Journal of Life Science **2004**, Vol. 14. No. 4. 644~649 ©JLS

Antisense gibberellin 3β-hydroxylase발현 형질전환벼

강용원 · 윤용휘 · 김길웅 · 이인중 · 신동현*

경북대학교 농업생명과학대학 식물생명과학부

Received June 29, 2004 / Accepted August 9, 2004

Antisense GA 3β-Hydroxylase Gene Transferred to Rice Plants. Yong-Won Kang, Yong-Hwi Yoon, Kil-Ung Kim, In-Jung Lee and Dong-Hyun Shin*. *Department of Agronomy, College of Agriculture and Life Science, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea* – During plant development, active gibberellins (GAs) control many aspects of plant growth and development including seed germination, stem elongation, flower induction, anther development and seed growth. To understand the biosynthesis and functional role of active GAs in high plants, this study investigated GA 3β-hydroxylase gene encoding GA_1 and GA_4 catalizing last step in GA biosynthetic pathway. The antisense GA 3β-hydroxylase gene was inserted into expression vector, pIG121-Hm. Calli derived from mature seeds of rice (*Oryza sativa* L. cv. Donjinbyeo) were co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 carring a pIG121-Hm containing hygromycin resistance (Hyg^r) and antisense GA 3β-hydroxylase gene. Seventeen transgenic plants obtained inhibiting GA 3β-hydroxylase. Transgenic plants had shorter plant height more than that of the Dongjinbyeo. Stable integration of antisense GA 3β-hydroxylase gene was confirmed by polymerase chain reaction of genomic DNA isolated from the leaf organs of the T_0 generation.

Key words – Antisense GA 3β-hydroxylase, Polymerase chain reaction, Rice (*Oryza sativa* L.), Transgenic plants, T_0 generation

지베렐린(gibberellin, GA)은 식물에서 생장 조절 물질의 일부로서 diterpenoid계 화합물이다. GA는 식물생육의 여러 단계 즉, 종자 발아, 줄기 신장, 개화 유도, 약 발달 그리고 종자와 과피 생장 등에 관여한다[19]. 많은 종류의 지베렐린들이 밝혀졌지만 생장과 발달에 관여하는 것은 생물 활성 지베렐린인 GA_1와 GA_4이다. 고등식물의 GA 생합성과정에서, 특히 GA 3β-hydroxylase는 GA_9에서 GA_4 그리고 GA_{20}에서 GA_1의 변환을 촉매하는 것으로 알려져 있다[5,10]. 그러므로, GA 3β-hydroxylase 유전자는 활성 GAs의 분포특성과 GA 생합성 과정의 조절에서 유용하게 이용될 수도 있다.

지금까지 연구들에서, 식물의 생장과 발달에 관여하는 GA 3β-hydroxylase의 활성이 낮아서 발생하는 여러 GA 결핍 왜성 돌연변이체들(GA-deficient dwarf mutants)이 분리되었다. GA 결핍 왜성(dwarf) 돌연변이체들은 옥수수, 완두콩, 토마토, 애기장대, 벼 등에서 분리, 관찰되었는데 옥수수에서 *dwarf1* 유전자[3], 완두콩에서 *le* 유전자[7], 애기장대에서 *ga4*[24], 벼에서는 *dy*[11]가 분리되었다. 벼에서 *d18* 돌연변이 유전자는 GA 결핍 왜성 형질로 나타났고 3개의 대립인자(*d18-Id18^h*, *d18-AD* 그리고 *d18-dy*)가 밝혀졌다. 두 개의 강한 대립인자 *d18-Id18^h*와 *d18-AD* 유전자는 심한 왜성(severe dwarf) 표현형을 유발하고, 약한 대립인자 *d18-dy* 유전자는 반 왜성(semidwarf) 표현형을 유발한다[13]. 그리고 많은 연구들에서 단지 *d18-dy* 돌연변이 왜성종(Waito-C)만이 GA_1 처리에 의해 형질이 정상화되었다. 그러나 GA_{20}을 처리할 경우 형질이 정상화되지 않았다[16]. 이러한 돌연변이의 어린 식물체에서는 전구물질인 GA_{20}은 축적이 되나 GA_1 결핍되었다. 반 왜성 *d18-dy* 돌연변이 벼에서, GA_{20}에서 GA_1까지의 대사 작용은 일반 재배벼의 대사 작용보다 더 낮게 나타났다. Kobayash (1989)는 d18 유전자가 GA 3β-hydroxylase를 암호화한다고 보고한 바 있다[11]. 또한 일반 벼에서, GA_4가 꽃밥에서 축적되고 그 꽃밥에서 추출한 물질이 GA_{12}에서 GA_{34} 그리고 GA_{53}에서 GA_8까지를 대사시킨다고 밝혀졌으므로 벼에서는 적어도 2개의 GA 3β-hydroxylase 유전자가 있다고 알려졌다[12]. 비록 최근에 GA 3β-hydroxylase 유전자가 쌍떡잎 식물에서 많이 클론되어졌으나[15,23] 외떡잎 식물에서 GA 3β-hydroxylase 유전자를 클론하였다는 보고는 없다.

