

과 제 구 분	경상기본	Code: LS0201	수행구분	전반기	연구기간	'02 ~ '05(완결)
연구 과제명	생명공학기술 실용화 연구				과제책임자	권 순 배
세부 과제명	「칼라」 바이러스 저항성 식물체 육성 연구					
연구원별임무						
구 분	소 속	성 명	담 당 임 무			
세부과제 책임자	농산물이용시험장	권순배	연구과제 총괄수행			
공동연구자	"	허수정	조직배양			
		이경아	형질전환			
		장순자	조직배양 보조			
		김경희	연구 방향 설정			
색인용어	칼라(<i>Zantedeschia</i> spp.)형질전환, Particle bombardment.					

ABSTRACT

This study was performed to produce ZaMV coat protein gene harboring ZaMV resistant calla lily by particle bombardment. From the kanamycin resistant study, it was suitable for 200 mg/L kanamycin to callus selection and 50 or 100mg/L to plant selection. Particle bombardment was carried out 7 times and the occurrence rate and existence ratio of the individual was highest from condition of 1 μ m, 9 cm, 1100 psi. The plasmid pGZaMVCP, pCKGFPS65C and pMDGFP was introduced to callus and growing point of calla lily using particle bombardment. After the bombardment, few plants selected by kanamycin selection showed that the efficiency of bombardment method was low from the transformation of calla lily. The introduced genes were identified by PCR analysis of genomic DNA with 35S promoter detection primer and we could confirm from the band of 350 bp. Also we confirmed the green fluorescence of the GFP protein from the pMDGFP introduced plants and pCKGFPS65C introduced callus.

1. 연구 배경

칼라는 남아프리카가 원산지인 화훼식물로 천남성과(Araceae)에 속하는 구근 식물이다. 우리나라에는 몇 가지 품종의 칼라(*Zantedeschia* spp.)가 뉴질랜드, 오스트레일리아와 네덜란드 등지에서 도입되어 재배되고 있다(고정애 등, 1996; 농촌진흥청, 1999; 정병찬 등, 2002). 재배시 노동력이 적게 들고 연중 생산이 가능하며 관상의 대상인 화포의 모양이 뛰어나 분화와 절화 등 화훼 분야에 이용가치가 높다. 따라서 국내에서는 재배면적과 수출이 늘어나는 추세이며 강원도에서도 유색칼라가 재배되고 있다. 그러나 2000년 이후로 강원지역의 칼라 재배 포장에서 바이러스병 및 세균성 연부병의 발생이 심하여 내병성품종의 육성 필요성이 제기되고 있다.

본 연구에서는 유전공학기술인 Particle bombardment법을 이용하여 칼라에 형질전환을 시도함에 있어 kanamycin 내성검정, gold particle bombardment의 적정조건 탐색, 형질전환 식물체내의 GFP 발현을 조사하였다. 또한 바이러스병 저항성 칼라 식물체 육성을 목적으로 칼라 바이러스병 병원체인 *Zantedeschia mosaic virus* (Kwon *et al.*, 2002)의 외피단백질 유전자(ZaMV-CP)가 삽입된 형질전환벡터를 구축하여 형질전환시험을 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 식물재료

칼라(*Zantedeschia* spp.) 품종인 골든 어페어(Golden Affair, GA), 블랙 매직(Black Magic, BM) 및 오렌지 엘리트(Orange Elite, OE)를 사용하였다. 성장점을 기내로 도입하기 위하여 화분에 있는 괴경의 눈 부분을 작게 잘라서 걸쭉질과 이물질들을 벗겨내고 Tween-20을 조금 넣은 물에 세척하고 흐르는 물로 여러 번 행군 후 70% 에탄올로 표면 살균하고 1% NaOCl로 10분간 소독하고, 멸균수로 여러 번 행구어 제균제를 완전히 세척하고 멸균 여과지 위에서 말린 후 성장점을 채취하였다. 채취한 성장점은 배지에 치상 하여 Particle Bombardment에 사용하거나 캘러스를 유도하는데 사용하였다. 캘러스를 유지 하는 데는 MS 기본 배지, sucrose 3%, 0.5 mg/L Thidiazuron(TDZ)를 사용하였다.

