

석사학위논문

헤이워드 참다래 엽조직의 신초 재분화와
Agrobacterium 이용 형질전환

제주대학교 대학원

원예학과



2003년 12월

헤이워드 참다래 엽조직의 신초 재분화와 Agrobacterium 이용 형질전환

지도교수 송 관 정
김 보 경

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함.

2003년 12월

김 보 경의 농학 석사학위 논문으로 인준함.

심사위원장 _____



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

위 원 _____

위 원 _____

제주대학교 대학원

2003년 12월

Adventitious Shoot Regeneration and
Agrobacterium -mediated Transformation from
Leaf Tissue of 'Hayward' Kiwifruit

Bo-Kyong Kim

(Supervised by Professor Kwan Jeong Song)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF
AGRICULTURE

DEPARTMENT OF HORTICULTURE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

목 차	i
Summary	ii
List of Tables	iv
List of Figures	v
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 식물체 재료	4
2. 재분화	4
3. 형질전환	5
4. 형질전환체 검정	7
III. 결과 및 고찰	8
V. 적 요	19
VI. 참고문헌	21
VII. 감사의 글	26

SUMMARY

This study aimed to establish the efficient regeneration *Agrobacterium*-mediated transformation systems from leaf tissue of 'Hayward' kiwifruit. Related to adventitious shoot regeneration from leaf tissue of microshoots, some factors including the concentration and kinds of plant growth regulators, the solidifying agents of medium, the size and parts of leaf blade and leaf petiole, and the wounding methods and the response against antibiotics were investigated. The regeneration responses were evaluated for callus growth, regeneration rate, shoot formation, and shoot quality. Also, the *Agrobacterium*-mediated transformation was conducted with the regeneration system determined from the study.

Regeneration response of leaf blade explants evaluated for regeneration rate, shoot formation, and shoot quality indicated that an efficient regeneration condition resulted from $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ and $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA. Compared with TDZ, zeatin, and BA, TDZ and zeatin resulted in higher regeneration response than BA, but there was little difference between each other. Solidifying agents with gelrite and agar also affected little regeneration response. The smaller in leaf size and more near to base of leaf blade, the higher regeneration the explants resulted in.

In regeneration response from leaf petiole explants with TDZ, zeatin, and BA, zeatin indicated the highest regeneration and TDZ and BA followed the next in this order. Shorter petioles in size indicated higher regeneration than that of the longer ones. Compared with wounding methods, cutting half of petiole longitudinally showed higher regeneration rate at almost same level of leaf blade explants and the regeneration rate decreased in the wounding of toothed wheel type and control in this order.

Regeneration response of leaf blade and petiole explants against kanamycin was

similar and adventitious shoot regeneration and callus growth were inhibited at higher concentration of $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in leaf blade and in petiole explants, respectively. After infection with *A. tumefaciens* LBA 4404 and co-cultivation for 3 days, putative transformants were selected on regeneration medium supplemented with $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin and proliferated on multiplication medium. PCR analysis confirmed that the foreign genes were inserted to these plants.



List of Tables

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

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

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

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



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

List of Figures

Fig. 1. Schematic representation of the T-DNA of vector pBI 121.

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

Fig. 3. Regeneration response of explants with different leaf sizes and parts from 'Hayward' kiwifruit in regeneration medium supplemented with $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ and $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA.

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

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

Fig. 6. Regeneration on selection medium and multiplication of putative transgenic shoots in 'Hayward' kiwifruit.

Fig. 7. PCR analysis of putative transgenic plants.

I. 서 론

참다래(kiwifruit, *Actinidia deliciosa*)는 다래나무 속에 속하는 중국 기원의 덩굴성 낙엽과수이다(Dunn, 1911; Li, 1952, 김, 2002). 1906년경 중국 야생종의 종자가 뉴질랜드로 도입되어 품종 선발이 이루어졌고 1930년대에 경제적인 재배가 시작되어 그 재배역사는 매우 짧은 편이다. 우리나라는 1977년에 삼수와 묘목이 도입되어 재배되기 시작하였다(Warrington 과 Weston, 1990). 참다래는 비타민 C와 루테인 등의 카로티노이드가 풍부하여 고급 과실로 인식되면서 1990년대 중반까지 그 재배와 생산이 1,471ha, 13,188톤으로 확대되어 왔다. 그러나 최근 참다래 산업의 경쟁력이 저하되면서 그 재배 및 생산은 점차 감소하여 2002년에 892ha, 10,974톤에 이르고 있다(과수 재배실태조사, 2002). 참다래는 궤양병에 약하고 과실은 잔털을 가지고 있고 저장성과 당도가 낮은 단점을 가지고 있다. 그러므로 경쟁력 강화를 위한 고품질의 기능성 신품종 육성이 시급한 실정이다.

일반적으로 과수는 유전자 조성이 매우 잡박하고 종자에서 꽃이 피어 과실이 결실하기까지 발육기간인 유년성이 존재하기 때문에 세대진전에 10년 이상이 요구되며, 식물체의 크기가 매우 커서 넓은 육종포장을 요구한다. 또한 참다래의 재배종은 6배체이고 염색체 수가 $2n=174$ 로 많은 편(Frédrique 등, 1994; Yan 등, 1994; Ferguson 등, 1996)이며, 자웅이주의 특성(Schmid, 1978; Ferguson, 1984; Hirsch 등, 1990; Warrington and Weston, 1990)을 가지고 있어 교배에 의한 우량계통의 선발과 특정 형질의 유전 연구가 어렵다(Zhang 등, 1983; Frédrique 등, 1994). 전세계적으로 유전자원 수집 및 평가, 형질의 유전분석 등에 대한 연구가 미흡하여 육종기반도 매우 취약한 편이다. 그러므로 참다래의 교배육종에 의한 신품종 개발에는 오랜 육종 기간과 많은 육종 비용이 필요하다(송, 2000). 따라서 교배육종을 보완하여 조기에 신품종 육성하는 생명공학 기술개발이 절실히 필요하다.

생명공학 기술은 조기선발을 위한 분자표지 이용과 유전자 도입에 의한 우량계통 및 품종 개발을 위한 형질전환 이용으로 구분할 수 있다. 분자표지

를 이용하는 분야에서는 random amplified polymorphic DNA (RAPD)를 이용한 암수의 구분(Harvey 등, 1997; Kim 등, 2002)과 형질의 유전분석을 위한 microsatellites 이용 유전자지도 작성이 연구(Roy 등, 1992; Koller 등, 1993; Susan 등, 1993)되고 있다. 형질전환 분야는 Uematsu 등(1991)과 Janssen과 Gardner(1993)가 '헤이워드' 품종에서 *Agrobacterium tumefaciens*을 이용한 형질전환 성공을 보고한 이래 내병성 품종 육성 연구 등(Kobayashi 등, 2000; Kusaba 등, 1999; Nakamura 등, 1999)이 다양하게 수행되고 있다.