본 실험은 GA 생합성 과정에서 절간 신장에 결정적으로 관여하는 GA 3β-hydroxylase를 암호화하는 d18 유전자를 인위적으로 antisense로 도입함으로서 GA 생성을 억제하였을 때 절간신장을 억제할 수 있을 것으로 기대하였고 GA 생합성 억제시 또 다른 반응이 벼에서 나타나는지를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

식물 재료

본 실험에서 사용된 동진벼는 경북대학교 농과대학 실습

***Corresponding author**
Tel : +82-53-950-5707, Fax : +82-53-958-6880
E-mail : dhshin@knu.ac.kr

포장에서 표준재배법으로 재배하였다. 수정후 21일째된 동진벼 종자를 연구재료로 이용하였다. 공시품종의 미숙배의 외영과 내영을 핀셋으로 절취하여 70%의 에틸알코올에 30초간 표면 살균한 다음 1%의 sodium hypochlorite 용액에 30분간 살균한 다음 멸균수로 5회 수세하였다. 미숙배는 2 mg/l 2,4-D, 30 g/l sucrose, 2 g/l gelite가 첨가된 MS배지(Table 1)에 치상한 다음, 26℃ 암상태에서 4주 동안 캘러스를 유도하였다.

GA 3β-hydroxylase를 암호화하는 gDNA 분리

벼 잎 1.5 g으로부터 genomic DNA는 CTAB 방법에 따라 추출하였다[17,20]. 추출한 DNA를 주형가닥으로 사용하고 GA 3β-hydroxylase primer의 염기서열은 forward, 5'-ATGCCGACGCCGTCGCAC-3', reverse 5'-TTATGCGTGG ACGTCGGC-3'를 이용하여 PCR을 수행하였다. GA 3β-hydroxylase PCR 반응조건은 94℃에서 5분간 pre-denaturation시킨 후 94℃에서 30초간 denaturation, 60℃에서 30초 annealing, 72℃에서 1분 30초간 elongation으로 35 cycle을 반응시켰다. 그 후 72℃에서 10분간 post-elongation시켜 증폭된 DNA를 Ethidium bromide (EtBr)이 포함된 0.8% agarose gel상에서 전기영동하여 확인하였다.

PCR 반응 조건 및 PCR 산물의 cloning

PCR 반응은 1 ul Takara Taq (5 U/ug), 1 ul dNTP (2.5 mM), 5 ul 10×PCR buffer, 1 ul primer (0.05 uM), 1 ul template DNA (ng/ul), 41 ul 초순수 물로 전체 volume이 50 ul가 되게 양을 맞추었다. PCR 반응은 MJ research사의 minicycler를 사용하여, 94℃ 3분간 pre-denaturation시킨 후, 94℃ 1분간 denaturation, 60℃에서 1분 20초간 annealing, 72℃에서 1분간 elongation으로 35 cycle 반응시킨 후 72℃에서 7분간 post-elongation 시켜 PCR 산물을 얻었다. PCR 산물들은 Promega사의 pGEM-T easy vector에 클로닝하고 이들의 염기서열을 분석하였다.

