	Dongjin	7	5	0
	Kancheog	5	9	0
	Odae	2	0	0
7	Dongjin	2	5	0
	Kancheog	7	16	0
	Odae	3	0	0
9	Dongjin	10	6	0
	Kancheog	9	14	0
	Odae	2	0	0

11와 같다. 오대벼는 1% NaCl의 5, 7, 9KR 처리구에서 각각 2, 3, 2 개가 재분화되었고 1.25% NaCl에서는 재분화 개체가 없었다. 동진과 간척은 1, 1.25% NaCl의 모든 방사선 처리구에서 재분화 개체를 얻었으며 총 재분화 개체는 동진이 84, 간척이 77, 오대벼는 7개로 가장 낮았다. 그러나 1.5% NaCl이 방사선 처리구에서는 재분화되지 않았다.

NaCl이 식물체의 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 MS 재분화 배지에 NaCl(0.5, 1%)을 첨가시켜 캘러스를 배양한 결과, 염농도가 증가함에 따라 분화 등이 저하되어 1%NaCl이 첨가된 배지에서는 2개의 식물체를 얻었다(Table 12). 이와 같은 결과로 캘러스 내에 지나친 NaCl의 축적은 재분화에 영향을 주는 것으로 사료된다. 재분화 식물체 0.5% 1%NaCl에서는 각각 3개월 2개월까지 생존하였다. Nabor등 (1980)은 NaCl내성 캘러스를 NaCl이 첨가된 배지에 배양시 재분화가 매우 제한되고 NaCl은 개화 및 종자 결실에도 심각한 영향을 끼친다고 하였다. 또한 Yosida등 (1983)도 벼에서 비슷한 결과를 보고하였다.

또한 1% NaCl에서 캘러스를 5개월, 11개월간 각각 유지한 다음 재분화한 결과는 Table 13과 같은데 5개월간 NaCl에서 유지한 것은 재분화 개체를 13개 얻을 수 있었지만 11개월 유지한 캘러스에서는 green spot은 11개 얻었지만 재분화 식물체는 단 1개 얻었다.

이와 같은 결과는 캘러스 기간이 길수록 분화 등이 저하되고 또한 Na^+Cl^- 이온의 과다축적이 캘러스의 재분화 능력을 저하시킨다고 사료된다. 생성된 식물체는 1/2 MS배지에 옮겨 완전한 식물체로 분화시킨 수 온실에서 충분히 순화한 다음 일반포장에 정식하였다.

아. 약 내염성 캘러스에서 재분화

NaCl 저항성 캘러스를 IAA(0.2ppm)+Kinetin(1ppm), Kinetin(4ppm)+NAA(1ppm), Kinetin(2ppm)+NAA(1ppm)이 들어있는 N6배지에 각각 치상한 결과는 Table 14과 같다. 동진 캘러스는 3조합모두에 green 식물체는 얻지 못하였고 albino만 얻었으며, 화성 내염성 캘러스는 2번 조합에서 1개 식물체와 3번 조합에서 2개 식물체를 얻었다. 그리고 0, 3, 5KR 선량에서는 화성, 동진 모두 식물체를 얻지 못하였고 7, 9KR에서는 화성은 각각 1, 2개 녹색 식물체를 얻었으나 동진은 녹색 식물체를 얻지 못하였고 albino 식물체만 형성되었다(Table 15).

Table 12. Number of plant regenerated from the selected calli on medium with NaCl for two months culture

NaCl treatment	No. of petridish	No. of plants	Average(%) per petridish
Non-NaCl	20	45	2.25
0.5%	20	8	0.4
1.0%	20	2	0.1

Table 13. Number of plant regenerated from control and tolerant calli after 5 months and 11 months culture

Callus sources	No. of inoculated calli	Green spot	Plants
1	150	79	32
2	150	31	19
3	150	27	13
4	150	11	1

1: Control calli after 5 months, 2: Control calli after 11 months.

3; NaCl tolerants calli after 5 months, 4: NaCl tolerants calli after 11 months.

Table 14. Effect of hormone combination to regeneration from the selected anther calli on the NaCl medium

Hormone combination	No. of inoculated calli	Green spot		Plants		Albino	
		Dong jin	Haw sung	Dong jin	Haw sung	Dong jin	Haw sung
1	210	40	39	0	0	7	8
2	210	31	92	0	2	5	7
3	210	31	35	0	1	4	5

1, IAA(0.2mg/L)+Kinetin(1mg/L); 2, Kinetin(4mg/L)+NAA(1mg/L); 3, Kinetin(2mg/L)+NAA(1mg/L)
 Regenerants counted in two months culture.

Table 15. Plants regeneration from the selected anther calli on the NaCl medium

Dose (Kr)	No. of inoculated calli	Green spot		Plants		Albino	
		Dong jin	Haw sung	Dong jin	Haw sung	Dong jin	Haw sung
0	150	15	21	0	0	15	21
3	150	19	20	0	0	19	20
5	150	15	17	0	0	15	15
7	150	17	18	0	1	14	13
9	150	13	15	0	2	12	10

Regenerants counted in two months culture

Table 16. Variations of plants regenerated from NaCl tolerant calli

Variants	
Number	Type
1	Normal-like leaf type
2	Narrow leaf type
3	Wide leaf type
4	White stripe leaf type
5	High plant height
6	Small plant height
7	Awned seed
8	Partial fertility
9	Complete sterility
10	Rouge

자. M₀ 재분화 식물체 내염성 정도 및 특성 조사

대조구와 내염성 캘러스에서 재분화된 식물체를 30개씩 임의적으로 선발하여 0, 0.5, 1% NaCl이 함유된 배지에서 10주간 배양한 결과는 Fig 14, 15와 같다. 0% NaCl 배지에서는 대조구와 내염성 식물 모두 잎이 갈변한 것은 하나도 없었고, 0.5% NaCl 배지에서 6개의 대조구 식물체는 잎이 부분적으로 갈변하였고, 2개는 잎이 전체적으로 갈변하였다. 그리고 1% NaCl 배지에서는 대부분이 고사 하였다. 그러나 내염성 캘러스에서 재분화된 식물체는 0.5, 1% NaCl에서 대조구보다 생육이 양호하였는데 0.5%에서는 잎이 전체적으로 갈변한 것은 없었고, 1% NaCl 에서도 잎이 전체적으로 갈변한 것은 대조구에 비하여 매우 감소하였다. 선발된 내염성 캘러스에서 재분화한 식물체의 외적인 형태적 특성은 Table 16과 같이 구분하였다. 정상의 잎 모양인주, 잎의 폭이 좁고 진한 녹색인주, 잎의 폭이 넓고 연한 녹색인주, 잎위 한쪽 부위가 흰줄이 있는 주, 초장이 길고, 짧은 주, 열성인 묘, 종자에 까락이 있는 것, 붙임율이 낮은 것에서 높은 변이주등으로 구분할 수 있었다. 붙임율은 4.46% ~99.7%까지 다양하였고, 까락이 형성된 종자는 (대조구는 까락이 없음) 종자 알이 대조구보다 컸다.

3. 영양 요구성 세포주 선발

가. 5-methyltryptophan (5MT) 저항성 세포주 선발

(1) 벼 성숙배를 이용한 5-methyltryptophan 저항성 선발

영양적으로 품질을 향상시키기 위해 amino acid analogue 저항성 선발은 육종가들의 목표였고, 여러 amino acid analogue들이 사용되어 왔다. 그 중 tryptophan analogue 5-methyltryptophan(5MT) 저항성 선발은 그 동안 많이 보고된 바 있으며(Widholm 1972; Widholm 1978; Ranch et al. 1983; Lee & Kameya 1991; Kang & Kameya 1995), 또한 벼 품종을 이용한 5MT 저항성 선발의 예도 많이 보고되고 있는데, Lee H.Y. & Kameya T.(1991)는 ethylen imine(IE)를 이용해 5MT에 대한 돌연변이 저항체를 선발하였고, Schaeffer G.W. & Sharpe F.T.(1981)는 S-(2-aminoethyl)-L-cystein 저항성 세포주를 선발한 바 있다. 따라서, 국내 벼 품종인 동진벼·동안벼·자광

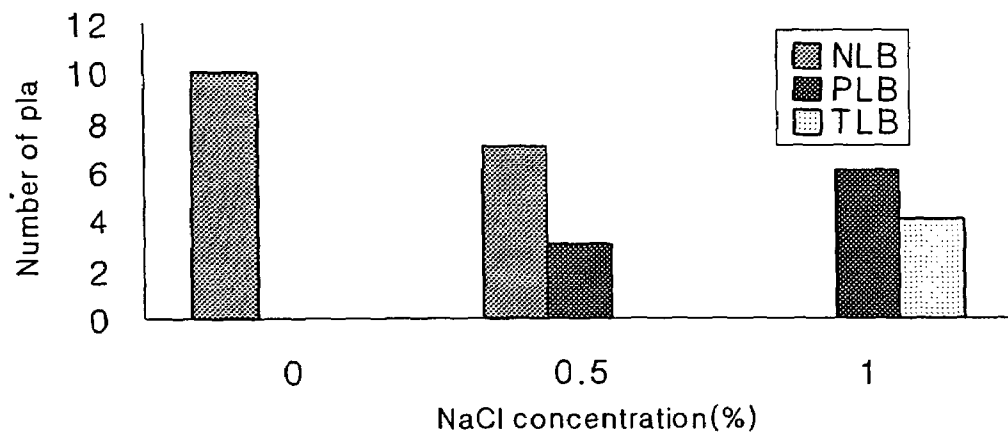


Fig 14. Degree of leaves death of regenerated plants derived from NaCl tolerants calli on modium containing NaCl after ten weeks culture. NLB: no leaf burn, PLB: partial leaf burn, TLB: total leaf burn

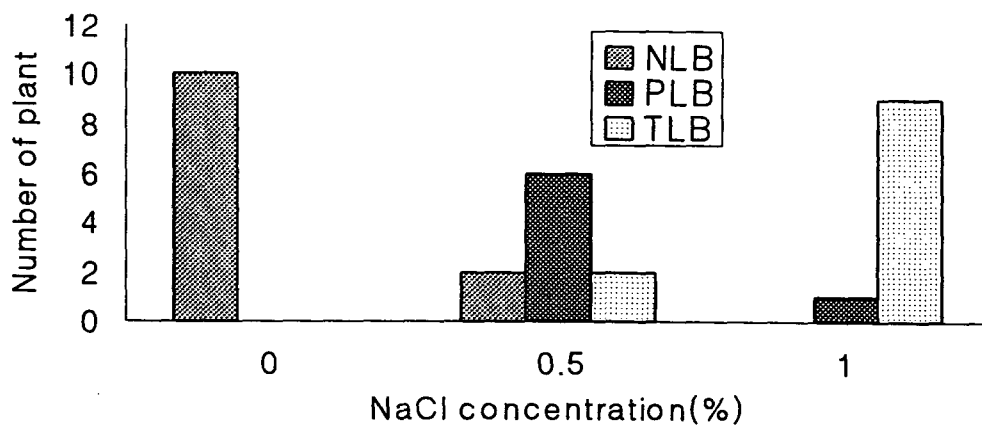


Fig 15. Degree of leaves death of control plants on modium containing NaCl after ten weeks culture.