나. 카나마이신 저항성 검정

칼라의 카나마이신 내성정도를 조사하기 위하여 0.5mg/L TDZ를 첨가한 MS배지에 카나마이신을 50, 100, 150, 200, 300mg/L을 첨가하여 성장점 유래 캘러스를 치상하였고, 4주 후 식물체 상태를 조사하여 추후 형질전환체 선발을 위한 적정농도를 선정하였다.

다. 형질전환 벡터

형질전환에 사용된 벡터는 3종으로 pCKGFPS65C 및 pMDGFP는 각각 pUC 및 pBI 121에 GFP reporter 유전자를 포함하며, 칼라모자이크바이러스 외피단백질유전자(ZaMV-CP)를 삽입한 pGreen 벡터(pGZaMVCP)를 구축하였다.

라. Particle bombardment

Bio Rad 사의 PDS1000/He Particle Delivery System을 사용하여 벡터 DNA 피복입자를 투사하였다(Kemper *et al.*, 1996). Particle bombardment를 위한 재료는 particle의 투과가 용이하도록 배지를 부은 plate의 중심에 직경 3 cm 안으로 치상하였는데 캘러스는 플레이트 당 5-6개, 성장점은10개를 치상하였다. 3종의 형질전환 벡터를 이용한 particle bombardment 시험은 총 7차 수행하였다(표 1). 1차 particle bombardment 에서는 GA 캘러스와 BM 성장점에 pGZaMVCP DNA를 투사하였다. 최적의 bombardment 조건을 잡기 위하여 gold particle size(1, 1.6 μ m), target distance(6, 9cm), 챔버내 압력(1100, 1350psi)을 조합하여 8 조건으로 실험하였다. Bombardment 후 4주간 항생제 없는 배지에서 shoot를 유도시킨

후 카나마이신 100 mg/L가 포함된 선발배지에 치상하여 선발하였다. 2차 particle bombardment에서는 GA 캘러스와 성장점에 pCKGFPS65C DNA를 1차 와 동일하게 8조건으로 bombardment 하였다. pCKGFPS65C 벡터는 항생제 저항성유전자가 없는 벡터이므로 항생제 없는 plate에서 4주간 shoot를 유도한 후 비대배지(6% sucrose, MS, activated charcoal)에서 괴경 생성을 유도하였다. 3차~7차 실험에서는 1 μ m, 9cm, ,1100psi의 조건으로 형질전환을 실시하였다.

<표 1> Particle Bombardment 수행 횟수와 품종 및 도입 유전자

형질전환 수행 회수	품 종	도입 유전자
1	GA, BM 성장점	pGZaMVCP
2	GA, GA 성장점	pCKGFPS65C
3	GA,OE 캘러스	pGZaMVCP
4	GA, OE, BM 캘러스	pGZaMVCP
5	GA, OE, BM 캘러스	pGZaMVCP
6	GA, BM 캘러스	pGZaMVCP
7	BM 캘러스	pMDGFP

마. 순 화

식물체를 배양병에서 꺼내어 잘 씻어 배지를 제거하고 시판상토(코크피트 : 피트모스 : 펄라이트 = 6.5 : 1.5 : 2.0)를 담은 포트(\varnothing 10cm)에 심은 후 50% 차광막을 덮어 그늘과 상대습도를 유지하되 적절히 차광막을 여닫아 주면서 원하는 재료를 얻을 수 있을 정도의 크기로 식물체를 성장시켰다.

바. 식물체로부터 DNA의 추출

Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide(CTAB)를 사용하는 CTAB법을 이용하여 식물체로부터 DNA를 추출하였다. 온실에서 순화한 칼라의 잎 약 0.3 g을 micro centrifuge tube에 넣고 액체질소로 급속냉동한 후 pellet pestle로 마쇄한 후 CTAB 용액을 600 μ l 넣어 잘 섞어준다. 이것을 65 $^{\circ}$ C water bath에 30분간 두었다가 실온에서 5분간 안정화 시킨 후 chloroform : isoamyl alcohol = 49 : 1 용액을 넣어 30회 inverting 하고 Hanil, Micro17R 원심분리기를 사용하여 실온, 13,000 rpm에서 20분간 원심분리 한 후 상층액 500 μ l를 취한다. 상층액과 동량으로 chloroform : phenol = 1 : 1 용액을 넣고 30회 inverting 한 후 실온에서 10분간 원심분리 한다. 상층액 400 μ l를 새 튜브에 회수하고 -20 $^{\circ}$ C ,800 μ l의 absolute ethanol과 40 μ l의 3M NaOAC를 섞어준 후 -70 $^{\circ}$ C에 30분간 두어 DNA를 침전시킨다. 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 원심분리 하여 얻어진 pellet에 -20 $^{\circ}$ C의 70%에탄올을 1 ml 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리 한다. 남은 pellet은 vacuum drier로 3분간 건조하거나 실온건조한 후 50 μ l의 3차 멸균수를 더해 잘 녹여 실험에 사용하거나 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