형질전환은 특정 유전자를 세포 내로 도입하고, 이들 세포를 선택적으로 성장시키고 재분화시키는 과정으로 구분할 수 있다. 특정 유전자를 세포 내로 도입하는 방법에는 *Agrobacterium*을 이용하는 간접적인 도입과 유전자 총 또는 전기충격 등을 이용하는 직접도입 방식으로 구분할 수 있다. 그런데, *Agrobacterium*을 이용하는 방법은 유전자의 삽입이 안정적이고 비용이 저렴하며 간편하다는 장점을 가지고 있어 널리 이용되고 있다. *Agrobacterium*을 이용한 유전자 전이에는 기주와의 상호작용(Janssen과 Gardner, 1993), 균 배양 및 접종 조건(Song 등, 2002), 식물체의 genotype, 식물체 배양조건, acetosyringone의 농도 등이 관여하는 것으로 알려져 있다. 그리고 재분화는 형질전환체를 획득하기 위한 필수적인 단계이다. Thomzik(1995)에 의하면 형질전환 연구를 위해서는 20% 이상의 재분화율이 전제되어야 한다고 하였는데, 참다래의 경우는 품종, 조직, 배지 등에 따라 0~100%의 재분화율 차이를 나타내고 있다(Fraser 등, 1995; Gonzalez 등, 1995; Kim과 Oh, 1998; Revilia와 Power, 1988). 그러므로 재현성이 높은 형질전환 기술을 확립하기 위한 효율적인 재분화 체계의 확립이 요구되고 있는 실정이다. 이와 같이 뉴질랜드, 이탈리아, 일본 등 선진국의 활발한 유전공학 연구의 수행과는 달리 국내에서는 아직도 참다래 재분화와 형질전환에 대한 연구가 매우 미약한 실정이다(Kim과 Oh, 1998).

따라서 참다래의 엽 조직을 이용한 효율적인 재분화 및 형질전환 체계를 확립하기 위하여 성장조절물질의 조합과 농도, cytokinin의 종류, 배지 고형

물, 잎과 엽병의 크기와 부위별, 상처유도 방법, kanamycin의 농도에 따른 재분화 반응과 Agrobacterium을 이용한 형질전환 연구를 수행하였다.



II. 재료 및 방법

1. 식물 재료

기내로 도입하여 유지 및 증식 중인 ‘헤이워드’ 참다래 신초를 본 연구의 식물재료로 이용하였다. 참다래 신초의 증식은 4주 간격으로 수행하였다. 배양 신초의 잎을 제거하고 정아 또는 액아를 포함하도록 1~2 마디로 절단하여 계대 배양하였다. 계대배양을 위한 신초증식 배지는 MS 기본배지(Murashige와 Skoog, 1962)를 이용하였는데 $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 benzyladenine(BA), $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 indole-3-butyric acid(IBA), $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 자당, $8\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 agar를 첨가하여 pH 5.8로 조절하였다. 배양실의 온도는 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 광량은 $60\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 그리고 광주기는 16시간의 명 및 8시간의 암 상태로 유지하였다.

신초 계대배양 2~3주 후에 신초는 활발하게 성장하게 되는데, 이 후 자라나오는 연녹색의 어린 잎을 절취하여 엽신과 엽병으로 구분하여 재분화 및 형질전환 연구에 이용하였다.

2. 재분화

엽신 조직을 $7\text{mm} \times 7\text{mm}$ 크기의 절편체를 만들어 $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 자당과 0.25%의 gelrite가 첨가된 MS 기본배지(pH 5.8)에 IBA와 thidiazuron(TDZ)의 농도를 달리한 배지를 이용하여 신초의 재분화를 유도하였다. 처음 4주 동안은 암실에서 배양하였고, 이후 배지를 교체하여 16시간 명 및 8시간 암 상태의 광주기를 갖는 조건에서 4주 동안 추가 배양하였다. 성장조절물질은 0.0, 0.2, 0.4, $0.6\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IBA 4수준과 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, $4.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 TDZ 5수준을 조합하여 처리하였다. 배양 8주 후에 캘러스 발달 정도, 재분화율, 신초 발생 정도, 투명화 및 잎의 형성 등에 기준한 신초 소질을 평가하였다.

또한 zeatin, BA, 그리고 TDZ의 3종류 cytokinins와 gelrite 및 agar의 2종류 배지고형물에 대한 재분화 반응을 평가하였다. 이 경우에 성장조절물질의 농도는 $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 cytokinin으로 동일하게 처리하였다. 재분화 유

도는 MS 기본 배지에 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IBA와 $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 TDZ가 첨가된 agar 고형 배지를 이용하였다. 배지고형물의 처리는 agar의 경우 0.8%, 그리고 gelrite의 경우 0.25%로 수행하였다.

그 외에도 잎의 크기에 따른 부위별 재분화 정도를 평가하였다. 잎의 크기는 길이에 따라 1.5~2.0cm, 2.0~2.5cm, 2.5~3.5cm, 그리고 3.5~4.5cm의 4단계로 구분하였으며, 이를 다시 1.5~2.5cm의 경우에 3등분으로, 그리고 2.5~4.5cm의 경우에 4등분으로 절단하여 치상하였다. 재분화 유도는 MS 기본 배지에 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IBA와 $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 TDZ가 첨가된 agar 고형 배지를 이용하여 수행하였다.

엽병의 경우에는 cytokinins의 종류, 엽병의 크기와 엽병 절편체의 상처 유도 방법에 따른 재분화 정도를 평가하였다. 엽병의 크기는 0.5cm, 1.0cm, 1.5cm, 그리고 2.0cm 내외의 4단계로 구분하였다. 엽병 절편체에 대한 상처유도는 전체 엽병 둘레의 톱니식 부분절단, 종 방향 2등분, 그리고 대조구로 3개의 방식을 처리하였다. 재분화는 MS 기본 배지에 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IBA와 $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 TDZ가 첨가된 agar 고형 배지를 이용하여 수행하였다. 배양 8주 후에 캘러스 발달 정도, 재분화율, 신초 발생 정도, 그리고 신초 소질을 조사하였다.

3. 형질 전환

형질 전환은 아그로박테리움법(*Agrobacterium*-mediation)을 이용하여 수행하였다. 먼저 선발표지를 이용하기 위하여 항생제 농도에 따른 절편체의 반응을 분석하였다. 재분화 배지에 kanamycin를 0, 25, 50, 75, 100 및 $150\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 6수준을 처리하고 절편체를 치상한 후 암 상태에서 4주 동안 배양하였다. 배양 4주 후에 캘러스 형성, 신초 형성 및 조직의 갈변 정도를 평가하였다.