NLB: no leaf burn, PLB: partial leaf burn, TLB: total leaf burn

Table 17. Free proline contents in rice seedling regenerated from salt tolerant callus. The values are means of three replicates. Values=Means \pm (SE)

NaCl tolerant lines	Proline content ($\mu\text{g/g}$. F.W.)
Control	117.0 \pm 7.93
ST # 1	375.2 \pm 13.96
ST # 2	343.3 \pm 10.14
ST # 3	362.3 \pm 11.61

도(야생벼)등 3품종의 종자를 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1mM 5MT를 함유한 N6 선택배지에 치상하여 캘러스를 유기시킨 결과, 5MT의 함량이 증가할수록 생성된 캘러스 수는 크게 감소하였고 캘러스 상태도 3품종 모두 5MT가 없는 처리구(대조구)에서는 캘러스 생성율이 90%내외로 매우 좋았고, 특히 동안벼는 100%의 생성율을 보였으나 0.5mM 5MT 처리구에서는 대조구에 비해 캘러스 생성율이 급격히 저하되어 1mM에서는 생성율이 거의 0%에 가까웠다. 동진벼는 3품종 중 캘러스 생성율이 가장 양호하였는데, 0.75mM 5MT 처리구에서도 캘러스 생성율이 동안벼, 자광도에 비해 각각 14배, 2.5배 높았으며 캘러스 상태도 양호하였고, 1mM 5MT 처리구에서도 캘러스 생성수가 다른 두 품종에 비해 많았다. 자광도는 동진벼와 동안벼의 중간 정도 캘러스 생성율을 보였다(Table 18).

변이체 선발을 위한 돌연변이 유발원으로는 EI(Lee & Kameya 1991)와 EMS(Kang & Kameya 1995)등 여러 가지 화학적 요소와 x-ray, 자외선, UV, α -particle등이 있는데, 본 실험은 γ -ray를 사용하였다. Gamma-ray를 각각 non, 5, 10, 15, 20, 25, 30KR 처리한 동진벼의 종자를 0.75mM 5MT를 함유한 N6 선택배지에 치상하고 40일간 배양한 결과 15KR γ -ray를 처리한 종자로부터 캘러스 생성율은 50%이상으로 다른 선량에 비해 높게 나타났고, 10KR > 대조구 > 5KR 순이었다. 캘러스 상태는 대조구(non-irradiation)가 가장 좋았고 선량이 증가할수록 불량해지는 것을 확인할 수 있었다. 종자 치상일로부터 70일 경과 후 생성된 캘러스 중 일부가 갈변하여 생존율이 크게 떨어졌는데, 10KR 처리구의 캘러스를 제외한 전체 처리구의 캘러스 감소율이 40일 경과대비 60~70%에 이르렀고 그중 5KR 처리구 캘러스 감소율이 75% 이상으로 가장 크게 나타났다(Table 19).

70일 경과후 생존한 캘러스의 clone을 하나의 lane으로 삼아 1mM 5MT 선택배지에 계대배양하였던 바, 전체 생존 캘러스 수에 있어서는 15KR 처리구에서 가장 높게 나타났지만, 감소율은 20KR 처리구가 34.15%로 가장 낮았고 25KR, 30KR 처리구는 감소율이 각각 72.73%와 72.00%로 높게 나타났다.

생체중에 있어서는 대조구(non-irradiation)가 가장 높아 캘러스 상태가 가장 양호한 것으로 나타났고 10KR, 15KR 처리구도 양호하였으나 생존 캘러스 lane수의 감소율이 가장 컸던 25KR, 30KR 처리구가 clone당 생체중 역시 가장 낮게 나타났다(Table 20).

Table 18. Effect of 5-methyltryptophan(5MT) concentration on the growth of survived rice callus on the medium supplemented with 5MT concentration

5MT Conc (mM)	Cultivars	No. of inoculated seeds	No. of survival callus	Development levels of callus
0	Dongjin	180	174	+++ [†]
	Dongan	180	180	+++
	Jakwang	180	159	+++
0.25	Dongjin	180	86	+
	Dongan	180	79	+
	Jakwang	180	69	++
0.50	Dongjin	180	52	+
	Dongan	180	13	-
	Jakwang	180	41	+
0.75	Dongjin	180	41	+
	Dongan	180	3	-
	Jakwang	180	18	-
1.00	Dongjin	180	23	-
	Dongan	180	1	-
	Jakwang	180	7	-

†) +++;good, ++;fair, +;not-bad, -;bad.

Table 19. Survived rice callus of irradiated seeds on the medium supplemented with 0.75 mM 5MT (Dongjin)

Radiation Dose	No. of inoculated seeds	No. of survivals			Reduction rate(%)	Development levels of callus
		40days	70days			
non-irra.	500	181	57	68.51	+++ [†]	
5 KR	500	164	40	75.61	++	
10 KR	500	210	111	47.14	++	
15 KR	500	268	102	61.94	++	
20 KR	500	138	41	70.29	++	
25 KR	500	118	33	72.03	+	
30 KR	500	74	25	66.22	+	

† +++; good, ++; fair, +; not-bad

5MT가 없는 N6기본배지에서 유기된 캘러스를 0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1mM 5MT에 2mm 크기로 잘게 잘라 치상하여 40일간 배양하여 캘러스 생존율을 조사하였던 결과, 3품종 모두 대조구(5MT free)에서는 모든 캘러스가 생존한 반면 5MT가 첨가된 배지에서는 생존율이 매우 떨어졌다. 동진벼는 5MT첨가 배지에서 생존한 총 clone수가 6이었고, 동안벼와 자광도는 각각 3개로 5MT에 대한 감수성이 캘러스가 종자상태보다는 매우 높은 것으로 나타났다(Table 21). Wakasa K. & Widholm J.M. (1987)은 벼 캘러스의 5MT 농도에 대한 감수성 조사에서 저항성 캘러스에 비해 감수성을 나타내는 캘러스는 0.03~0.1mM 5MT 농도에서 생체중이 급격히 감소함을 보고한 바 있고, Widholm J.M. & Brotherton J.E. (1983)은 액체 배양을 통해 *D. innoxia*는 100, 300 μ M 5MT 농도에서, *Nicotiana tabacum*은 46, 137 μ M 5MT 농도에서 저항성 캘러스를 획득한 바 있다.

Gamma-ray에 대한 감수성과 5MT의 영향을 조사하기 위해 5MT가 없는 N6 기본배지에서 유기된 캘러스에 non, 3, 5, 7, 9KR γ -ray를 처리하여 0.25, 0.5mM 5MT를 함유한 선택배지에서 40일간 배양하였던바 Table 22의 결과를 얻을 수 있었다.

동진벼와 동안벼의 방사선 처리구는 0.25mM 5MT 농도에서 약1~2%생존율을 보인 반면, 자광도는 3KR 처리구를 제외하고는 약15% 내외의 생존율을 보여 특이한 사항을 나타냈는데, 이는 아마도 방사선 조사된 캘러스의 상태가 다른 두 품종에 비해 양호했었던 것으로 사료된다. 0.5mM 5MT 농도에서 동진벼는 치상한 모든 캘러스가 죽었으나 동안벼는 5KR, 7KR에서 캘러스를 얻을 수 있었다. 참고로 자료에는 없지만, 벼 캘러스의 γ -ray 감수성 조사에서 7KR에서는 방사선 처리를 하지않은 처리구에 비해 생체중 감소율이 약 56%였고, 9KR에서는 약 64%로 나타났다. 따라서, Table 22의 결과는 γ -ray와 5MT 두 요소의 복합적인 캘러스 성장 억제로 인해 생존율이 매우 낮아진 것으로 사료된다. 또한, 0.25mM 5MT 처리구에서 얻어진 캘러스를 0.5mM로 농도를 높여 계대배양한 결과, 3품종 모두 7KR 처리구의 캘러스가 상대적으로 많은 생존율을 보였고, 전체적으로는 동진벼는 1~3%, 동안벼는 1~5% 생존율인 반면 자광도는 3~6%로 역시 높게 나타났다(Table 23).