사. PCR을 통한 형질전환체 선발

식물체 내 유전자 도입 여부를 확인하기 위하여 식물체에서 추출한 genomic DNA를 PCR로

분석하였다. 35S promoter에 특이적이며 약 340 bp의 단편이 증폭되도록 upstream primer (5'-GGTGGAGCACGACACACTTGT-3')와 downstream primer(5'-CCCTTACGTC AGTGGA GATATC-3')를 제작하였다. 50 μ l 반응액에 buffer, 25 mM MgCl₂, 2.5 mM dNTP, 10 pM primer, 1 unit의 Taq DNA polymerase와 genomic DNA를 넣고 반응시켰다. PCR 반응은 95°C에서 3분간 pre-denature 하고 증폭반응(95°C 30초, 52°C 30초, 72°C 40초)을 30회 진행하였으며 최종 신장 반응을 72 °C에서 10분 실시하였다. PCR 산물은 0.8% agarose gel 상에서 50V로 약 40분 간 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 UV 하에서 확인하였다.

아. GFP 형광발현을 통한 형질전환체 선발

GFP발현벡터를 도입하여 순화한 식물체에서 형질전환 여부를 확인하기 위해 암실에서 형광 현미경(Zeiss Universal Microscope, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 카나마이신 저항성 검정

카나마이신 저항성을 이용한 형질전환체 선발을 위하여 캘러스의 저항성 검정을 2회 실시한 결과 카나마이신 200 mg/L 처리구에서 4주후에 80%이상 캘러스가 갈변되거나 고사 하였으므로 캘러스의 선발에는 200 mg/l의 카나마이신 농도가 적당하였다(표 2).

<표 2> 칼라 캘러스의 카나마이신 저항성 검정 결과

반복시험 회수	카나마이신 농도(mg/l)	치상한 캘러스 수(개)	건강한 캘러스 수(개)	갈변, 고사된 캘러스 수(개)	생존율 (%)
1	50	50	30	20	60.0
	100	50	30	20	60.0
	200	40	5	35	12.5
2	50	25	25	0	100.0
	100	25	20	5	80.0
	150	25	20	5	80.0
	200	25	5	20	20.0

생장한 식물체를 항생제 테스트에 적용하기 위하여 카나마이신농도 50 - 300 mg/l 범위에서 50 mg/L 간격으로 저항성을 검정하였다 (표 3). 그 결과 150 mg/L 이상의 농도에서는 모든 개체들의 shoot와 뿌리가 발생하지 않아 성장하지 못하였다. 그러나 100mg/L 에서는 20개의 개체 중 4개의 개체가 자라나 20% 가 생존하였고 50 mg/L 에서는 8 개체로 40%가 생존하였다. 이런 경우 강선발에는 100 mg/L 농도가, 약선발에는 50mg/L 농도를 적용하는 것이 좋을 것이라 사료되었다. Kanamycin에 대한 내성의 정도는 식물체마다 각기 다르다. 십자화과 채소는 대부분 50mg/L이하의 저농도에서 내성을 갖고(Sohn *et al.* 1991; Kim *et al.* 1998), 페튜니아의 경우 같은 앞조적을 사용하더라도 내성정도가 다른