*Agrobacterium tumefaciens*의 strain은 binary vector pBI 121를 포함하고 있는 LBA 4404를 이용하였다. 이 벡터의 T-DNA 내부에는 선발표지로서 항생제 저항성 유전자인 nptII와 목적 유전자로 온주밀감(*Citrus unshiu*)의 과실로부터 클로닝한 카로티노이드 합성관련 CitPsy (phytoene synthase) 또는 CitChx (β -carotene hydroxylase)의 유전자(Ko, 2000)를 포함하고

있다(Fig. 1).

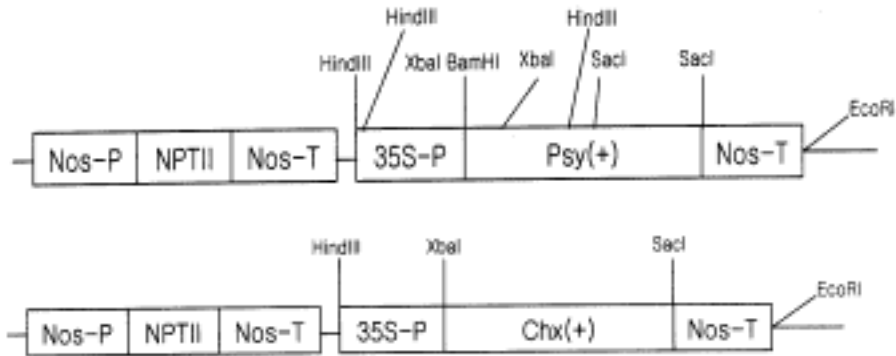


Fig. 1. Schematic representation of the T-DNA of vector pBI 121. Nos-P, nopaline synthase (NS) promoter; Nos-T, NS terminator; 35S-P, CaMV 35S promoter; NPTII, neomycin phosphotransferase Gene; Psy(+) and Chx(+), *phytone synthase* and β -*carotene hydroxylase* cloned from satsuma mandarin fruits, respectively.

형질전환을 위한 균의 배양은 Song 등의 방법(2000)을 따라 수행하였다. 먼저 LBA 4404의 균체를 $10\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin + $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ rifampicin의 항생제를 첨가한 고체 YEB 배지($5.0\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ peptone + $1.0\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ yeast extract + $5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $0.5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ MgSO_4)에 도말하고 28°C 에서 배양하여 단일 균체들을 형성시켰다. 이들 단일 균체 중의 하나를 액체 YEB 배지에 접종하여 28°C , 180 rpm 조건에서 A_{600} 0.7이 될 때까지 배양하였다. 배양한 균을 $3,000\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리한 후, 액체 재분화 배지(pH 5.2)(MS 기본배지 + $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ zeatin + $20\mu\text{M}$ acetosyrigone)에 A_{600} 0.7로 희석하였다. 이를 28°C , 180 rpm에서 최소 4시간 이상 배양한 후 접종에 이용하였다.

균 접종은 잎 절편체를 균 현탁액에 담가 22°C , 180 rpm에서 10분간 수행하였다. 접종 후 절편체는 멸균한 킴와이프스로 여액을 제거한 후 여과지가 깔린 공동 배양 배지에서 3일간 25°C 암 상태에서 공동배양을 수행하였다. 공동배양 배지는 MS 기본배지(pH 5.2)에 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA, $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ, $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose와 $20\mu\text{M}$ acetosyrigone을 첨가하고 0.25% gelrite로 고형화한 것을 이용하였다(Fraser

등, 1995).

공동배양 후 절편체는 선발 재분화 배지로 옮기고 암 상태에서 4주 동안 배양하였다. 4주 후 절편체는 배지를 교체하고 광 조건에서 배양하였다. 선발 재분화 배지는 MS 기본배지(pH 5.8)에 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA, $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ zeatin, $30\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose, $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin 및 $250\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cefotaxime을 첨가하고 0.8% agar로 고형화한 것을 이용하였다. 재분화된 개체는 항생제가 없는 신초 증식 배지에서 1~2회 증식시킨 후 $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin이 첨가된 신초 증식 배지에서 재선발하였고, 이를 형질전환체 검정에 이용하였다.

4. 형질전환체 검정

형질전환체 검정은 polymerase chain reation (PCR) 분석을 수행하였다. PCR 분석을 위한 식물체의 DNA 추출은 Dellaporta 등(1983)의 방법을 변형하여 DNA를 분리하였다. 유전자 증폭을 위한 primers로는 nptII 유전자에 대하여 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACT-3' & 5'-AATCT- CGTGATGGCAGGTTG-3'을, CitPsy 유전자에 대하여 5'-CGGACTGC- TGTGTTTAATTC-3' & 5'-TGCAGCATCAAGCATATCAA-3'을, 그리고 CitChx 유전자에 대하여 5'-GCACCCAGATCGAGAGCTTTC-3' & 5'-ACGAACATGTAGGCCATCCC-3'을 사용하였다. PCR 반응은 94°C 에서 2분간 DNA를 denaturation시킨 후, 94°C 1분간 denaturation, 60°C 1분간 annealing, 72°C 1분간 extension의 30회 반복 과정을 거친 다음, 72°C 에서 5분 동안 extension시킨 후 4°C 에서 안정화되도록 하였다 (Song 등, 2000). 증폭한 DNA 단편은 1% agarose gel 상에서 전기영동하여 EtBr로 염색 후 illuminator 상에서 ultraviolet를 조사하여 관찰하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

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

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

그런데 Kim과 Oh(1998)는 실생 묘의 엽육 유래의 부정아 및 엽병 유래의 캘러스로부터 MT 배지(Murashige와 Tucker, 1969)를 이용한 신초 재분화가 $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 TDZ에서 20.0%의 재분화율을 나타내었다고 보고하였다. 또한 Fraser 등(1995)은 LS 배지(Linsmaier과 Skoog, 1965)를 이용한 *Actinidia deliciosa*의 4개 품종에 대한 신초 재분화에서 TDZ의 경우는 재분화율이 낮을 뿐만 아니라 낮은 농도에서도 높은 투명화 현상이 나타난다고 하였다. 이는 본 연구결과와 큰 차이를 나타내는 것으로서 실생 또는 품종 등 식물체 genotypes의 차이에 의한 것인지, 또는 재분화 배지 종류의 차이에 기인한 것인지는 분명치 않았다.

Table 1. Effect of growth regulators (TDZ and IBA) combination and concentrations on regeneration from leaf explants in 'Hayward' kiwifruit.