(2) 벼 약배양 유래 캘러스를 이용한 5MT 저항성 선발

Table 20. Survival rate of rice callus lines of irradiated seeds produced from 0.75mM 5MT cont. on the medium supplemented with 1mM 5MT concentration (Dongjin)

Dose	No. of selected lane (0.75 mM)	No. of survived lane (1 mM)	Reduction rate(%)	F.W (g/clone)
Non-irra.	57	33	42.11	0.0870±0.013
5 KR	40	20	50.00	0.074±0.010
10 KR	111	42	62.16	0.080±0.018
15 KR	102	50	50.98	0.079±0.007
20 KR	41	27	34.15	0.074±0.012
25 KR	33	9	72.73	0.064±0.013
30 KR	25	7	72.00	0.055±0.007

Table 21. The growth of survived rice callus on the medium supplemented with various 5MT concentrations

5MT conc.(mM)	Cultivars	No. of inoculated calli	No. of survivals
0	Dongjin	150	all
	Dongan	150	all
	Jakwang	150	all
0.125	Dongjin	150	-
	Dongan	150	3
	Jakwang	150	-
0.25	Dongjin	150	4
	Dongan	150	-
	Jakwang	150	3
0.5	Dongjin	150	-
	Dongan	150	-
	Jakwang	150	-
0.75	Dongjin	150	2
	Dongan	150	-
	Jakwang	150	-
1	Dongjin	150	-
	Dongan	150	-
	Jakwang	150	-

Table 22. Growth of rice callus irradiated with various dose rates on the medium supplemented with various 5MT concentration

Dose	Dongjin		Dongan		Jakwang	
	(/500clones)		(/500clones)		(/500clones)	
	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5
Non	30	-	28	-	23	-
3KR	2	-	-	-	7	-
5KR	4	-	9	2	74	-
7KR	5	-	8	8	83	2
9KR	7	-	-	-	78	-

야생벼인 자광도의 atypical pollen을 채취하여 2mg/ℓ NAA를 첨가한 N6 기본배지에서 캘러스를 유기하여 γ -ray를 non, 3KR, 5KR, 7KR, 9KR, 12KR, 15KR 처리한 후 각각 0.25mM, 0.5mM 5MT를 첨가한 선택배지에서 45일간 배양한 결과 15KR 처리구에서 14.0%, 3.4%로 가장 높은 생존율을 얻을 수 있었다.

7KR, 12KR 처리구는 0.25mM 5MT 농도에서 각각 10.0%, 5.6% 비교적 높은 생존율을 보였으나, 0.5mM 5MT 농도에서는 1% 미만의 낮은 생존율을 나타내 5MT 농도에 민감한 반응을 보였다(Table 24).

얻어진 캘러스는 1~2차례 계대배양을 거쳐 증식 후 hormone조합이 각각 1mg/ℓ NAA + 2mg/ℓ kinetin, 0.2mg/ℓ IAA + 2mg/ℓ kinetin 인 N6 기본배지에 옮겨 재분화 과정에 있다.

약배양으로 얻어진 재분화체는 콜히친 처리를 통해 동질이배체를 얻을 수 있으므로 여러 유전분석에 유용한 자원으로 사용될 수 있는 장점이 있다.

나. 고구마의 AEC 저항성 선발

올미, White Star의 캘러스에 γ -ray를 각각 non, 5, 7, 9KR 처리한 후 1mM S-(2-aminoethyl)-L-cysteine(AEC)을 함유한 MS 선택배지에 치상하여 40일간 배양한 결과 올미 품종이 White Star에 비해 저항성이 높은 것을 확인할 수 있었다.

올미는 5KR, 9KR 처리구에서 각각 70%, 80%이상의 생존율을 나타내 AEC에 대한 저항성이 높은 것으로 나타났다. White Star 역시 9KR > 5KR > 7KR 순으로 생존율이 높게 나타났으나 올미에 비해 약 30%정도의 생존율을 보였다(Table 25).

1mM AEC 농도에서 선발된 캘러스를 1.5mM AEC 농도의 MS 선택배지에 계대배양하여 40일간 배양한 결과 White Star는 5KR에서 선발된 캘러스의 생존율이 21.2%로 가장 좋았고, 다음은 대조구(non-irradiation) > 9KR > 7KR 순으로 나타났다.

올미는 1mM AEC 농도에서와 같이 1.5mM AEC 농도에서도 생존율이 70~90%로 매우 높게 나타났으며, 그 순서는 대조구 > 5KR > 9KR > 7KR와 같았다. 이와 같은 결과는 이미 캘러스가 1mM AEC에 적응하여 1.5mM로 농도가 증가하여도 생존율을 높게 유지하였던 것으로 사료된다(Table 26).

Table 23. Growth of callus selected from 0.25mM 5MT cont. on the medium supplemented with 0.5mM concentration

Dose	Dongjin (/300clones)	Dongan (/300clones)	Jakwang (/300clones)
non	22(7.33)*	10(3.33)	9(3.00)
3KR	3(1.00)	-	12(4.00)
5KR	5(1.67)	4(1.33)	10(3.33)
7KR	7(2.33)	13(4.33)	16(5.33)
9KR	2(0.67)	-	11(3.67)

* % of survival rate.

Table 24. Survival of irradiated callus induced from answer culture in different 5MT concentration (Jakwang)

Dose	No. of Inoculated callus	5MT Cont.(mM)	
		0.25(%)	0.5(%)
Non	500	1(0.2)	1(0.2)
3KR	500	6(1.2)	-
5KR	500	6(1.2)	2(0.4)
7KR	500	50(10.0)	4(0.8)
9KR	500	11(2.2)	3(0.6)
12KR	500	28(5.6)	1(0.2)
15KR	500	70(14.0)	17(3.4)

Table 25. Growth rate of sweet potato callus selected from 1mM S-(2-aminoethyl)-L-cysteine(AEC) on the medium supplemented with 1.5mM AEC

Radiation Dose	Cultivars	No. of inoculated calli	No. of survivals (%)
non-irra.	White Star	298	56(18.8)
	Yulmi	293	261(89.0)
5 KR	White Star	255	54(21.2)
	Yulmi	261	232(88.8)
7 KR	White Star	282	34(12.1)
	Yulmi	307	221(72.0)
9 KR	White Star	265	38(14.3)
	Yulmi	295	227(77.0)

4. 첨가물질에 의한 염해경감효과

가. 발아율, 초장, 근장 및 건물중

첨가물질이 다른 배지에서 배양 후 7일이 지난 보리 유묘의 초장, 근장의 변화는 Table 27에서 보는바와 같다. 공시된 6품종 모두 대조구보다는 못하지만, 초장 생육에 있어서 NaCl 단독처리보다는 proline 또는 putrescine을 함께 처리했을때 염해를 어느 정도 경감시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Garcia et al. (1997)가 proline 첨가에 의해 벼 유묘의 초장생육에 염해경감효과가 없었다는 보고와 일치하지 않았다. 품종간에는 특히 쌀보리 계통의 두원찰쌀보리와 맥주맥인 진양이 proline 첨가에 의해 초장 생육이 증가되었음을 알 수 있었다. 하지만, 뿌리 생육은 새쌀보리와 두산 29호가 비교적 우수하였으나 첨가물질에 의한 염해경감효과는 관찰할 수 없었다. 새쌀보리, 두원찰쌀보리의 쌀보리계통이 비교적 높은 발아율을 나타내고 있는 반면, 진양과 두산 22호를 포함한 맥주맥은 발아율이 낮고 첨가물질에 의한 영향을 받지 않은 것으로 나타났다(Fig 16). Mano et al. (1996)은 보리는 6조맥, 쌀보리, oriental type, non-uzu type이 내염성이 강하고 중국과 한국 품종이 비교적 염해에 강하다고 하였으며, Jana et al. (1980)은 수량이 높고 입중이 무거운 품종이 염해를 받았을 때 발아율이 높다고 보고한 바 있다. 건물중에 있어서는 6품종 모두 proline과 putrescine 처리구에서 높게 나타났는데, 이는 Lutts et al. (1996)의 보고와 일치하였다. 두원찰쌀보리의 경우 proline처리구의 건물중이 대조구와 비교해 차이가 없을 정도로 높게 나타났으나 맥주맥의 경우는 염해에 의해 건물중이 현저히 감소하였고 첨가물질에 의한 증가폭도 작았다(Fig 17).

나. Proline 함량 변화

염해를 받은 보리 유식물체내의 유리 proline 함량은 증가하였는데, 이는 Heuer & Nadler(1998)가 감자에서 식물체가 염해를 받을 때 chloride와 proline을 축적하여 식물체내 삼투조절을 한다는 보고와 일치하였으며, Martinez et al. (1996)은 내염성과 잎의 proline 함량과는 정의 상관성이 있고 proline 함량과 식물체의 발육 및 생존이 밀접한 관계가 있다고 보고한

Table 26. Effect of radiation dose of growing sweet potato callus on the medium supplemented with 1mM S-(2-aminoethyl)-L-cysteine

Radiation Dose	Cultivars	No. of inoculated calli	No. of survivals (%)
non-irra.	White Star	450	85 (18.89)
	Yulmi	450	171 (38.00)
5 KR	White Star	450	96 (21.33)
	Yulmi	450	327 (72.67)
7 KR	White Star	450	64 (14.22)
	Yulmi	450	174 (38.67)
9 KR	White Star	450	110 (24.44)
	Yulmi	450	364 (80.89)

Table 27. Seedling height and root length of barley grown in saline solution(129mM) with the addition of proline and putrescine

Kinds of barley	Varieties	Seedling height(SH) and root length(RL)							
		Control		NaCl		NaCl +Pro 7mM		NaCl +Put 7mM	
		SH	RL	SH	RL	SH	RL	SH	RL
Naked barley	Saessal	6.98 ^{a†}	5.82 ^a	3.62 ^b	4.95 ^a	4.70 ^b	5.45 ^a	4.69 ^b	3.44 ^b
	Doowonchapssal	12.09 ^a	3.04 ^{bc}	8.05 ^c	4.20 ^{ab}	10.79 ^{ab}	4.66 ^a	9.38 ^{bc}	2.69 ^c
Covered barley	Olbori	11.81 ^a	6.05 ^a	8.51 ^b	5.61 ^{ab}	9.07 ^b	4.95 ^b	9.13 ^b	4.76 ^b
	Jinyang	12.87 ^a	8.33 ^a	7.60 ^c	5.22 ^b	10.05 ^b	5.33 ^b	8.62 ^{bc}	5.50 ^b
Malting barley	Doosan 29	13.50 ^a	9.35 ^a	10.65 ^{bc}	9.03 ^a	11.83 ^b	8.00 ^a	9.93 ^c	6.00 ^b
	Doosan 22	12.15 ^a	5.85 ^{NS†}	9.93 ^b	5.70 ^{NS}	10.10 ^b	3.87 ^{NS}	9.81 ^b	3.33 ^{NS}

† Mean separation within rows by Duncan's multiple range test for variables ; SH, RL ($\alpha = 0.05$)

‡ NS, non-significance.