Table 1. Media used for tissue culture and transformation of rice

Media	Composition
MS media	MS salt and vitamins, 2 mg/l 2,4-D, 2 g/l gelite pH 5.8
MS co-culture	MS salt and vitamins, 2 mg/l 2,4-D, 30 g/l sucrose, 10 g/l glucose, 1~100 μM acetosyringone (AS), 2 g/l gelite
MS selection	MS salt and vitamins, 2 mg/l 2,4-D, 30 g/l sucrose, 500 mg/l carbenicillin, 40 mg/l hygromycin, 2 g/l gelite
MS shoot indution	MS salt and vitamins, 2 mg/l 2,4-D, 30 g/l sucrose, 500 mg/l carbenicillin, 2.5 mg/l $CuSO_4$, 2 g/l gelite

GA 3β-hydroxylase 유전자의 염기 서열 분석

T-vector에 클로닝된 PCR 산물들을 Promega (USA)의 Wizard plus SV miniprep Kit로 DNA를 분리하였다. DNA의 염기서열은 T7, SP6 primer를 사용하여 Bioneer (한국)사에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다.

형질전환 vector 및 *Agrobacterium tumefaciens* 배양

pIG121-Hm에 *Bam*HI, *Xba*I site에 PCR로 증폭된 DNA를 cloning하였다. 그리고 이들을 agarose gel상에서 확인하여 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101을 형질전환하는데 사용하였다. 형질전환된 균주는 상기와 동일한 농도의 YEP 액체배지에서 배양한 후 그 이상 계대배양은 하지 않고 kanamaycin (100 mg/l)과 hygromycin (50 mg/l)의 항생 물질이 포함된 선택 고형배지(Table 1)에 spreading 하고 28℃에서 3일간 암 배양하였다.

Callus의 유도 및 전배양

완숙종자의 종피를 제거하고 70% 에틸알코올에 1분 동안 침지한 후 20% sodium hypochloride 용액에 15분 동안 교반하면서 표면 살균하였다. 살균된 종자를 멸균수로 3회 세척하고 MS callus 유도 배지에 종자를 치상하였다. 25℃, 300 lux의 연속 광조건에서 7~10일간 배양하여 callus를 유도하였다. 완숙종자의 배유와 자엽부분만 취하여 상기와 동일한 callus유도배지에 치상하였다. 치상 시 갈변되었거나 점성물질이 붙어 있는 callus는 제거하고 3일간 25℃의 암 배양 조건에서 전배양하였다.

*Agrobacterium*과 벼 Callus 공조배양

Plant expression vector-pIG121-Hm에 antisense GA 3β-hydroxylase gene을 cloning하여 그 vector로 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101을 50 μM 농도의 acetosyringone (3, 5-dimethoxy-4-hydroxy-acetophenone, Aldrich, USA)이 첨가된 YEP배지에 48시간 동안 현탁배양하였다. 적정밀도로 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101을 벼의 미숙배에서 유기된 캘러스에 3분 정도 감염시킨 다음, 2 mg/l 2,4-D, 30 g/l sucrose, 10 g/l glucose, 50 μM AS, 2 g/l gelite, 2 g/l $CuSO_4$ (Table 1)가 첨가된 MS배지에서 28℃에서 3일 동안 공조배양하였다.

형질전환 캘러스의 선발

형질전환된 캘러스의 선발을 위하여 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, 500 mg/L carbenicillin, 40 mg/L hygromycin, 2 g/l gelite가 첨가된 MS배지(Table 1)에서 3주 동안 명상태에서 배양한 다음, 선발된 캘러스를 1 mg/l NAA, 5 mg/l kinetin, 30 g/l sucrose, 500 mg/ carbenicillin, 40 mg Hy-

gromiycin, 5 g/l gelite가 첨가된 MS배지(Table 1)에서 재분화시켰다.

식물체의 순화

Shoot 유도 배지에서 재분화된 식물체는 배양병에서 약 7 cm 정도 자랐을 때 배양병을 덮고 있는 호일을 0.5 cm 직경으로 구멍을 뚫고, 증류수를 1 cm 높이로 채워 2일 간 방치하여 과포화 상태를 완화시켰다. 그리고 흙으로 채워진 pot에 옮겨 심고, 비닐랩으로 덮어 3일간 순화하고 랩을 제거하여 순화시켰다.

결과 및 고찰

GA 3β-hydroxylase 유전자 분리

벼의 gDNA를 주형으로 사용하여 이미 밝혀진 GA 3β-hydroxylase 유전자의 primer를 제작하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물을 pGEM T-easy vector에 클로닝하고 염기서열을 분석하였고(Fig. 1) NCBI에서 homology정도를 조사하였다. 이들은 intron을 포함한 500bp 크기로 homology 분석결과, 벼의 genomic DNA의 GA 3β-hydroxylase 유전자의 osGA3ox2와 높은 상동성을 보였으며, 왜성벼에서 알려진 *d18-dy, d18-Id18*^{h} mutant의 GA 3β-hydroxylase와 매우 높은 상동성을 나타내어 antisense expression에 적합한 것으로 판단하였다.