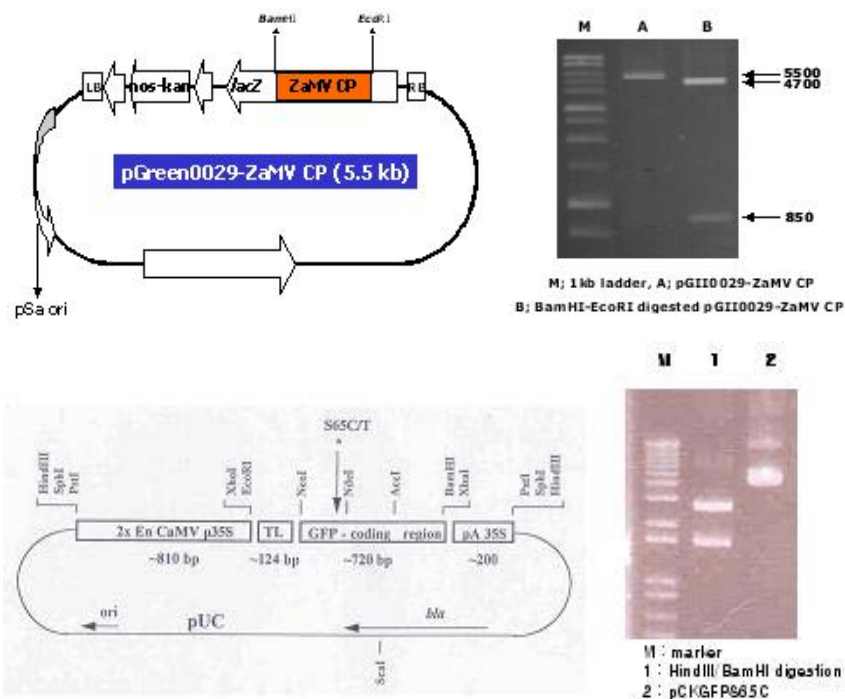
경우도 있다. (Ko *et al.* 2001), 카나마이신 100mg/L에서 선발된 식물체로는 카네이션(Yu *et al.*, 1996)이 있다.

<표 3> 칼라 식물체의 카나마이신 저항성 검정 결과

카나마이신 농도 (mg/L)	치상한 shoot 수(개)	완전히 자란 shoot의 수(개)	자라지 못한 shoot의 수(개)	생존율 (%)
50	20	8	12	40.0
100	20	4	16	20.0
150	20	0	20	0
200	20	0	20	0
250	20	0	20	0
300	20	0	20	0

나. 형질전환 벡터 구축

형질전환에 사용된 벡터 중 pCKGFPS65C 및 pMDGFP는 서울여자대학교(류기현 교수)에서 연구용으로 분양받아 사용하였고 칼라모자이크바이러스 외피단백질유전자(ZaMV-CP)를 삽입한 pGZaMVCP는 바이러스저항성 칼라 육성을 위하여 구축하였다 (그림 1).



[그림 1] 형질전환 벡터의 구축

상 : ZaMV CP gene이 도입된 pGZaMVCP 벡터

하 : pCKGFPS65C 벡터

다. Particle bombardment를 이용한 형질전환

1) 1차 bombardment

ZaMV CP 유전자 도입 1주일 후 카나마이신 100 mg/L 가 포함된 배지에 치상하여 selection하였으나 shooting율이 매우 낮아 다시 카나마이신 없는 배지에 치상하여 다수의 shoot를 발생시켰다. 이렇게 발생한 1,000여 개체들을 카나마이신 100 mg/L가 들어있는 배지에 분리 치상하여 선발하고 선발된 개체는 6% sucrose, MS 비대배지에서 배양하였다. 비대배지에서 3개월 이상 배양하였으나 괴경이 잘 생성되지 않았고 건강하게 성장하지 못하였다. 성장한 개체는 PCR 분석에 사용하였다.