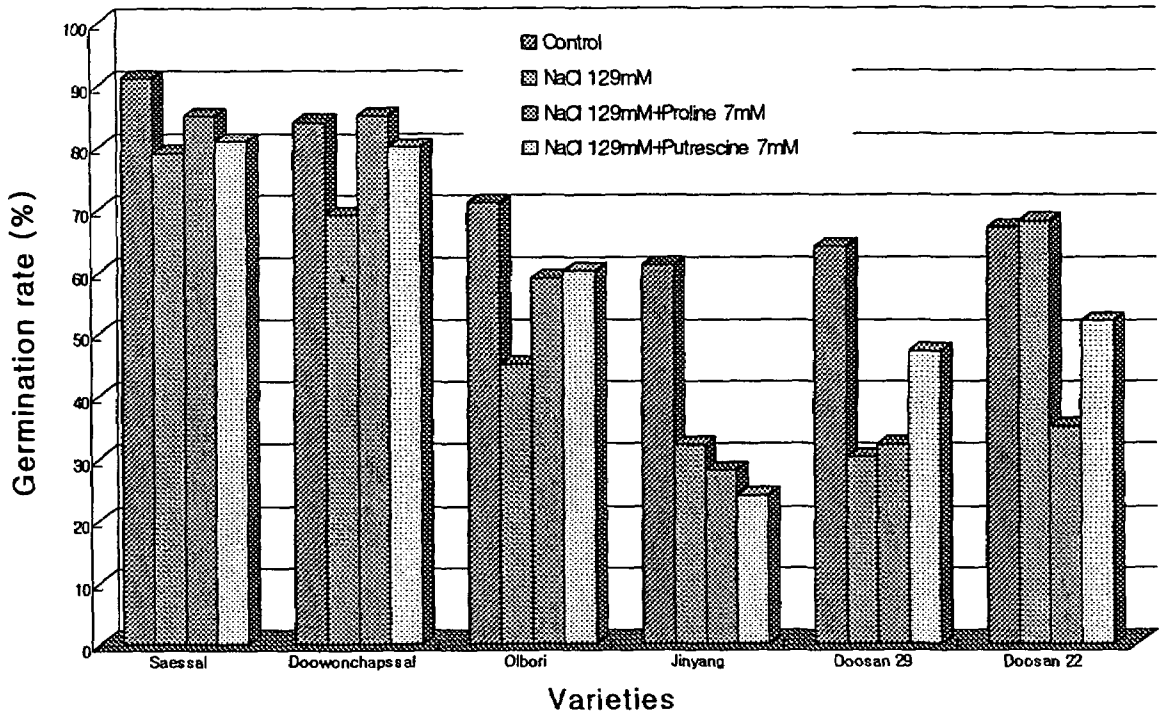


Fig 16. Germination rate of barley grown in saline solution with the addition of proline and putrescine.

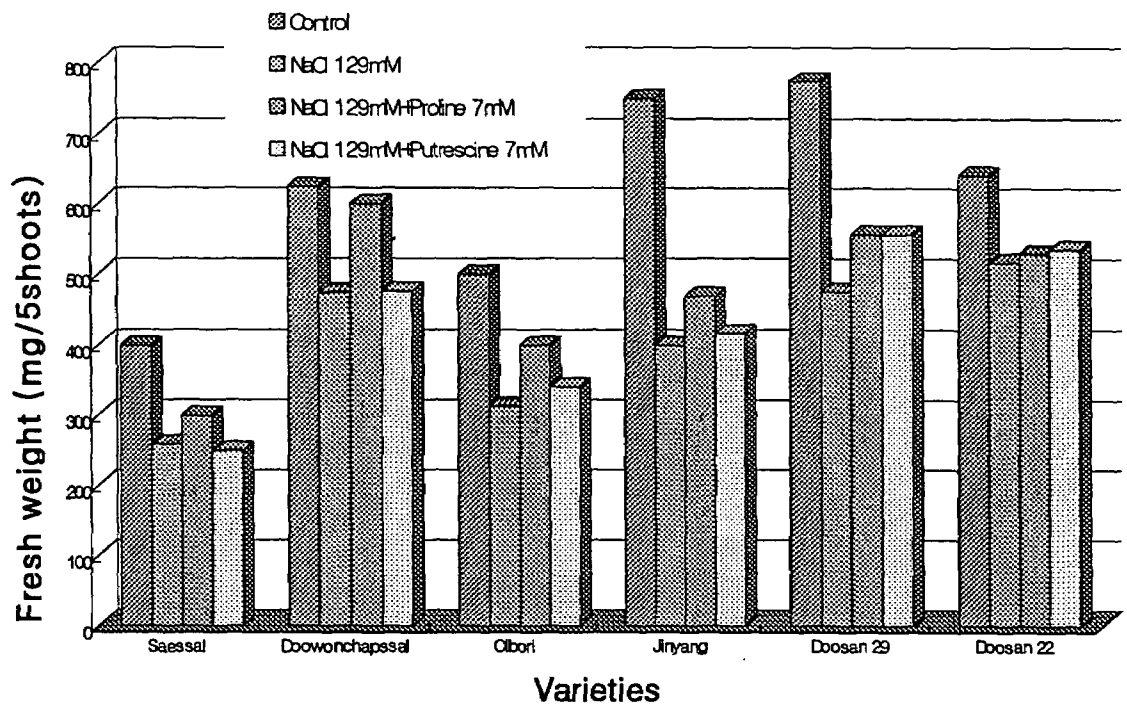


Fig 17. Fresh weight of barley seedling shoots grown in saline solution with the addition of proline and putrescine.

바 있다. proline과 putrescine을 첨가하였을 때 proline 함량이 NaCl 단독처리 보다 더욱 증가함을 알 수 있었다. 특히 두원잡쌀보리와 두산29호는 putrescine 처리구의 proline 함량이 대조구에 비해 2배 이상 증가하였으나, 새쌀보리와 올보리는 오히려 감소하는 경향을 나타내 품종간에도 큰 차이를 보여주었다(Fig 18).

다. 세포구조의 변화

두산29호의 엽초 단면을 현미경으로 관찰했을 때, 대조구는 동화유조직이 뚜렷하고 유관속도 선명하게 보이며 전체적으로 안정된 모습을 보이는데 반해(Fig 19A) NaCl에 의해 염해를 받았을 때는 전체적으로 조직이 불안정한 모습을 보였다(Fig 19B). 하지만 proline과 putrescine을 첨가한 배지의 경우 NaCl에 의한 염해를 줄여 조직이 비교적 안정되고 특히 putrescine의 경우는 대조구와 별반 차이를 보이지 않을 정도로 그 효과가 좋았다(Fig 19C, D). 엽초의 경우와 마찬가지로 엽신도 비슷한 경향을 나타내었는데, NaCl 처리구의 엽육세포와 유관속초 세포들이 부정형을 이루면서 불규칙적인데 비해 putrescine처리구의 엽육세포는 어느 정도 구형을 이루며 유관속초 세포들도 뚜렷한 양상을 보였고 특히 외부 유관속초 세포가 상당히 팽창되었음을 확인할 수 있었다(Fig 20). 이는 Heuer & Nadler (1998)가 말한 삼투조절을 통한 세포의 팽창인 것으로 사료된다.

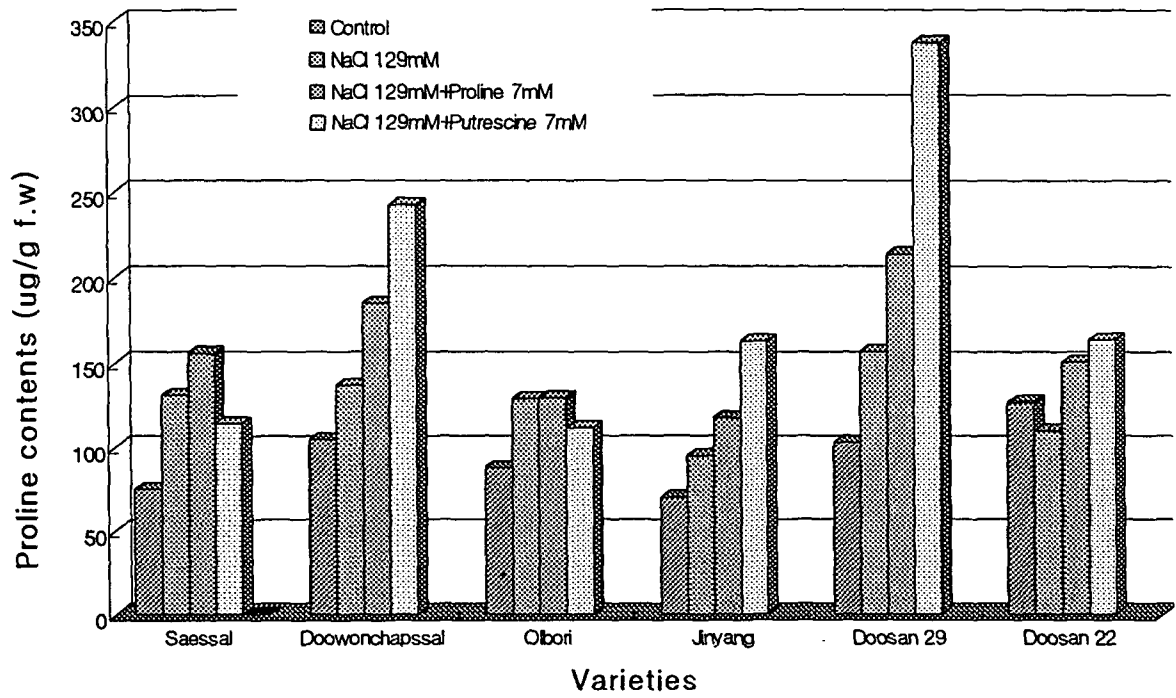


Fig 18. Free proline contents of barley seedling shoots grown in saline solution with the addition of proline and putrescine.