Plant expression vector 제작

pGEM T-easy vector에 클로닝된 400 bp 크기를 forward primer 5'-AT TCTAGA CACCTCTCCGCCTCGA-3'와 reverse primer 5'-AT GAGCTCATGTGGTCCGAGGG-3'로 plant expression vector에 클로닝하기 위해서 다시 PCR을 수행하였다. 그리고 이들은 양 말단이 *Xba*I, *Bam*HI으로 절단될 수 있도록 고안되었고 pIG121-Hm에 클로닝되었을 때 antisense expression 되도록 하였다(Fig 2). 그리고 이들은 T-DNA 내에서 CaMV35S promoter 뒤에 연결되도록 하였다. 일반적으로 식물에서 GA의 생성은 발아, 성장, 꽃의 분화등에 매우 밀접한 관계를 가지고 있으므로[1] 적당한 promoter와 적당한 antisense를 가지도록 design되어야 정확한 antisense로 GA 생합성을 억제할 수 있을 것으로 사료된다. 그래서 본 연구에서는 먼저 CaMV35S promoter를 antisense 3β-hydroxylase expression시켜 GA 생성을 억제시키고자 했다.

Hygromycin 저항성 callus의 선발

벼와 같은 단자엽 식물은 Agrobacterium이 감염될 때 쌍자엽 식물과 달리 Ti plasmid의 *vir* 유전자가 활성을 띄게되는 페놀성분인 Acetosyringone (AS)과 α-hydroxy-AS같은 물질을 방출하지 않기 때문에 이러한 물질을 *Agrobacterium*의 배양이나 공조배양 배지에 첨가하는 것이 필수적이라고 보고되고 있으며, 그 농도에 따라 형질전환효율이 아주 상이한 것으로 알려졌다[15]. 벼의 경우 Hiei등은 자포니카형 벼의 형질전환에 있어서 공동배양 배지 내에 첨가되는 AS의 적정농도는 100 uM이 적합하다고 하였으며[2,6,18], Rashid 등은 인디카형 벼인 Basmati 370의 형질전환에 있어서 *Agrobacterium*의 배양과 공조배양 배지 내에 50 uM의 AS 첨가가 가장 높은 효율을 나타내었다고 하였다[18]. 본 연구에서도 AS이 첨가되지 않은 배지에서는 형질전환된 개체를 얻을 수 없었으나, 50 uM 이 첨가된 배지에서 높은 형질전환 효율을 나타내어 Rashid 등의 연구와 AS 농도면에서 상반된 경향이었다

ATGTGGTCCGAGGGCTACACCTTCTCCCCTTCCTCCCTCCGCTCCGAGC
TCCGCCGCCTCTGGCCCAAGTCCGGCGACGACTACCTCCTCTTCTGGTA
TATATACATATATACTCTCCCATGCATTCCATGCACATACACTCTACG
TATATATCTACCTCTACGTATATATCTACGTATTGATCTACGTATAAT
ATACGCAGTGACGTGATGGAGGAGTYTTCACAAGGAGATGCGGCGGCT
AGCCGACGAGTTGCTGAGGTTGTTCTTGAGGGCGCTGGGGCTCACCGGC
GAGGAGGTCGCCGGAGTCGAGGCGGAGAGGAGTCCAGGCGGAGAGGAG

Fig. 1. Sequence of GA 3β-hydroxylase gene from PCR product.

Fig. 2. A schematic diagram of the plant expression vector, pIG121-Hm, for the transformation of Dongjinbyeo, inwhich inserted an antisense GA 3β-hydroxylase gene has replaced GUS. RB : right board, LB : left board, NPT II : neomycin phosphotransferase gene II, T-nos : terminator of nopaline synthase (NOS) gene, 35S : cauliflower mosaic virus 35S promoter, HPT: hygromycin phosphotransferase.

[18,22].