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

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

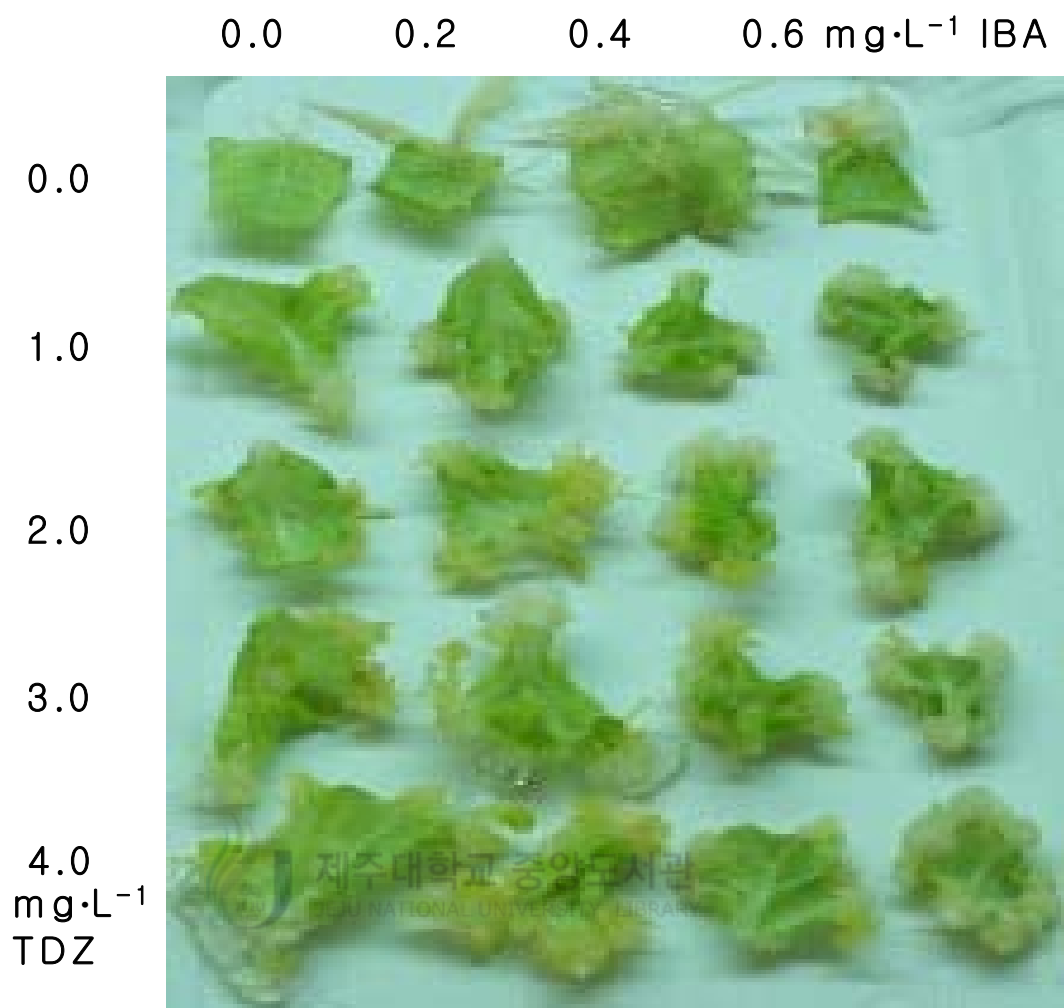


Fig. 2. Regeneration from leaf explants of 'Hayward' kiwifruit on RM medium with TDZ and IBA.

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

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

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

절편체당 재분화 신초의 발생은 2~5개 내외의 신초군을 형성하였고 정상 신초의 형성율도 양호한 편이었다. 신초 발생 정도와 신초의 소질을 고려할 때 '헤이워드' 참다래 엽신 절편체의 재분화를 위한 성장조절물질의 적정농도는 $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 TDZ와 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IBA로 판단되었다.

Gleddie(1989)는 *Arabidopsis*의 자엽과 배축을 기내배양하여 형태형성에 미치는 요인 중 중요한 변수는 사이토카이닌의 선택에 달려 있으며 그 중에서 TDZ와 zeatin, 그리고 BA의 영향을 비교해 보았다. 여기에 고형화 첨가물의 종류가 재분화에 어떤 영향을 미치는 결과를 Table 2에 나타내었다. Gelrite로 고형화된 배지에서 BA는 캘러스의 형성을 억제하는 것으로 나타났으나, TDZ와 zeatin에 비해 재분화가 낮고 신초 수가 적은 경향을 나타내었다. 그러나 TDZ와 zeatin에서는 90~100% 내외의 높은 재분화율을 나타내었는데, TDZ는 신초 발생을 촉진하고 zeatin은 신초 소질을 좋게 하는 경향을 보여 주었으나, 전체적으로 거의 차이가 없었다.

그런데 Kim과 Oh(1998)는 cytokinin 중에서는 zeatin이 가장 재분화 반응이 좋고 TDZ, BA의 순으로 신초의 재분화율과 신초 수가 감소한다고 하였다. 또한 Fraser 등(1995)은 zeatin이 신초 재분화율과 신초 소질면에서 가장 좋았고 BA, TDZ의 순으로 나빠진다고 하였다. 그러므로 zeatin에 대한 재

분화 반응이 BA보다 우수한 것은 본 연구결과와 일치하였으나, zeatin과 TDZ에 대한 반응은 큰 차이를 나타내었다. 그러나 이러한 차이는 식물체의 genotypes 또는 배지 종류의 차이에 기인한 것으로 생각되었다.