[그림 2] 1차 Particle Bombardment 후 실험 과정

A, B : 항생제가 없는 배지에서 식물체의 발생

C, D : 카나마이신 100 mg/L 배지에서의 선발

E, F : 카나마이신 선발 후 비대배지에서의 성장

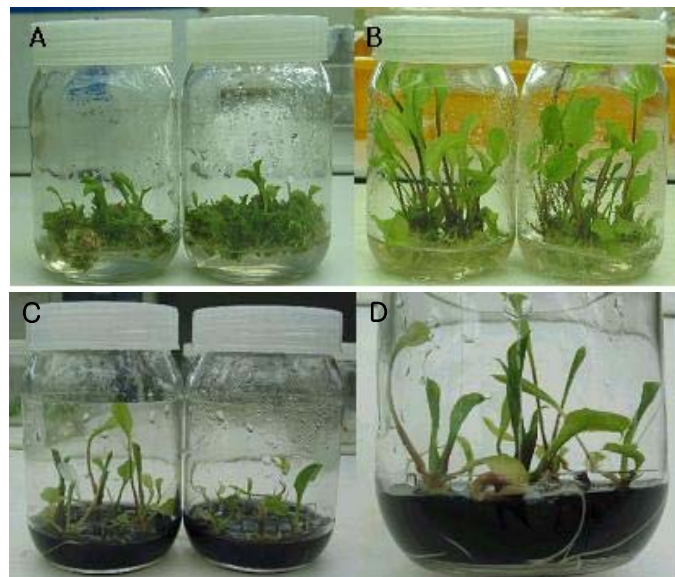
카나마이신 선발 배지에서는 shooting율이 매우 낮았는데 이는 유전자가 도입되지 않았거나 bombardment 후 캘러스가 약해져 있는 상태에 강선발의 항생제 농도를 사용하여 낮은 형질전환율이 masking되었을 수 있다고 생각되었다(그림 2). 따라서 항생제 없는 배지에서 shoot를 유도하여 이를 카나마이신 selection에 도입하는 delayed selection을 진행하였다. 항생제 없는 배지로 옮긴 후 발생한 천여개의 개체들을 카나마이신 선발 한

결과 불과 몇 개체만이 선발되었다. 이것은 bombardment법을 통한 칼라의 형질전환율이 매우 낮다는 것을 알 수 있었다.

발생한 개체들을 순화가 용이하도록 괴경을 형성시키기 위해 6% sucrose의 MS 비대배지에서 배양하였다. 비대배지에서 3개월 이상 배양하였으나 완전한 형태의 괴경이 형성되지도 않았고 당 농도가 높아 shoot도 건강하지 못하였다. 이처럼 칼라를 비대배지에서 성장시킬 경우 괴경의 생성과 순화에 긴 시간이 걸리고 고당의 영향으로 건강하게 성장하지 못하므로 형질전환체가 비대배지에서 소멸되어버릴 수도 있어 효율적인 방법은 아니라고 생각되었다. 괴경이 완전히 생성된 개체는 순화한 후 PCR 분석에 사용하였는데 장기간 비대배지에서 스트레스를 받은 영향으로 순화 시에도 건강하게 성장하지 못하였다.

2) 2차 bombardment

pCKGFPS65C plasmid를 bombardment한 후 항생제가 들어있지 않은 0.5 mg/L TDZ, 3% sucrose, MS 배지에 치상하여 4주간 shoot를 유도하였는데 1차와 마찬가지로 매우 활발하게 shooting 되었으며 많은 수의 개체를 얻을 수 있었다. 이렇게 발생한 개체를 각각 떼어내어 activated charcoal, 6% sucrose, MS 비대배지로 옮겨 성장시켰다 (그림 3).



[그림 3] 2차 bombardment 후 실험 과정

A, B : Bombardment 한 캘러스에서 활발한 shooting

C, D : 비대배지로 옮긴 후의 성장

2차에서는 비대배지에 활성탄을 넣어 빛을 차단하고 장기간 배양될 경우 발생하는 잔여 물질을 흡착하는 등 성장에 좋은 조건을 만들어 주었다. 활성탄을 넣지 않았을 때와 다르게 잎의 황화현상이 없고 뿌리도 튼튼하며 키도 좀더 자라는 등 생장이 좋았으나 역시 괴경이 완전한 모양으로 크게 성숙하지는 않았다. 따라서 비대배지에 활성탄을 넣으면 생장은 좋아지나 괴경의 형성에는 큰 영향을 주지 못하는 것을 알 수 있었다. 비대배지에서 성장된 개체들은 1차

보다는 기내 생장이 좋아서 순화과정에서도 보다 건강하게 외부 환경에 잘 적응하였다.

3) 3~7차 bombardment

3~7차의 bombardment 후에는 순화 후 post selection을 진행하기로 하여 항생제가 없는 배지에서 성장시킨 후 순화하고 PCR 분석 하였다. 이 중 기내에서 발생하는 OE와 GA의 일부 shoot를 PCR 분석에 사용하였다.