Agrobacterium tumefaciens EHA101균내에 binary vector인 pIG121-Hm:antisense-3β-hydroxyalse를 형질전환시킨 균주와 전 배양된 동진 벼의 callus를 3일간 공동배양하고, 50 mg/l의 hygromycin이 포함된 MS선발배지에서 30일간 배양한 결과는 Fig. 3과 같다. 기존에 치상된 callus의 일부 세포로부터 새로운 callus의 증식이 관찰되었으며, 저항성 callus의 출현정도는 치상된 callus의 출현과정을 살펴보면 배양초기에 MS배지에서 대부분 증식이 억제되고 갈변화하는 현상을 보이다가 배양 2주 후부터 갈변된 callus의 일부 세포에서 흰색의 callus가 출현하면서 점차 빠른 속도로 증식되어 가는 특징을 갖고 있었다.

Hygromycin 저항성 shoot 및 root 조직의 유도

Hygromycin이 포함된 MS배지에서 증식된 callus만을 선발하여 hygromycin이 포함된 MS 재분화배지에 치상한 결과는 Fig. 3과 같다. 배양 3주 후부터 callus에 녹색의 반점이 보이기 시작하다가 배양 5주경부터는 shoot 조직의 분화가 외형적으로 관찰되었다. 식물체의 재분화율은 저항성 callus로부터 약 40%~60%정도의 빈도로 나타났다. 고체배지에서 신초의 길이가 약 3 cm~4 cm정도 되었을 때 hygromycin과 kanamycin이 첨가된 MS배지에 신초를 치상하고 발근을 유도한 결과 80%이상 뿌리의 생장과 동시에 신초의 신장이 관찰되었다(Table 2). 배양 10주 후에는 pot에 이식할 수 있는 크기로 생장하였다.

Antisense GA 3β-hydroxylase 형질전환 벼의 외부형태

고등 식물의 GA 주요 생합성 경로에서, GA 3β-hydroxylase 유전자가 식물체에서의 GA_9에서 GA_4 그리고 GA_{20}에서 GA_1의 변환을 촉진한다고 밝혀졌다[5]. 활성 GA_1과 GA_4는 생장과 분화를 조절한다. 그러므로 GA 3β-hydroxylase 유전자를 antisense로 식물체 상에 도입함으로서 유전자 발현의 양을 인위적으로 적절히 조절 또는 억제를 유도할 수 있을 것이다. 비 형질전환된 동진벼를 대조군으로 비교하여 antisense GA 3β-hydroxylase 유전자가 형질도입된 식물체의 획득형질은 평균적으로 대조군에 비해 절간 신장의 억제가 보였다. 이것은 antisense GA 3β-hydroxylase 유전자에 의해 나타나는 것인지, 아니면 형질전환체에 비슷한 현상이 나타나는 것인지 확인하기 위해 GUS 유전자가 포함된 pIG121-Hm 기본벡터만 도입된 형질전환체와 비교하였다. 마찬가지로 antisense GA 3β-hydroxylase 유전자가 도입된 형질전환체가 대조군에 비해 절간신장의 억제가 관찰되었다(Fig. 4). 이와 같이 형질전환식물체에서 나타난 절간억제 현상은 antisense GA 3β-hydroxylase 유전자가 GA 생합성 과정에서 직