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

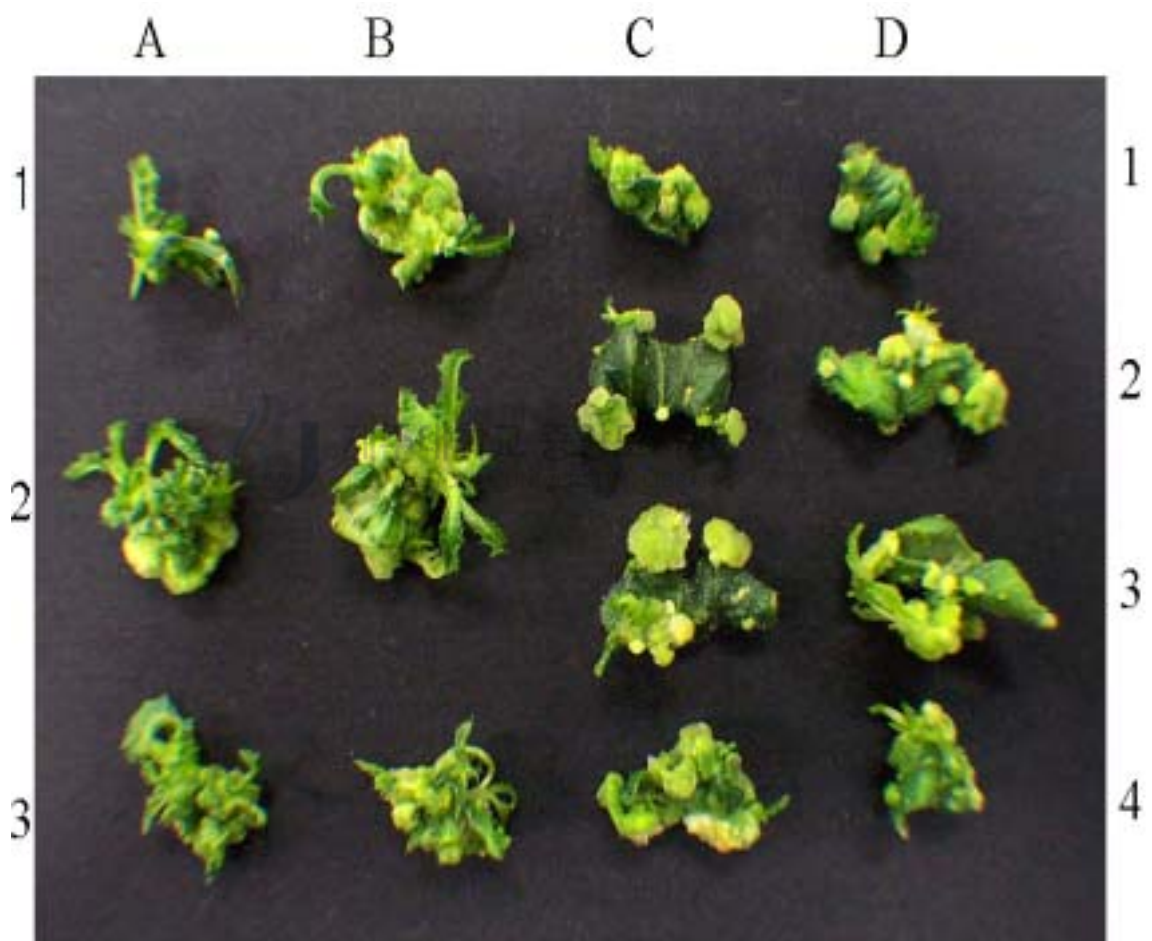


Fig. 3. Effect of size and cutting part from leaf of 'Hayward' kiwifruit on RM medium.

엽병 조직의 cytokinins 종류와 농도에 따른 재분화 반응은 Table 3 및 Fig. 4와 같다. TDZ, zeatin 및 BA의 종류 간에는 재분화 반응이 다르게 나타났으나, 종류별 농도 수준에 따른 재분화 반응은 거의 차이를 보이지 않았다. Zeatin의 경우 50~100% 내외의 재분화율을 나타내었고, 신초 소질도 양호하여 가장 좋은 결과를 보여 주었다. 그러나, $3\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 농도에서 재분화율이 가장 낮은 것은 시료의 반복수가 적은 데서 발생한 실험사의 오차로 생각되었다. TDZ의 경우는 40~80% 내외의 재분화율을 나타내어, zeatin 보다는 감소하였으나 신초 발생은 촉진되는 경향이였다. BA의 경우는 재분화율이 0~10% 내외로서 가장 낮은 수준을 나타내었다. 대체적으로 엽병 조직의 재분화 반응은 엽신 조직과 비교할 때 다소 낮은 경향이였다. 그러나 Rodriguez 등(1985)이 MS 배지를 이용한 ‘헤이워드’ 품종의 엽병에서 보고한 61.5% 보다는 양호한 결과를 나타내었다.

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

Cytokinin	Callus growth	Regeneration rate(%)	Shoot number	Shoot quality
TDZ	4	80	5	2
Zeatin	5	50	3	4
BAP	2	10	1	1

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

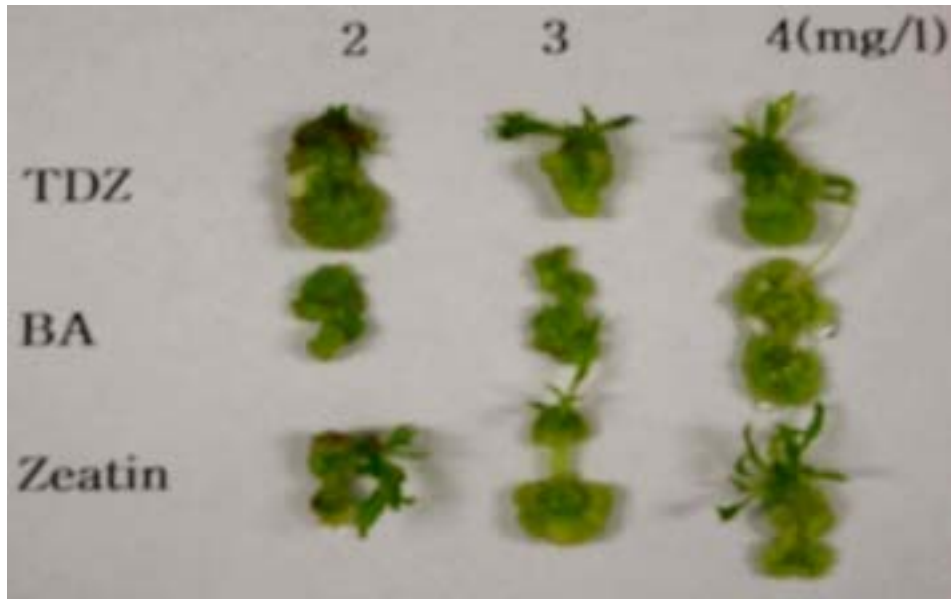


Fig. 4. Effect of different cytokinins(TDZ, Zeatin, and BA) supplemented with $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA in regeneration medium on regeneration from petiole explants of 'Hayward' kiwifruit.

Table 4. Effect of petiole size on regeneration from petiole explants of 'Hayward' kiwifruit in regeneration medium supplemented with $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ and $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA. A-D ; petiole size(A; 0.5cm, B; 1.0cm, C; 1.5cm, D; 2.0cm)

Treatment	Callus	Regeneration	Shoot	Shoot
	growth	rate(%)	growth	quality
A	4	87.6	5	4
B	3	66.7	4	3
C	2	36.4	2	2
D	2	33.3	1	1

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

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

Table 5. Effect of wounding induction on regeneration from petiole explants of 'Hayward' kiwifruit in regeneration medium supplemented with $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ and $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA. A-C; wounding method(A; toothed wheel type, B; half of petiole, C; control)

Treatment	Callus growth	Regeneration rate(%)	Shoot growth	Shoot quality
A	4	75	4	4
B	5	95	5	5
C	5	50	3	3

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



Table 5는 엽병 조직의 절편체에 상처를 유도하는 방법에 따른 재분화 ksdmd를 나타낸 것이다. 메스에 의한 톱니바퀴 양상의 상처 유도 처리의 경우 재분화율은 75%내외이고, 반으로 길게 쪼갠 방식의 상처 유도 처리의 경우는 재분화율이 95% 내외로서 그냥 치상하는 경우의 50% 내외의 재분화율에 비하면 차이가 컸다. 재분화율 이외에도 신초 발생과 신초 소질면에서도 양호한 결과를 보여 주었다. 톱니바퀴는 절단면이 증가함에 따라 유관속 조직이 더 많이 노출될 수 있는 것과 관련이 있는 것으로 생각되었다. 이상의 결과로 미루어 유채에서 재분화율이 20% 이상의 경우 형질전환이 가능하다는 Tomzik(1995)의 연구보고와 비교할 때, 참다래의 엽병 조직을 이용한 형질전환 연구가 충분히 가능할 것으로 판단되었다.