Bombardment를 진행할 때는 보통 캘러스 덩어리를 적당한 크기로 잘라 배지에 치상한 후 바로 실험을 진행하므로 식물체가 상처를 회복할 시간이 주어지지 않으며 bombardment 과정 또한 캘러스에 충격을 주기 때문에, 여러 가지 실험 조건 중 위의 조건에서 생존율이 가장 좋은 것으로 보아 캘러스에 가장 안정된 상태를 제공하는 것으로 판단되었다. 캘러스 덩어리를 치상한 후 상처의 치유와 안정화를 위해 며칠동안 배양한 후 bombardment에 적용하기도 하였는데 칼라의 캘러스는 3주에 한번씩 계대배양을 해야 할 만큼 생육이 매우 왕성하고 shoot도 금세 자라나서 bombardment 실험에 사용하기에 적합하지 않았다.

라. 식물체의 순화



[그림 4] 칼라의 순화과정

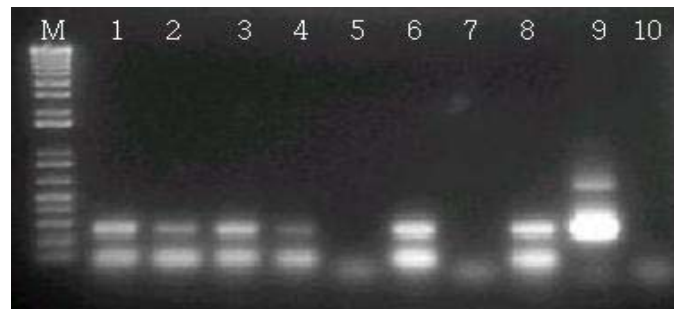
- A. 캘러스에서의 shooting
- B. 발생한 개체를 배양병으로 옮겨서 성장시킴
- C. 배지를 깨끗이 닦아낸 후 뿌리부분을 물에 담금
- D. 앞의 건조를 막기 위해 심기 전까지 랩을 덮음
- E. 포트에 심은 후 차광
- F. 건강하게 성장한 식물체

배양병 안에서는 shoot의 길이가 5 cm 이상으로 크며, 괴경 부분에 붙은 뿌리가 많지는 않으나 굵고 길어 건강하게 성장한 칼라는 순화하면 90% 이상이 생존하였다. 그러나 뿌리가 건강하지 못하거나 잎의 기형 등 기내에서의 생장이 나쁜 식물체는 순화 시 생존율이 20% 정도로 매우 낮았다. 그리고 1차와 2차 bombardment 후 비대배지에서 근을 비대 시킨 경우는 순화 시 생존율이 50% 가량이었다. 이런 결과로 보아 순화하기 전 비대배지에서 구근을 형성시키는 나리의 경우와는 다르게 칼라는 괴경의 형성 보다는 shoot와 뿌리를 건강하게 생육시켜 순화하는 것이 생존율을 높이는데 적합한 것으로 판단되었다. 토양 순화 4개월 후에는 완전한 괴경이 형성되었고 포장에 정식해도 잘 자랐다.



[그림 5] 약 4개월간 순화한 GA 조직배양체의 구근 형성

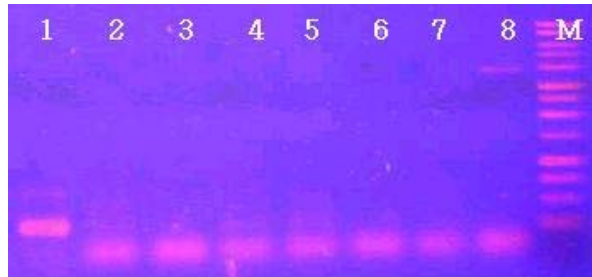
마. 형질전환체 선발



[6] . PCR 확인 결과

- Lane 1 : 온실 순화칼라 GA pCKGFPS65C 1~7(2nd Bomb.)
- 2 : 온실 순화칼라 GA pCKGFPS65C 8~14(2nd Bomb.)
- 3 : 온실 순화칼라 GA pCKGFPS65C15~21(2nd Bomb.)
- 4 : 온실 순화칼라 GA pCKGFPS65C22~28 (2nd Bomb.)
- 5 : 온실 순화 *N. benthamiana* ZGMMVCP
- 6 : 온실 순화칼라 GA pGZaMVCP gene #51,52 (1st Bomb)
- 7 : 기내칼라 OE pGZaMVCP gene (3rd Bomb.)
- 8 : 기내칼라 GA pGZaMVCP gene (3rd Bomb.)
- 9 : positive control (pMDGFPS65C)
- 10 : negative control (*N. benthamiana*)

35S promoter detection primer를 사용하여 PCR 한 결과 2차로 pCKGFPS65C를 도입한 온실 순화 GA, 1차로 pGZaMVCP를 도입한 온실 순화 GA 및 3차로 pGZaMVCP를 도입한 기내 GA에서 350 bp의 밴드를 확인하였다(그림 6).