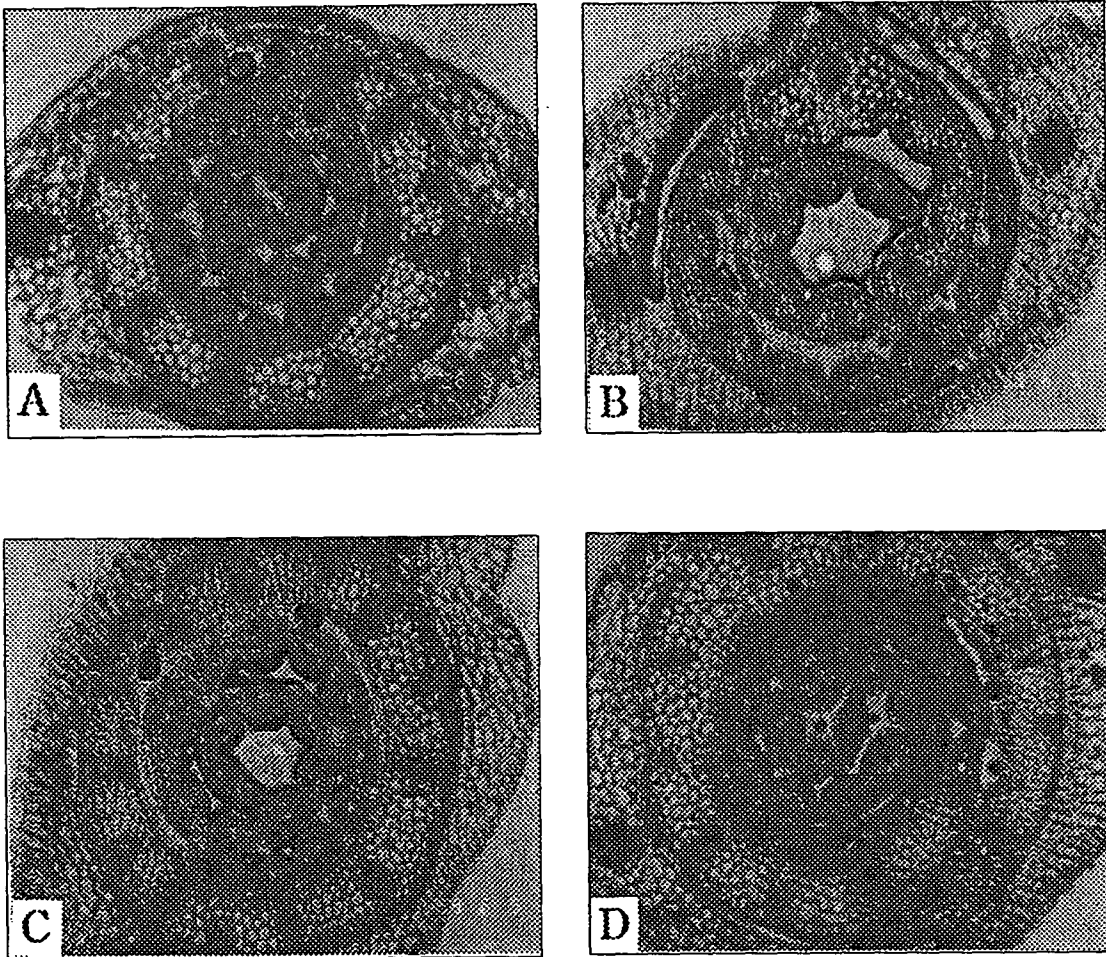


Fig 19. Microphotograph of cross-sectional views of leaf sheath in barley seedlings after 7 days of culture ($\times 100$). A) Control, B) NaCl 129mM, C) NaCl 129mM + Proline 7mM and D) NaCl 129mM + Putrescine 7mM.

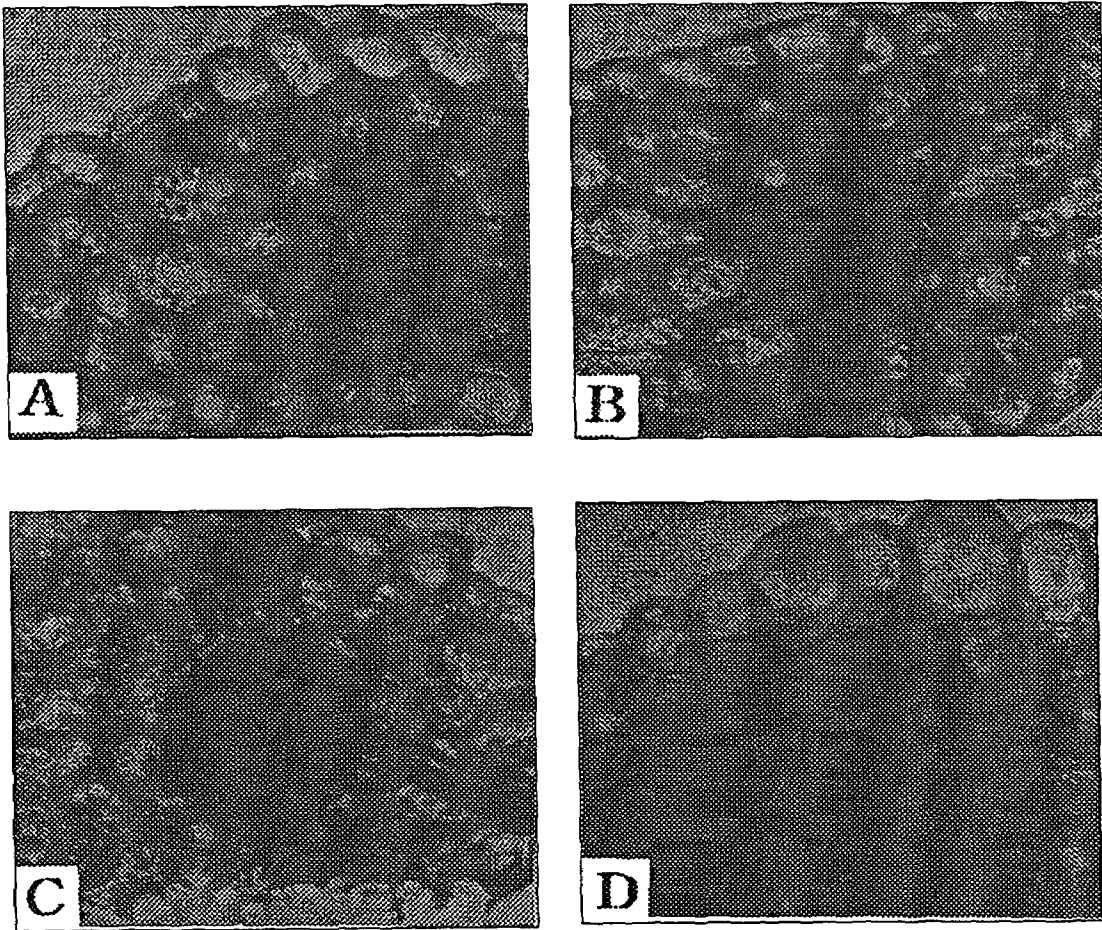


Fig 20. Microphotograph of cross-sectional views of leaf blade in barley seedlings after 7 days of culture ($\times 400$). A) Control, B) NaCl 129mM, C) NaCl 129mM + Proline 7mM and D) NaCl 129mM + Putrescine 7mM.

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도

- 1) 환경내성 세포주 선발은 벼에서 다수의 내성 세포주를 선발 육성하였고 호남 농업시험장에서 동계 육성하는 단계에있다.
- 2) 영양 요구성 선발 변이체들은 선발 형질의 유전적 배경을 파악하여 관련 기관에 분양하므로써 품종개량에 직접기여 할 것이나 보다 후속 연구가 요청된다.

여 백

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 1) 환경내성 유전자 확보는 내염성, 내한성 등의 품종개량에 직접 활용될 것임.
- 2) 영양 요구성 세포주(5-MT, cysteine)은 곡물에 결핍되고 있는 아미노산 함량을 증대시켜 동물성 단백질을 식물성으로 대체하여 국민건강증진에 기여 할 것임.
- 3) 각종 내성 유전인자 확보는 농약 사용을 줄여 공해를 경감시 킬 것임.
- 4) 특수 marker 유전자는 종자 특허권 보호의 수단으로 역할을 할 것임.
- 5) 우량 유전자의 활용으로 식량증산을 도모하여 식량난 해결에 기여.