형질전환은 벡터로부터 목적 유전자의 세포 내 도입과 이들 세포로부터 재분화를 유도하는 단계로 구분할 수 있다. 목적 유전자가 도입된 세포로부터의 재분화 단계는 키메라 발생을 없애고 균일한 조직으로 신초 등의 기관이

형성되도록 유도하여야 한다. 그러므로 특정 유전자 도입 세포와 비도입 세포들이 혼재하는 상태에서 유전자가 도입된 세포들만이 생장 및 재분화가 진행되도록 하는 선발과정이 필요하게 된다.

참다래의 엽신과 엽병 조직을 이용하여 재분화 단계에서의 kanamycin 항생제에 대한 내성을 분석하였다(Fig. 5). 엽신의 경우 TDZ와 zeatin에 상관없이 $25.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin 이상의 수준에서 신초 재분화가 억제되었다. 그러나 캘러스 형성 및 탈색 등의 반응은 TDZ와 zeatin 간에 약간의 차이를 보였다. TDZ의 경우는 $50.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin 수준에서 주맥 절단면의 캘러스 형성이 거의 이루어지지 않았으나, zeatin의 경우는 동일 kanamycin 농도에서 캘러스가 형성되었다. 또한 고농도에서의 탈색 정도는 zeatin의 경우보다 TDZ에서 심한 편이었다. 엽병의 경우에서도 엽신과 비교할 때 유사한 경향을 보여 주었다. $25.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin 수준까지는 신초 재분화가 이루어졌고, $50.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin 수준에서는 캘러스 생장이 미약하게나마 진행됨을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 참다래 엽신 조직을 이용한 경우의 형질전환체 선발은 $50.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin 내외에서, 그리고 엽병의 경우에는 $75.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin 내외에서 가능할 것으로 판단되었다. 이는 Janssen과 Gardner(1993)와 Nakamura 등(1999)이 사용한 농도와 비교할 때 동일한 수준이었으나, Uematsu 등(1991)의 $25.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 보다는 높고 Fraser 등(1995)의 $100.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 보다는 낮은 수준이었다.

참다래 엽신 절편체는 *Agrobacterium*을 접종한 후 3일 동안의 공동배양 과정을 거친 다음, $50.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin이 첨가된 재분화 배지에서 배양하였다(Fig. 6). 재분화 개체들은 항생제가 첨가되지 않은 신초 증식배지에서 생장을 유도하고 증식하였다. 이들 증식 개체들은 $100.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin이 첨가된 신초 증식배지로 옮긴 후 활발히 생육하는 항생제 저항성 식물체를 재차 선발하였다(Fig. 6).

이들 선발 식물체는 DNA를 추출하여 PCR 분석을 통해 형질전환체임을 확인하였다(Fig. 7). PCR 분석의 결과로 많은 재분화 식물체들이 escape임을 확인할 수 있었으나, 일부 식물체들은 nptII에 대한 800kb와 목적 유전자에 대한 540kb의 특이 밴드를 나타내었다. 또한 Song 등(2001)의 보고와 같이 일부 식물체에서는 선발 유전자만이 도입되고 목적 유전자는 도입되지 않은 현상도 관찰되었다.

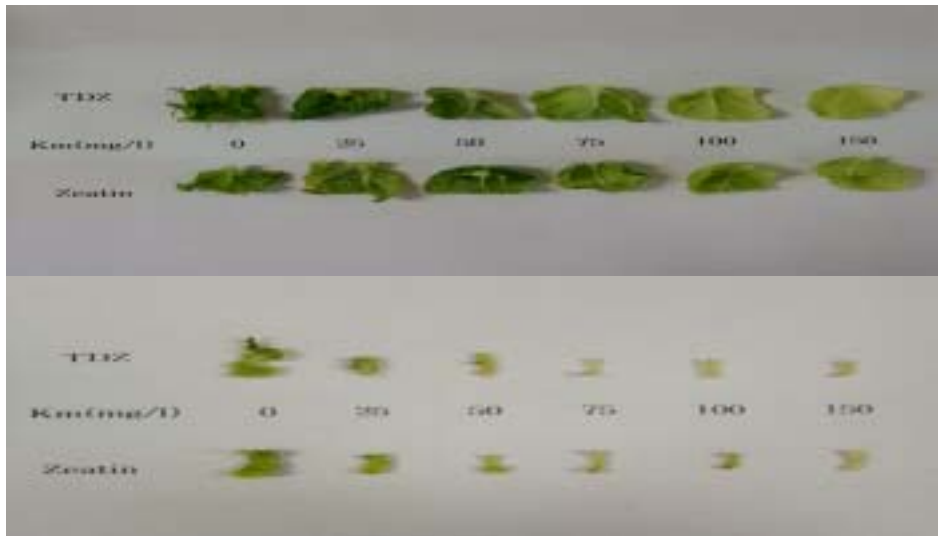


Fig. 5. Regeneration response from leaf blade and petiole explants of 'Hayward' kiwifruit in regeneration medium, which consisted of agar solidified MS medium with $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ or zeatin and $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA, supplemented with different kanamycin concentrations.

