

사업구분	기본연구	수행구분	전반기	연구기간	01~05(3년차)
연구과제명	생명공학기술 실용화 연구			연구책임자	권순배
세부과제명	「칼라」의 바이러스 저항성 품종 육성 연구				
세부과제책임자	농산물이용시험장 농업연구사 권 순배 (033-258-4511)				
색인용어	바이러스 저항성, 유전자재조합, 칼라(<i>Zantedeschia elliotiana</i>)				

1. 당해연도 목표

바이러스 저항성 유전자재조합 칼라(*Zantedeschia elliotiana*)의 개발을 목적으로 칼라의 캘러스 유기 및 형질전환 조건 확립

2. 수행방법

가. 공시품종 : 골든어페어 및 블랙매직

나. 처리내용

1) 대상품종(이용부위) : Golden Affair (callus), Black Magic (Shoot growing point)

2) 삽입 유전자 : ZaMV coat protein gene 및 green fluorescent protein (GFP) gene

3) 발현벡터 구축 : pGreenZaCP2 및 pCKGFPS65C

4) 형질전환체 선발용 kanamycin 농도조건 구명

- Callus : 각 처리구별 50개의 callus에 kanamycin 농도별(50, 100, 150, 200, 300 mg/L)

처리

- Shoot : shooting 된 개체를 성장점 부위가 포함 되도록 하면서 기내에서의 생존에 적당한 크기로 잘라 50, 100, 150, 200, 250, 300 mg/L 카나마이신 배지에 20개체씩 치상, 4주 후 생육상태 조사

6) 형질전환 및 형질전환체 선발

- 형질전환 방법 : Particle bombardment (PDS1000/He Particle Delivery System, Bio rad Co.)

- 조건 : gold particle size(1, 1.6 μ m), target distance(6, 9 cm), pressure (1100, 1350psi)처리 조합

3. 시험성적

1) 발현벡터 구축

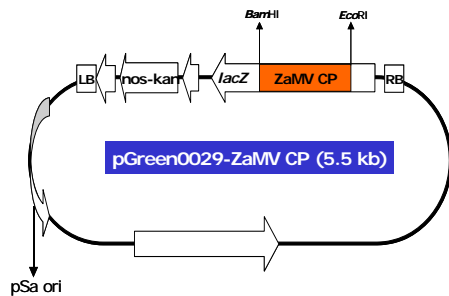


그림 1. ZaMV coat protein gene 도입 벡터 (pGreenZaCP2)

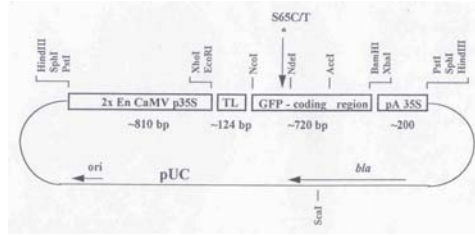


그림 2. Green fluorescent protein (GFP) gene 도입 벡터 (pCKGFPS65C)

2) 형질전환체 선발용 kanamycin 농도조건 구명

표 1. 「칼라」 캘러스의 카나마이신 처리 농도별 생육상태

카나마이신 농도(mg/l)	치상한 캘러스 수	캘러스 생육상태 ¹⁾	
		건전	갈변, 고사
50	75	55	20
100	75	50	25
200	65	25	40
300	75	35	40

1) 조사시기 : 치상 4주 후

표 2. 「칼라」 성장점을 포함한 shoot의 카나마이신 처리농도별 생육상태조사

카나마이신 농도(mg/l)	치상한 shoot(개)	shoot 생육상태	
		생육양호	생육불량
50	20	8	12
100	20	4	16
200	20	0	20
300	20	0	20

4) 형질전환 및 형질전환체 선발

가. pGreenZaCP2 벡터의 형질전환 결과



그림 3. 비대배지에 치상한 카나마이신 selection 된개체
A : 치상한 초기, B : 성장하고 있는 모습

나. pCKGFPS65C 벡터의 형질전환 결과

4. 주요결과요약

- 가. 성장점에서 캘러스 유도는 MS 기본 배지, sucrose 3%, 0.5 mg/l TDZ가 적합함
- 나. 칼라 형질전환체 선발을 위하여 카나마이신 최적농도 구명시험결과 캘러스 및 성장점이 포함된 shoot의 카나마이신 적정 농도는 100 mg/l임
- 다. Particle bombardment는 2회 실시하였으며 1차에서는 ZaMV CP gene이 도입된



그림 5. 비대 배지에 치상 하여 배양중인 pCKGFPS65C plasmid 도입 칼라

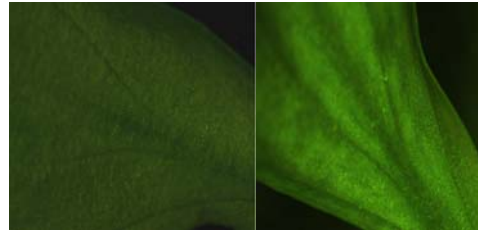


그림 6. GFP gene이 도입된 칼라잎의 형광발현(우)

- plasmid를 bombardment 하였고, 2차에서는 pCKGFPS65C를 bombardment
- ZaMVCP 유전자를 도입한 식물체들은 shooting시킨 후 카나마이신 배지에서 selection하여 비대배지에서 배양 중에 있음
 - pCKGFPS65C백터를 도입하고 shooting 된 개체들은 GFP 발현을 보기 위하여 비대 배지에서 배양 중이며 일부 온실 순화 식물체 중 4개체에서 GFP 단백질의 형광발현 확인

5. 금후계획

- 칼라에 ZaMVCP 유전자 도입 효율증진을 위한 최적의 bombardment 조건 구명
- bombardment 후 기내에서 배양중인 칼라 식물체의 온실 순화 및 유전자 도입 확인 및 저항성 발현정도 조사
- 바이러스저항성 칼라 품종 육성 (논문 및 산업재산권, 2005)