여 백

제 6 장 참 고 문 헌

- o Ahlquist, P., and Pacha, R. F. (1990). *Physiol. Plant.* 79: 163-167.
- o Albert, H., Dale, E. C., Dale., Lee, E., and Ow, D. W. (1995). *Plant J.* 7: 649-659.
- o Arencibia, A., Molina, P. R., Delariva, G., and Selmanhousein, G. (1995). *Plant Cell Rep.* 14: 305-309.
- o Austin DF(1983) *Am.Soc.Hort.Sci.Tropical.Region.* 27(B).
- o Batty, N. P., and Evans, J. M. (1992). *Transgenic Res.* 1: 107-113.
- o Baulcombe, D. C., Chapmann, S., and Santa Cruz, S. (1995). *Plant J.* 7: 1045-1053.
- o Bechtold, N., Ellis, J., and Pelletier, G. (1993). *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie III-Sciences De La Vie-Life Sciences* 316: 1194-1199.
- o Becker, D., Brettsschneider, R., and Lörz, H. (1994). *Plant J.* 5: 299-307.
- o Ben-Hayyim G, spiegel-Roy P, Neumann M (1985) *plant physiol* 78:144-148
- o Bhattacharyya, M. K., Stermer, B. A., and Dixon, R. A. (1994). *Plant J.* 6: 957-968.
- o Bourque, J. E. (1995). *Plant Science* 105: 125-149.
- o Brettel RIS, Dennis ES, Scowcroft WR, Peacock WJ (1986) *Mol.Gen.Genet.* 202: 235-239.
- o Brock RD (1979) in: *Seed protein improvement in cereals and grain regumes : IAEA (ed), Vienna, Vol. I. pp 43-55.*
- o Brown PTH, Lange FD, kranz E, Lorz H (1993) *Mol.Gen.Genet.* 237:311-317.
- o Brown PTH, Gobel E, Lorz H (1991) *Theor.Appl.Genet.* 81: 237-232.
- o Buzayan, J. M., Geriach, W. L., Bruening, G., Keese, P., and Gould, A. R. (1986). *Nature(London).* 323, 349-353.
- o Cano, E. A., Perez-Alfocea, F., Moreno, V. and Bolarin, C. (1996). *Plant Cell Reports.* 15: 791-794.
- o Cantliffe DJ, Liu JR, Schultheis JR, (1987) In WH Smith, JR Frand, eds, *Mthane from Biomass: A Systems Approach, Elsevier Applied Sci, New York,* pp 183-195

- o Cavalcante Alves JM, Sihachakr D, Allot M, Tizroutine S, Musso I, Servaes A, Ducreux G, (1994) *Plant.cell.Report.* 13:437-441.
- o chae YA, and Bang KH (1990) *KorJ. Breed.* 21:283-286
- o Chang, S. S., Park, S. K., Kim, B. C., Kang, B. J., Kim, D. U., and Nam, H. S. (1994). *Plant J.* 5: 551-558.
- o Chapmann, S., Kavanagh, T., and Baulcombe, d. c. (1992). *Plant J.* 2:549-557.
- o Chen, S., Zhnag, G., Guo, G., and H. Ding, (1995). IAEA-SM-340/193.
- o Chowrira, G. M., Akella, V., and Lurquin, P. F. (1995). *Mol.Biotechnol.* 3: 17-23.
- o Christou, P., Fiord, T. L., and Kofron, M., (1991). *Biotechnol.*9: 957-962
- o Crouaghan. TP, stanarek SJ, pains DW (1978) *crop Sci* 18: 959-963
- o Croughan TP, Stavarek SJ, Rains DW(1981) *Environ. Exp.Bot* 21: 317-324
- o D'Halluin, K., Bonne, E., DeBeukeleer, M., and Leemans, J. (1992). *Plant Cell* 4: 1495-1505.
- o Daniell, H. (1993). *Meth. Enzymol.* 217: 536-556.
- o De Block, m. (1993). *Euphytica* 71: 1-14.
- o Dennis ES, Brettel RIS, Peacock WJ, (1987) *Mol. Gen. Genet.* 210: 181-183.
- o Desamero NV, Rhodes BB, Decoteau DR, Briges WC (1994) *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 37:103-111.
- o Devaux P, Kilian A, Kleinhofs A (1993) *Mol. Gen. Genet.* 241: 674-679.
- o Devos KM, Gale MD (1992) *Theor. Apple. Genet.* 84:567-572.
- o Dix. PJ and street. HE (1975). *plant sci.Lett* 5: 231-237
- o Donn. G., Nilges, M., and Morocz. S. (1990). In *Abstracts VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture*, pg. 53, Amsterdam, the Netherlands.
- o Espino F. J., Conzalez-Jaen, M. T., Ibanez, J., Sendino A. M. and Vazquez A. M. (1994). *Abstracts VIIIth Inter. Cong. of Plant Tissue and Cell Culture.* S16-14, 226.
- o Feldman, K. A. (1992). In: *Methods in Arabidopsis Research.* C. Koncz, N. H. Chua, and J. Schell, eds. World Scientific Publ., Singapore, pp. 274-289.
- o Frame, B. R., Drayton, P. R., Bagnall, S. V., Lewn, C. J., Bullock, W. P., Wilson, H. M., Dunwell, J. M., Thompson, J. A., and Wang, K. (1994). *Plant J.* 6: 941-948.

- o Fritsch P, Hanson MA, Spore CD, Pack PE, Reiseberg LH (1993) Plant. Mol. Bio. 11: 10-20
- o Fromm, M. E., Morrish, F., Armstrong, C., Williams, R., Thomas, J., AND Klein, T. M. (1990). Bio/Technology 8, 833-839.
- o Gamborg, O. L., and Phillips, G. C. (1995). Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods. Springer Verlag, Berlin.
- o Garcia AB, Engler J de A, Iyer S, Gerats T, Montagu MV, Caplan AB (1997) Plant Physiol. 155: 159-169
- o Gleba, Y. Y., and Shulumukov, L. R. (1990). In: Plant cell line selection. P. J. Dix, ed. Verlag Chemie, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, pp. 257-286.
- o Glimelius, K., Fahlesson, J., Landgren, M., Sjodin, C., and Sundberg, E. (1991). Trends Biotechnol, 9: 24-30.
- o Golemboski, D. B., Lomonosoff, G. P., and Zaitlin, M. (1990). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 6311-6315.
- o Golovkin, M. V., Abraham, M., Morocz, S., Bottka, S., Feher, A., and Dudits, D. (1993). Plant Science 90: 41-52.
- o Gordon-Kamm, W. J., Spencer, T. M., Mangano, M. L., Adams, T. R., Daines, R. J., Start, W. G., O'Brien, J. V., Chambers, S. A., Adams, W. R., Jr., Willetts, N. G., Rice, T. B., Mackey, C. J., Krueger, R. W., Kausch, A. P., and Lemaux, P. G. (1990). Plant Cell 2, 603-618.
- o Gossett, D. R., Millhollon, E. P. and Lucas, M. C. (1994). Crop Sci. 34: 706-714.
- o Grayburn, W. S., and Vick, B. A. (1995). Plant Cell Rep. 14: 285-289.
- o Grodzicker J, Willam J, Sharp P, Sambrook J (1974) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39: 439-446.
- o Hamamoto, H., Sugiyama, Y., Nakagawa, N., Hashida, E., Mataunaga, Y., Takemoto, S., Watanabe, Y., and Okada, Y. (1993). Biotechnol. 11: 930-932.
- o Handerson JHM, Phills BR, Whatly BT (1984) Sweet potato, In WR Sharp, DH Evans, PV Ammirato, Y Yamada, eds, Handbook Co, New York, pp 302-326
- o Harlan JR (1976) Sci Am 235: 89-97.
- o Harms, C. T., Montoya, A. L., Privalle, L. S., and Briggs, R. W.

- (1990). *Theor. Appl. Genet.* 80, 353-358.
- o Hartnett, M. E., Chuk, C-F., Mauvais, C. J., McDevitt, R. E., Knowlton, S., Smith, J. K., Falco, S. C., and Mazur, J. (1990). *J. Cell Biochem. Suppl.* 0 (14 Part E), 301.
 - o Hashmi GR, Huettel R, Meyer L, Krusberg F, Hammerschlag (1997) *Plant. cell. Repo.* 16:624-627.
 - o Haughn, G. W., and Somerville, C. (1990). *Plant Physiol.* 92, 1081-1085.
 - o He, D. G., Mouradov, A., Yang, Y. M., Mouradova, E., and Scott, K. J. (1994). *Plant Cell Rep.* 14: 192-196.
 - o Hernandez, J. A., E. Olmos, F. J., Crpas, F. Sevilla and L. A. del Rio. (1995). *Plant Science* 105: 151-167.
 - o Heuer B, Nadler A (1998) *Plant Sci.* 137: 43-51
 - o Hiatt, A. (1993). *Transgenic plants, Fundamentals and Applications.* Marcel Dekker, New York. Holm, P. B., Knudsen, S., Mouritzen, P., Negri, D., Olsen, F. L., and Roue, C. (1994). *Plant Cell* 6:531-543.
 - o Isabel N, Thembly L, Michaud M, Tremblay FM, Bousquet J(1993). *Theor. Appl. Genet.* 86: 81-87.
 - o Jaffeny SAJ, Wilson V, Thein SL (1985) *Nature.* 314:39-42.
 - o Jana MK, Jana S, Acharya SN (1980) *Euphytica* 29: 409-417.
 - o Jardinaud, M. F., Souvere, A., and Alibert, G. (1993). *Plant Science* 93: 177-184.
 - o Jarret RL, Salazar S, Fernanzs R (1984) *Hort. Science.* 19:397-398.
 - o Jonesvilleneuve, E., Huang, B., Prudhomme, I., Brid, S., Kemble, R., Hattori, J., and Miki, B. (1995). *Plnat Cell Tiss. Org. Cult.* 40: 97-100.
 - o Joseph, E. J. and Nikiforova, I. D. (1994). *Abstracts VIIIth Inter. Cong. of Plant Tissue and Cell Cultures.* S16-7. 224.
 - o Kachba J, spiegel- Roy P, saad. S (1980) In, *plant cell cultures: Results. and. 01 (iferriced.s.),* PP. 187-192. Elsevier/North-Holland Biomedical press, Amsterdam.
 - o Kaeppler, H. F., Gu, W., Somers, D. A., Rines, H. W., and Cockburn, A. F. (1990). *Plant Cell Rep.* 9: 415-418.
 - o Kaeppler, H. F., Somers, D. A., Rines, H. W., and Cockburn, A. F. (1992). *Theor. Appl. Genet.* 84: 560-566.
 - o Kang, K.K., and Kameya, T. (1995). *Breeding Science* 45: 321-325.