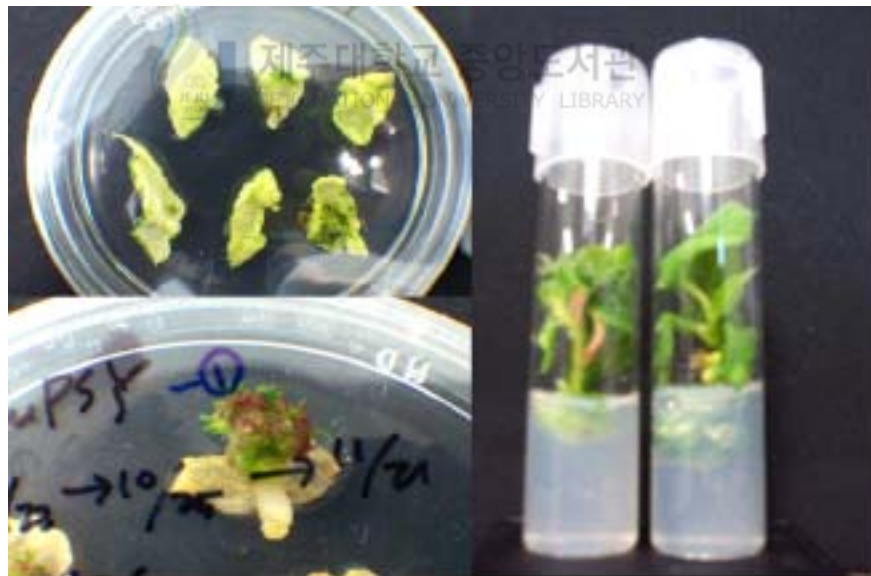


Fig. 6. Regeneration on selection medium and multiplication of putative transgenic shoots in 'Hayward' kiwifruit.

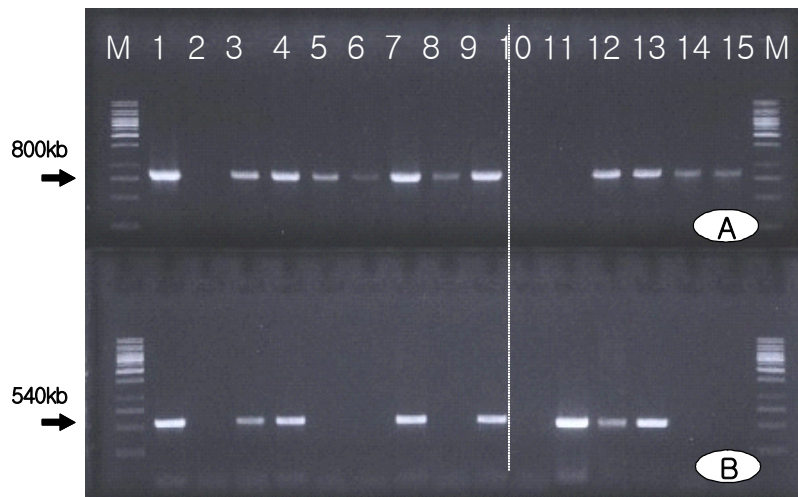


Fig. 7. PCR analysis of putative transgenic plants. PCR bands were detected for both the nptII (A) and CitPsy or CitChx genes (B).

IV. 적 요

본 연구는 ‘헤이워드’ 참다래의 엽 조직으로부터 효율적인 재분화와 *Agrobacterium* 이용 형질전환 체계를 확립하기 위하여 수행하였다. 기내 증식 중인 식물체의 엽신과 엽병 조직을 이용하여 성장조절물질의 농도 및 종류, 배지 고형물, 엽신과 엽병의 크기와 부위, 상처유도 방법 등 몇가지 요인이 신초 재분화에 미치는 영향과 항생제에 대한 반응을 분석하였다. 재분화 반응은 캘러스 성장, 재분화율, 신초 발생, 그리고 신초 소질에 대하여 평가되었다. 또한 이를 바탕으로 하여 *Agrobacterium* 이용 형질전환을 수행하였다.

엽신 조직의 thidiazuron(TDZ)와 indole-3-butyric acid(IBA)의 농도별 조합에 따른 재분화 반응에서는 재분화율, 신초 발생과 신초 소질을 고려하였을 때 적정 농도는 $3.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ와 $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA이었다. TDZ, Zeatin 및 BA의 비교에서는 TDZ와 zeatin이 BA에 비해 좋은 재분화 반응을 나타내었으나, 상호간 차이는 거의 없었다. 또한 gelrite와 agar의 배지 고형물에 따른 재분화 반응도 거의 차이가 없었다. 잎의 크기와 부위별 재분화 반응에서는 잎의 크기가 작을수록, 그리고 잎의 기부에 가까울수록 재분화 정도가 높은 경향이였다.

엽병 조직의 TDZ, Zeatin 및 BA에 대한 재분화 반응에서는 zeatin이 가장 좋았고, 다음으로 TDZ, BA의 순이었다. 엽병의 크기에서는 작을수록 재분화 정도가 높게 나타났다. 상처 유도 방법의 비교에서는 종 방향 절단이 엽신과 동일한 정도의 높은 재분화 수준을 나타내었고 톱니바퀴 방식, 대조구의 순으로 재분화 정도가 감소하였다.

엽신과 엽병 절편체의 kanamycin에 대한 재분화 반응은 TDZ와 Zeatin의 경우 유사하였는데, 엽신에서는 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 이상에서, 그리고 엽병에서는 $75\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 이상에서 신초 재분화와 캘러스 생장이 억제되었다. *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404를 엽신 조직의 절편체에 접종하고 3일 공동배양 후 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin이 첨가된 재분화 배지에서 식물체를

선발하고 이를 증식배지에서 증식하였다. PCR 분석으로 이들 식물체에서 외래 유전자가 도입되었음을 확인하였다.



V. 참고 문헌

- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hick. 1983. A Plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Rep.* 1:19-21
- Dunn, S.T. 1911. A revision of the genus *Actinidia*, Lindl. *J. Linn. Soc. Lond. Bot.* 38:350-373
- Ferguson, A.R. 1984. Kiwifruit: a botanical review. *Hort. Rev.* 6:1-64
- Ferguson, A.R., A.G. Seal, M.A. McNeilage, L.G. Fraser, C.F. Harvey, and R.A. Beatson. 1996. Kiwifruit. In: *Fruit breeding. Vol. 2. Vine and small fruit sp.* (J. Janick and J.N. Moore, eds.). Wiley, New York. 371-417
- Fraser, L.G., J. Kent, and C.F. Harvey. 1995. Transformation studies of *Actinidia chinensis* Planch. *New Zealand J. Crop & Hort. Sci.* 23:407-413
- Frédérique, O.S., J.M. Legave, M.F. Nicole, and A.M. Hirsch. 1994. Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus *Actinidia*. *Sicentia Hort.* 57:303-313
- Gleddie S. 1989. Plant regeneration from cell suspension cultures of *Arabidopsis thaliana* Heynh. *Plant Cell Reports* 8:1-5
- Gonzalez, M.V., M. Rey, and R. Rodriguez. 1995. Plant regeneration from petioles of kiwifruit microshoots. *HortScience* 30:1302-1303
- Harvey, C.F., G.P. Gill, L.G. Fraser, and M.A. McNeilage. 1997. Sex determination in *Actinidia*. 1. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*. *Sex plant Reprod.* 10:149-154