[그림 7] 4, 5차 bombardment 한 BM 식물체 중 순화한 개체의 PCR 결과
Lane 1 : Positive control, 2~6 : 온실순화 BM pGZaMVCP gene
7 : Negative control, 8 : Positive control, M : Marker

4, 5차 bombardment에서 ZaMV CP gene이 삽입된 pGZaMVCP를 도입한 GA 500여 개체, BM 600여 개체, OE 400여 개체와 GFPgene을 가진 pMDGFP를 도입한 약 300 개체를 온실에서 순화한 후 35S promoter detection primer를 이용하여 PCR로 유전자 도입 여부를 확인하였다. 그 결과 ZaMVCP gene을 도입 한 BM 2, 4, 5번 lane에서 약 350 bp의 밴드를 확인하였다(그림 7).

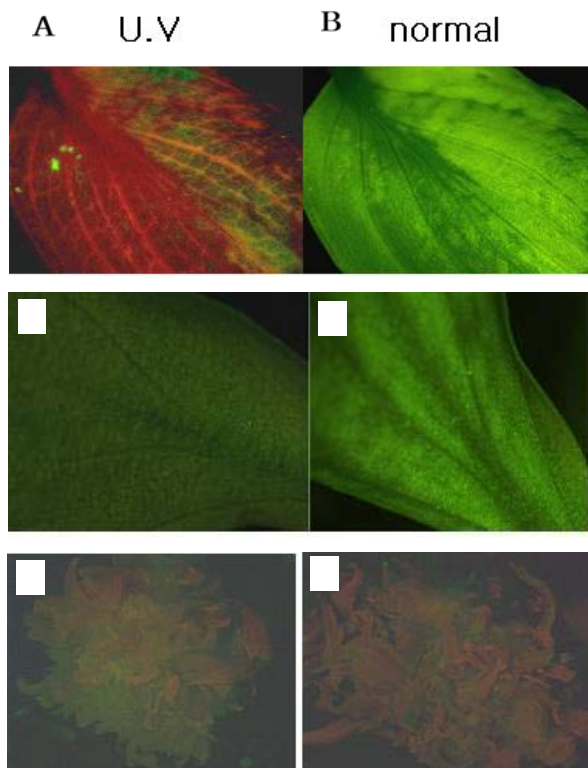


그림 8. Bombardment로 형질전환 된
칼라 식물체의 형광발현 확인
A, B, C, D : pCKGFPS65C가 도입된
GA의 형광 발현
E, F : pMDGFP가 도입된 BM
캘러스의 형광발현

2차로 bombardment한 칼라 중 일부를 비대배지에 치상하지 않고 토양에 순화하여 성장시킨 후 GFP 형광 발현을 조사한 결과 75 개체 중 4 개체에서 형광 발현을 확인하였고 pMDGFP를 bombardment한 BM 캘러스에서도 위와 같이 형광발현을 확인하였다(그림 8).

그러나 PCR 결과 형질전환체로 확인되었던 식물체를 5개월간 포트에서 성장시킨 후 PCR로 재확인 했을 때, 그리고 형광발현이 확인되었던 식물체를 3개월 후 PCR로 재확인한 경우에는 밴드가 나타나지 않았다. 이는 도입된 유전자가 식물체의 genome에 안정적으로 삽입되지 않아 degradation된 결과로 추측된다. 따라서 칼라에 안정적으로 외래유전자의 형질전환을 위해서는 bombardment법 이외에 *Agrobacterium*법 등 유전자를 확실히 transform할 수 있는 형질전환법을 고려해 보아야 할 것으로 사료된다.