- o Kaper, J. M., Gallitelli, D., and Tousignant, M. E. (1990a). Res. Virol. 141, 81-95.
- o Kenny, L. and Caligari, P. D. S. (1996) Plant Cell Reports 15: 829-832.
- o Kim KJ, Jansen RK, Tumber BL (1992) Amer. J.Bot. 79: 708-715.
- o Kleffel B, Walther F, Preil W (1986) IAEA, Vienna, 1986. pp.113-120.
- o Komaki K, Yoshinaga M, Yamakawa O (1991) Proc. of. ICOBB in Miyazaki (pp17-23).
- o Kranz, E., and Lörz, H. (1993). Plant Cell 5: 739-746.
- o Kukimura H, Kouyama Y (1982) Studies on mutation breeding in sweet potato. (Ipomoea batatas Lam.) IAEA. 199-233.
- o Kumagai, M. H., Donson, J., Dellacioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., and Grill, L. K. (1995). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1679-1783.
- o Laursen, C. M., Krzyzek, R. A., Flick, C. E., Anderson, P. C., and Spencer, T. M. (1994). Plant. Mol. Biol. 24: 51-61.
- o Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Theor. Appl. Genet. 60:197-214.
- o Lee, H.Y., and Kameya, T. (1992) Theor. Appl. Genet. 82: 405-408
- o Leduc, N., Iglesias, V. A., Bilang, R., Gisel, A., Potrykus, I., and Sautter, C. (1994). Sexual Plant Reprod. 7: 135-143.
- o Lerner HR (1985) plant and soil 89:3-14
- o Levall MW, Bengtsson k, Nilsson NO, Hierdin A, Hallden C (1994) Physiol. Plant 90: 216-220.
- o Li, L., Qu, R., De Kochko, A., Fauquet, C., and Beachy, R. (1993). Plant Cell Rep. 12: 250-255.
- o Lindsey, K. (1992). J. Biotechnol. 26: 1-28.
- o Liu JR, Cantliffe DJ (1984) Plant. Cell. Rep. 3:112-115.
- o Liu JR, Cantliffe DJ, Simonds SC, Yuan JF (1989) SABRAO, J 21: 93-101
- o Liu QC, Konkubu T, Sato M (1992) Jpn. J. Breed. (Suppl. 2) 42:8-9.
- o Lomonossoff, G. P. (1995). Agro Food Industry Hi-Tech. 6: 7-11.
- o Lowe, K., Bowen, B., Hoerster, G., Ross, M., Bond, D., Pierce, D., and Gordon-Kamm, B. (1995). Biotechnol. 13: 677-882.
- o Luong, H. T., Shewry, P. R., and Lazzeri, P. A. (1995). Plant Science 107: 105-115.
- o Lutts S, Kinet JM, Bouharmont J (1996) Plant Sci. 116: 15-25
- o Mano Y, Nakazumi H, Takeda K (1996) Breeding Science 46: 227-233.
- o Marsan, P. A., Lupotto, E., Locatelli, F., Qiao, Y. M., and Cattaneo, M.

- (1993). *Plant Science* 93: 85-94.
- o Maria ICS Gama, Ruip LJr, Antonia RC, Daniel JC (1996) *Plant Cell.Tissue and organ Culture*. 46: 237-244.
 - o Martinez CA, Maestri M, Lani EG (1996) *Plant Sci*. 166: 177-184.
 - o Matzke, M., and Matzke, A. J. M. (1993). *Annu Rev Plant Physiol.Plant Mol. Biol.* 44: 53-76.
 - o McBride, K. E., Svab, Z., Schaaf, D. J., Hogan, P. S., Stalker, D. M., and Maliga, P. (1995). *Biotechnol.* 13: 362-365.
 - o Me-a-Basso L, Guarda P, Rios D, AlberdiM(1986) *Phytochemistry* 25: 1843-1846
 - o Meyer, P. (1995). *Trends Biotechnol.* 13: 332-337.
 - o Morikawa, H., Nishihara, M., Seki, M., and Irifune, K. (1994). *J. Plant Res.* 107: 117-123.
 - o Muller E, Brown PTH, Harke S, Lorz H (1990) *Theor. Appl. Genet.* 80: 673-679.
 - o Murashige T , Skoog F (1962) *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
 - o Murata T, Hoshion K, Miyaji Y (1987) *Japan. J. Breed.* 37: 291-298.
 - o Murata T, Fukuka H, Miyaji Y (1989) *Proc. Fac. Agr. Kyushu. Tokai. Univ.* 8: 23-27.
 - o Murata T, Fukuka H, Kishimoto M (1993) *Japan. J. Breed.* 46 (suppl. 1) 20.
 - o Munthali MT, Newbury HJ, Ford-Lloyd BV (1996) *Plant. Cell.Rep.*15: 474-478.
 - o Nabors M, W, Gibbs SE, Bernstein CS, Meis ME(1980) *Z. Pflanzen. physiol.* 92: 13-17
 - o Nehra, N. S., Chibbar, R. N., and Kartha, K. K. (1995). *Plant Breed. Abst.* 65: 803-808.
 - o Nehra, N. S., Chibbar, R. N., Leung, N., Caswell, K., Mallard, C. Steinhauer, L. Baga, M., and Kartha, K. K. (1994). *Plant J.* 5: 285-297.
 - o Newbury HJ, Ford-Lloyd BV (1993) *Plant. Growth. Reg* 12: 43-51.
 - o Newell CA, Lowe JM, Merrywether A, Rooke LM, Hamiltone WDO (1995) *Plant Sci.* 107:215-227.
 - o Olmos, E. and E. Hellin (1996) *Plant Science* 120: 37-45.
 - o Orlando, R.; P. Magro and E. Rugini (1997). *Plant Cell Reports* 16: 272-276.
 - o Otani M, Mii M, Handa T, Kamada H, Shimada T (1993) *Plant. Sci.* 94:151-159.

- o Otani M, Takkiko Shimada (1996) *Breeding. Science.* 46:257-260.
- o Pandey R and Gunapathy PS (1984) *Plant cell rep* 3: 45-47
- o Park, H. K. (1996). *Korean J. Breed. Vol. 28 Suppl. 2:* 6-12.
- o Pescitelli, S. M., and Sukhapinda, K. (1995). *Plant Cell Rep.* 14: 712-716.
- o Phillips RL, Kaepler SM, Olhoft P (1994) *Proc. Natl. Acad. Sic.* 91: 5222-5226.
- o Potrykus, I. (1991). *Ann. Rev. Palnt Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 205-225.
- o Prakash CS, Varadarajan U (1992) *Plant. Cell. Rep.* 11:53-57.
- o Raineri, D. M., Boulton, M. I., Davies, J. W., and Nester, E. W. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3549-3553.
- o Rajasekaran, K., J. W. Grula and D. M. Anderson (1996) *Plant Science* 119: 115-124.
- o Ranch, J.P., Rick, S., Brotherton, J.E., and Widholm, J.M. (1983) *Plant Physiol.* 71:136-140.
- o Rangan TS and Vasil IK (1983) *K.Schum Annals Bot.* 52: 9-64
- o Rangan TS, and Vasil IK (1983) *K. schum. Annals Bot.* 52: 59-64
- o Rathore, K. S., Chowdhury, V. K., and Hodges, T. K. (1993). *Plant Mol. Biol.* 21: 871-884.
- o Reddy, N. P. E. and M. Jacobs, (1995). *IAEA-SM-340/184.*
- o Reddy PJ and vaidy annath. K 1986 *I Theor Appl. Genet* 71:757-710
- o Reinold L, seiden A, voiokta M(1984) *plant physiol* 75: 846-849
- o Risseeuw, E., Offringa, R., Frankevandijk, M. E. I., and Hooykaas, P.J.J. (1995). *Plant J.* 7: 109-119.
- o Sagha-Marooof MA, Soliman KM, Jorgenson RA, Allard RW (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:8014-8018.
- o Sanford, J. C., Smith, F. D., and Russell, J. A. (1993). *Meth. Enzymol.* 217: 483-509.
- o Sangwan, R. S., Ducrocq, C., and Sangwan-Norreel, B. (1993). *Plant Science* 95: 99-115.
- o Sautter, C., Waldner, H., Neuhaus-Url, G. G. A., Neuhaus, G., and Potrykus, I. (1991). *Biotechnol.* 9: 1080-1085.
- o Scarpa GM, Pupilli F, Damiami F, Arcioni S (1993) *Plant Cell. Tissue and Orgen Cultures.* 35:49-57.
- o Schaefer, D., Zryd, J. P., Knight, C., and Cove, D. J. (1991). *Mol.*