- Hirsch, A.M., D. Fortune, and P. Blanchet. 1990. Study of dioecism in Kiwifruit, *Actinidia deliciosa* Chevalier. Acta Hort. 282:367-376
- Jansen, B.J. and R.C. Gardner. 1993. The use of transient GUS expression to develop an *Agrobacterium*-mediated gene transfer system for kiwifruit. Plant Cell Reports 13:28-31
- 김성철. 2002. Kiwifruit의 분자육종을 위한 다래나무속 식물의 유전양상 분석과 SCAR marker 개발. 박사학위논문. 제주대학교. 한국
- Kim, S.C., K.H. Kim, Y.S. Eun, K.C. Jang, Y.H. Jung, and S.C. Koh. 2002. Development of the cultivar-specific sequence characterized amplified region(SCAR) markers using PCR-RAPD in the genus *Actinidia*. J. Kor. Soc. Hort. Sci.
- Kim, Y.S. and S.D. Oh. 1998. Plant regeneration from leaf and petiole culture of kiwifruit(*Actinidia deliciosa*). Korean J.Plant Tissue Culture 25:305-308
- Ko, K.C. 2000. Molecular characterization of cDNAs encoding phytoene synthase and β -carotene hydroxylase in Citrus. A these for MS degree. Cheju National Univ.
- Kobayashi, S., C.K. Ding, Y. Nakamura, and I. Nakajima. 2000. Kiwifruits(*Actinidia deliciosa*) transformed with a *Vitis* stilbene synthase gene produce piceid(resveratol-glucoside). Plant Cell Reports 19:904-910.
- Koller, B., A. Lehmann, J.M. McDremott and C. Gessler. 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 85:901-904
- Kusaba M., T. Nishio. 1999. Comparative Analysis of S Haplotypes with Very

Similar *SLG* Alleles in *Brassica Rapa* and *Brassica Oleracea*. *The Plant Journal* 17:83-91

Li, H.L. 1952. A taxonomic review of the genus *Actinidia*. *J. Arnold Arbor.* 33:1-6

Linsmaier E.M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 18:100-127

Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

Murashige T. and D.P.H. Tucker. 1969. Growth factor requirements of *Citrus* tissue culture. *Proc. 1st Intern. Citrus Symp* 3:1155-1161

Nakamura, Y., H. Sawada, S. Kobayashi, I. Nakajima, and M. Yoshikawa. 1999. Expression of soybean β -1,3-endoglucanase cDNA and effect on disease in kiwifruit plants. *Plant Cell Reports* 18:527-532.

Raven J.A. 1999. The size of cells and organisms in relation to the evolution of embryophytes. *Plant Biol.* 1:2-12

Revilla M.A. and J.B. Power. 1988. Morphogenetic potential of long term callus cultures of *Actinidia deliciosa*. *Journal of Horticultural Science* 63:541-545

Rodriguez R., A. Vasquez, R. Ordas and B. Fernandez. 1985. Topofisis y micropropagation de l'*Actinidia deliciosa*. *Porencias y Comunicaciones das Primeras Jornadas Tecnicas sobre Actinidia(kiwi)*. Vigo(Pontevedra), Spain. 127-130

- Roy A., N. Frascaria, J. Mackay and J. Bousquet. 1992. Segregating random amplified polymorphic DNAs(RAPDs) in *Betula alleghaneinsis*. Theor. Appl. Genet. 85:173-180
- Schmid, R. 1978. Reproductive anatomy of *Actinidia chinensis*(Actinidiaceae). Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeographie 100:149-195
- Song, K.J., S.Y. Ahn, J.H. Hwang, Y.U. Shin, S.W. Park, and G. An. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of 'McIntosh Wijcik' apple. J. Kor. Soc. Hort. Sci.41:541-544
- 송관정. 2000. 과수생명공학연구동향. 과수육종연구회지 4:122-136
- Susan, W.E., G. Peter, and J.S. Robert. 1993. Random amplified polymorphic DNA(RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. Theor. Appl. Genet. 86:497-504
- Thomzik J.E. 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation of stem disks from oilseed rape(*Brassica napus* L.). Methods Mol. Biol. 44:79-85
- Uematsu, C., M.Murase, H. Ichikawa, and J. Imamura. 1991. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of kiwifruit. Plant Cell Reports 10:286-290.
- Warrington I.J. and G.C. Weston. 1990. Kiwifruit science and management. Ray Richards Publisher, Palmerston North. 21-31
- Yan G.J., A.R. Ferguson, M.A. McNeilage. 1994. Ploidy races in *Actinidia chinensis*. Euphytica 78:175-183

Zhang, R.M. 1981. Selected varieties of kiwifruit. In: Mihoutaode Zaipei
he Liyong(Qu, Z.Z., ed.). Beijing, Nongue Chubanshe. 134-141

과수실태조사. 2002. 주요작물 지역별 재배동향. 농림부



감사의 글

입학한 게 바로 엇그제 같은데 벌써 2년이라는 시간이 흘렀습니다. 2년이란 시간이 이렇게 빨리 지나 논문을 쓰게 된다는 것이 믿겨지지 않습니다. 한없이 부족하기만 했던 저를 이 자리에 설 수 있게 도와주신 모든 분들께 감사드립니다.

저를 이 자리까지 오도록 이끌어주신 송관정 교수님, 바쁘신 와중에도 저에게 조언을 아끼지 않으신 문두길 교수님, 장전익 교수님께 머리숙여 감사드립니다. 그리고 학부 때부터 지금까지 저에게 많은 조언과 가르침을 주신 소인섭 교수님, 강훈 교수님, 박용봉 교수님께 감사드립니다.

그리고 많은 조언을 해주신 농업시험장의 김성철 연구사님, 정용환 박사님 고맙습니다.

본 연구를 수행할 수 있도록 옆에서 많은 조언과 격려를 해주신 오선열 선배님, 진웅 오빠, 부족한 저를 많이 챙겨주신 치원 오빠, 지만 오빠, 저에게 분자 생물학을 일깨워준 성범오빠 고맙습니다.

학과사무실에 가면 따뜻한 차한잔을 건네주던 석범오빠, 감귤생리생태실험실의 시현오빠, 동기인 재웅, 조직배양실의 윤숙 언니, 찬규 오빠, 윤희, 동균, 효민, 농화학과의 도승 오빠, 대운 오빠, 권민 오빠에게 고마움을 전합니다.

그리고 저에게 많은 용기를 준 친구들; 보영, 종민, 원희, 정환, 승완, 민욱, 병철, 태경아 고맙다.

언제나 저에게 웃음과 조언을 많이 해 준 형수 오빠, 선경, 덕건 오빠, 미희, 용탁, 폴 오빠 고맙습니다.

마지막으로 못난 딸이 학업에 정진할 수 있도록 도와주신 부모님께 마음깊이 감사드리고 이 논문을 바칩니다.