4. 적 요

칼라의 성장점 유래 캘러스는 multi-shoot 형태로 MS 배지, sucrose 3%, 0.5 mg/L TDZ 배지에서 유지하며 모든 형질전환 실험에 사용하였다. 형질전환체 선발에 사용할 적정 카나마이신 농도의 구명 시험결과, 캘러스의 선발에는 200 mg/L, 식물체로부터 선발 시에는 50~100mg/L 농도가 적당하였다. 1차 bombardment에서는 pGZaMVCP plasmid를 GA 캘러스와 BM의 성장점에 bombardment 하여 항생제가 없는 배지에서 shoot를 유도시킨 후 카나마이신 선발 하는 delayed selection을 하였다. 발생한 개체들을 카나마이신 100mg/L 에서 선발한 결과 불과 몇 개체만이 선발 되어 bombardment법을 통한 칼라의 형질전환율이 매우 낮다는 것을 알 수 있었다. 선발 된 개체들을 6% sucrose의 MS 비대배지에서 3개월 이상 배양하였으나 괴경이 완전한 형태로 생성되지도 않았고 shoot도 건강하지 못하였다.

2차 bombardment 에서는 pCKGFPS65C plasmid를 GA의 캘러스와 기내 발생 성장점에 bombardment하여 항생제가 없는 배지에서 shoot를 유도한 후 activated charcoal, 6% sucrose, MS 비대배지에서 성장시켰다. Activated charcoal은 식물체의 생장은 좋아지나 괴경의 형성에는 크게 좋은 영향을 주지는 않았다. 즉 기내 배양한 유식물체를 비대배지에서 괴경을 유도한 경우 기내에서의 성장도 좋지 않고 괴경도 완전히 형성되지 않았을 뿐더러 순화해도 생존율은 50% 수준에 불과했지만, 뿌리와 shoot만 건강하게 성장시켜 순화 하면 90% 이상의 생존율을 보였고, 토양 순화 4개월 후에는 완전한 괴경이 형성되었다.

Particle bombardment의 최적조건으로는 개체의 발생률과 생존율에서 1 μ m, 9 cm, 1100 psi의 조건이 가장 좋았다.

형질전환체를 35S promoter detection primer로 PCR 한 결과, 1차 bombardment로 pGZaMVCP를 도입한 온실 순화 GA와 2차로 pCKGFPS65C를 도입한 온실 순화 GA 및 3차로 pGZaMVCP를 도입한 기내 GA 그리고 4, 5차 bombardment로 pGZaMVCP를 도입한 BM의 몇 개체에서 350 bp의 PCR 밴드를 확인하였고, pCKGFPS65C를 형질전환시킨 칼라 식물체 중 일부 개체에서 형광단백질(GFP)의 발현을 확인 할 수 있었다.

5. 인용문헌

- Kim, K., J. D. Jung, G. H. An and K. H. Kim. 1998. Transfer and expression of a tomato inhibitorII and beta glucuronidase fusion gene in flowering cabbage. Kor.J. plant Tissue Culture 25 : 37-43.
- Kemper, E. L.,m de Silva, M, J. and Arruda, P. 1996. Effect of microprojectile bombardment parameters and osmotic treatment on particle penetration and tissue damage in transiently transformed cultured immature maize (*Zea mays* L.) embryos. Plant Sci., 121 : 85-93.
- Ko, J. A., Y. S Kim and H. S. Kim. 2001. Production of transgenic petunia hybrida using Agrobacterium mediated transformation. Plant Res. 4 : 36-40.
- 고정애, 김영선, 은종선. 1996. 칼라의 약배양에 의한 배발생 및 식물체 재분화. 한원지 37(3) : 468-474.
- Kwon, S.B., J.H. Ha, J.Y.Yoon, K.H.Ryu. 2002. *Zantedeschia mosaic virus* causing leaf mosaic symptom in calla lily is a new potyvirus. Arch Virol 147:2281~2289.
- 농촌진흥청. 1999. 수출화훼재배기술 “칼라” : 118-126.
- Sohn, J.K. and H. S. Cho. 1991. transformation of Brassica napus using cotyledon tissue cocultured with agrobacterium tumefaciens. Kor.J. plant Tissue Culture 18 : 113-118.
- 정병찬, 노희선, 조병욱, 김종화. 2002. 강원우위 신화종 칼라개발연구. 강원도농업기술원 시험연구보고서 : 729-744
- Yu, S. N. and K.M Bae. 1996. Introduction of CarMV coat protein gene into carnation by Agrobacterium tumefaciens. Kor.J. plant Tissue Culture 23 : 1-7.

6. 연구 결과 활용 제목

- Particle bombardment법을 이용한 유색칼라의 형질전환체 육성 기초자료.