- Gen. Genet. 226: 418-424.
- o Schaeffer, G. W., (1995). IAEA-SM-340/170.
 - o Schaeffer, G. W., and Sharpe, F.T. (1981) *In Vitro* 17:345-352.
 - o Schaeffer, G. W.F. T. Jr. Sharpe. J. T. Dudley, (1994). 34 : 1424-1425.
 - o Schaeffer, G. W.F. T. Jr. Sharpe, (1990). *Theor. Appl. Genet.* 80: 841-846.
 - o Schlesinger, S. (1995). *Mol. Biotechnol.* 3: 155-165.
 - o Schnorf, M., Neuhaus, U. G., Galli, A., Iida, S., Potrykus, I., and Neuhaus, G. (1991). *Transgenic Res.* 1: 3-30.
 - o Scholthof, H. B., Morris, T. J., and Jackson, A. O. (1993). *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 309-322.
 - o Selker EU (1990) *Annu. Rev. Genet.* 24: 579-613.
 - o Shoyama Y, Zhu XX, Nakai R, Shiraishi S (1997) *Plant. Cell. Rep.* 16: 450-453.
 - o Smith, C. R., Saunders, J. A., Vanwert, S., Cheng, J. P., and Matthews, B. F. (1994). *Plant Science.* 104: 49-58.
 - o Songstad, D. D., Somers, D. A., and Griesbach, R. J. (1995). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 40: 1-15.
 - o Sporlein, B., and Koop, H. U. (1991). *Theor. Appl. Genet.* 83: 1-5.
 - o Straus D, Frederrick MA (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:1889-1893.
 - o Tanaka, T., Nishihara, M., Seki, M., Sakamoto, A., Tanaka, K., Irufuno, K., and Morikawa, H. (1995). *Plant Mol. Biol.* 28: 337-341.
 - o Tang F, Li L, Lan L, Zhang QI (1993) *Acta. Agro. Sinica.* 19:372-375.
 - o Timmermans, M. C. P., Das, O. P., and Messing, J. (1994). *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 79-112.
 - o Touraev, A., A. Ilham, O. Vicente and E. Heberle-Bors (1996) *Plant Cell Reports* 15: 561-565.
 - o Treiscel S(1986) *physiol plant* 67:173-181
 - o Troll W. and. Linsely. J (1975) *J Biol chem* 215: 655-660
 - o Tsay HS, Tseng MT (1979) *Bot. Bull. Acad. Sinica.* 20:117-122.
 - o Vaileria B, Kuksova, Nikolai M P, Yuri YU, Gleba (1997) *Plant cell. Tissue and Organ culture.* 49:17-27.
 - o Valles MP, Wang ZY, Montavon P, Potrykus I, Spagenberg G (1993) *Plant. Cell. Rep.* 12: 101-106.
 - o Vanblokland, R., Vandergeest, N., Mol, J. N. M., and Kooter, J.M. (1994). *Plant J.* 6: 861-877.

- o Vaneck, J. M., Blowers, A. D., and Earle, E. D. (1995). *Plant Cell Rep.* 14: 299-304.
- o Vasil, V., Castillo, A. M., Fromm, M. E., and Vasil, I. K. (1992). *Biotechnol.* 10: 667-674.
- o Vanblokkland, R., Vandergeest, N., Mol, J. N. M., and Kooter, J.M. (1994). *Plant J.* 6: 861-877.
- o Verhoeven, H. A., van Eck, J. W., Blaas, J., and Dijkhuis, P. (1995). *Plant Cell Rep.* 14: 781-785.
- o Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Kuiper M, Zabeau M. (1995) *Nucleic. Acids. Res.* 23: 4407-4414.
- o Wakasa K, Widholm JM (1987) *Theor. Appl. Genet.* 74: 49-54.
- o Wang JS, Tetsufumi S, Satoru T, Muneharu S, Teiji K (1997) *Breeding. Science.* 47: 135-139.
- o Wang ZY, Nagel J, Potrykus, Spangenberg G (1993) *Plant. Sci* 94:179-193.
- o Wang ZY, Tanksly SD (1989) *Genome.* 31: 1113-1118.
- o Walden, R., and Wingender, R. (1995). *Trends Biotechnol.* 13: 324-331.
- o Wan, Y. C., Widholm, J. M., and Lemaux, P. G. (1995). *Planta* 196: 7-14.
- o Watad. AA, Reinhold L, Lerner. HR (1983) *plant physiol* 3: 624-629
- o Wen, F. J., Peng, J. Y., Lister, R. M., and Hodages, T. K. (1993). *Chinese J. Botany* 5: 102-109.
- o Widholm, J. M. (1972) *Biochim. Biophys. Acta.* 261: 52-58.
- o Widholm, J. M. (1978) *J. Exp. Bot.* 29: 1111-1116.
- o Widholm, J. M. and Brotherton, J. E. (1995) *Proc. VIIth Leter. Cong. Plant Tissue and Cell culture, Florence Italy 21-17 June 1994.* pp 571-576.
- o Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey VS (1990) *Nucleic. Acids. Res.* 18:6531-6535.
- o Winocov, I., (1995). *Plant Cell Rep.* 10 : 561-564.
- o Xu, X., and Li, B. (1994). *Plant Cell Rep.* 13: 237-242.
- o Yamazaki, M., L. Son, T. Hayashi, N. Morita, T. Asamizu and I. Mourakoshi (1996). *Plant Cell Reports* 15: 317-321.
- o Yonesawa K, Yamagata H (1997) *Euphytica.* 26:413-426.
- o Yoshida S, Ogawa. M, Suenaga. K, Ye HC(1983) *Cell and Tissue Culture Technigues for Cereal Crop Improvement* PP, 237~254.science prress,

Beijing, china

- o Zambryski, P. C. (1992). *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 465-490.
- o Zeidler, M., Gatz, C., Hartmann, E., and Hugfes J. (1995). *Plant Mol. Biol.* 29: 811-818.
- o Zheng QI, Dessai AP, Prakash CS (1996) *Plant. Cell.Reports.* 15: 381-385.
- o Zhong G. Y. and J. Dvorak (1995). *Theor. Appl. Genet.* 90: 229-236.
- o Zilberstein, A., Schuster, S., Flaishman, M., Pnini-Cohen, S., Koncz, C., Mass, C., Schell, J., and Eyal, Z. (1994). 4th International Congress on Plant Molecular Biology (abstract 2013)
- o Zoubenko, O. V., Allison, L. A., Savb, Z., and Maliga, P. (1994). *Nucl. Acid. Res.* 22: 3819-3824.

서 지 정 보 양 식

수행기관보고서번호	위탁기관보고서번호	표준보고서번호	INIS 주제코드		
KAERI/RR-1910/98					
제목 / 부제	방사선 유전공학 marker 유전자 개발				
연구책임자 및 부서명	이 영 일(방사선 RI 이용 연구팀)				
연구자 및 부서명	송희섭, 김진규, 신인철, 이상재, 임용택, 이인석, 김동섭 임용표, 서용원, 이정호 (방사선 RI 이용 연구팀)				
출판지	대전	발행기관	한국원자력연구소	발행년	1998
페이지	120p.	도표	있음(○), 없음()	크기	21.0X29.7cm.
참고사항					
비밀여부	공개(○), 대외비(), 급비밀		보고서 종류	연구보고서	
연구위탁기관			계약 번호		
초록 (15-20 줄)	<p>방사선을 이용한 환경내성 및 영양요구성 유전공학 marker 유전자를 확보하고자 벼의 성숙배와 약(anther)에서 배수성/반수성 켈러스를 유기 시켰고 이들 켈러스에 방사선을 처리하여 돌연변이 유기 적정 방사선량을 결정하였다. 또한 고구마의 정단 조직에서 배발생 켈러스를 유도시켰고 배발생 켈러스의 방사선 감수성을 파악하여 체세포 돌연변이 유기 적정 조건을 확립하였다. 벼에서는 내염성 세포주를 선발하여 식물체 재분화에 성공하는 한편 고구마는 여러 가지 유용한 형태적변이체를 선발할 수 있었고, 영양요구성 돌연변이 선발로는 벼의 SMT 저항성 세포주, proline 저항성 세포주를 획득하여 재분화 단계에 있으며 고구마에서는 cysteine 저항성 식물체를 얻었고 이들 변이체는 RAPD 분석 및 AFLP 분석법에 의해 DNA 밴드 패턴을 비교 분석하여 유전자를 확보한 단계에 있다.</p>				
주제명키워드 (10단어내외)	방사선감수성, 환경내성, 영양요구성, 유전자, 켈러스, 세포주, SMT, cysteine, 내염성, 벼, 고구마, RAPD, AFLP				

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET

Performing Org. Report No.	Sponsoring Org. Report No.	Standard Report No.	INIS Subject Code
KAERI/RR-1910/98			
Title / Subtitle	Development of Radiation Genetic Marker Genes		
Project Manager and Department	Young-Il Lee (Radiation/Isotope Application Research Team)		
Researcher and Department	Hi-Sup Song, Jin-Kyu Kim, In-Chul Shin, Sang-Jae Lee, Yong-Tack Lim, In-Suk Lee, Dong-Sub Kim, Yong-Pyo Lim, Yong-Won Seo, Jung-Ho Lee (Radiation/Isotope Application Research Team)		
Publication Place	Taejon	Publisher	KAERI
			Publication Date
			1998
Page	120p.	Ill. & Tab.	Yes(<input type="radio"/>), No (<input type="radio"/>)
			Size
			21.0X29.7cm
Note			
Classified	Open (<input type="radio"/>), Restricted(<input type="radio"/>), Class Document	Report Type	Research Report
Sponsoring Org.		Contract No.	
Abstract (15-20 Lines)	<p>1. Selection of <i>in vitro</i> mutation cell lines in sweet potato</p> <ul style="list-style-type: none"> - Induction of somatic embryogenic callus from shoot tip culture - Selection of morphological variants from irradiated callus - DNA analysis of somaclones using AFLP and RAPD <p>2. Selection of NaCl tolerant lines in rice</p> <ul style="list-style-type: none"> - Induction of callus from mature embryo and determine optimum dose of γ-ray - Selection of NaCl tolerant cell lines and plant regeneration from the selected lines - Induction of haploid callus by anther culture and selection of NaCl tolerant lines - Evaluation of agronomic traits for NaCl tolerant plants <p>3. Selection of nutritional mutants isolated <i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Determine the optimum concentration for selection of nutritional mutants in <i>in vitro</i> - Selection of 5MT resistant rice mutant lines from diploid and haploid calli - Selection of AEC resistant mutant lines of sweet potato from somatic single cell 		
(About 10 words)	γ -ray, NaCl tolerant, nutritional mutants, callus, 5MT resistance cell lines, AEC resistance cell lines, rice, sweet potato, RAPD, AFLP		