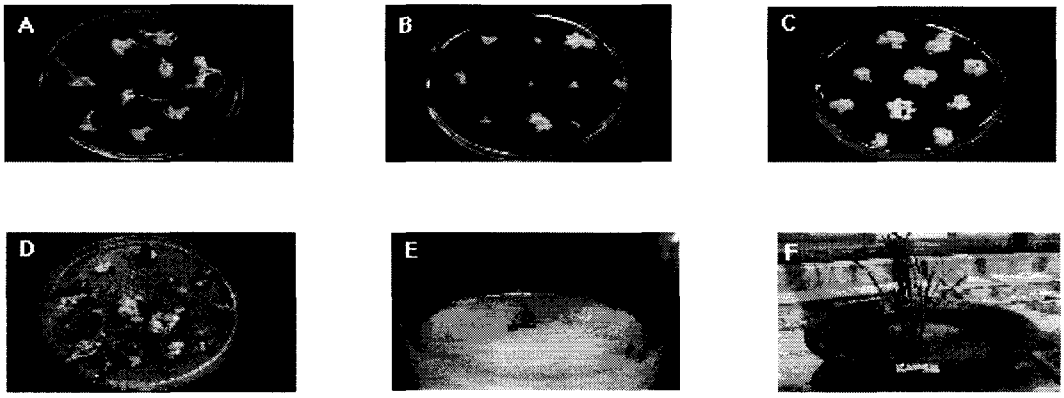

Fig. 3. Production of transgenic rice plants (Dongjinbyeo) using *Agrobacterium* EHA101 harboring antisense 3β-hydroxylase in pIG121-Hm. A, B, C : Calli derived from mature seeds of rice (*Oriza sativa* L. cv. Donjinbyeo) were co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 carring a pIG 121-Hm containing hygromycin resistance (HygR) and antisense GA 3β-hydroxylase genes. D : Hygromycin resistant transgenic rice. E : Transgenic plant in shoot induction media. F : Transgenic plant on soil pot.

Table 2. Transformation effect by *Agrobacterium* EHA101 : pIG121-Hm in rice cultivar (Dongjinbyeo)

Experiment	No. of Co-cultivated calli (A)	No. of produced Hyg(R) calli(%)	No. of transgenic plants (B)	B/A(%)
1	250	177 (46.8)	6	2.4
2	250	139 (55.6)	5	2
3	250	143 (57.2)	6	2.4
Mean	250	133 (53.2)	5.7	2.3

Hyg (R); hygromycin resistant calli.

접 또는 간접적으로 발현에 영향을 준 것임을 확인할 수 있었다.

또한 벼의 생육 초기 초장조사에서, GUS 유전자 도입된 동진벼와 비교하였을 때, antisense GA 3β-hydroxylase 형질전환 벼에서 절간신장의 차이가 잘 나타나지 않았다. 그러나 생육 후기 초장 조사에서, GA 3β-hydroxylase 유전자가 antisense된 형질전환 벼가 GUS가 포함된 동진벼보다 약 10 cm정도 짧음을 관찰할 수 있었다(Fig. 4). 본 연구에서 얻어진 결과로 보면, antisense GA 3β-hydroxylase 유전자 역시 생육 후기의 절간 신장에만 주로 관여한다고 사료되어진다. 그러나 완전 왜성과 형태상의 변이와 같은 특이한 형질을 나타나는 것은 발견되지 않았다. 이것은 크게 3가지로 추정할 수 있다. 첫째는 feed-back에 의한 유전자 회복일 수도 있으며, 둘째는 다른 생장조절 유전자가 영향을 미친 것으로, 셋째는 GA 3β-hydroxylase 유전자가 partial이라서 제대로 GA 유전자를 억제하지 못했을 수도 있다. Antisense GA 3β-hydroxylase 유전자가 생체 내에서 GA 3β-hydroxylase 유전자에 어떻게 관여하는지 아니면 다른 기능을 가지는지에 대해서는 금후에 더 많은 연구가 요구된다.

형질전환 식물체에서 나타난 낮은 종자 결실률은 antisense GA 3β-hydroxylase 유전자가 개화 발달에 영향을 미친 것으로 보여진다. 이것은 GA 3β-hydroxylase를 암호화하는 d18 유전자의 상동성 분석에서 osGA3ox1과도 상동성이 높게 나타났다. osGA3ox1 유전자는 개화에 관여하는 GA_4와 유사하다고 밝혀졌다[9,14,21]. 토마토에서 *stamenless-2* 그리고 애기장대에서 *gib-2*는 초기 단계에서 약배양을 멈춘다고 보고되었다[1]. 이것은 GA 3β-hydroxylase 유전자가 벼에서도 꽃의 개화에 밀접한 관여를 한다는 것을 알 수 있다.

도입된 유전자의 확인

형질전환된 T_0 세대와 일반 재배종 벼의 엽육 조직을 500 mg을 재취하여 액체 질소에 분쇄시킨 후 gDNA를 추출하였다. 추출된 gDNA를 각각 1/100 희석하여 주형 가닥으로 이용하고 pIG121-Hm의 NPTII를 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 형질전환 실험에서 얻어진 17개체에서 절간신장 억제를 보인 7개체를 선택하여 PCR을 수행하였다. NPTII primer를 사용한 PCR 분석 결과, NPTII 유전자의 marker size와 동일한 위치에서 500 bp band가 확인되었으나 야생형에서는 밴드가 나타나지 않았다(Fig. 5).

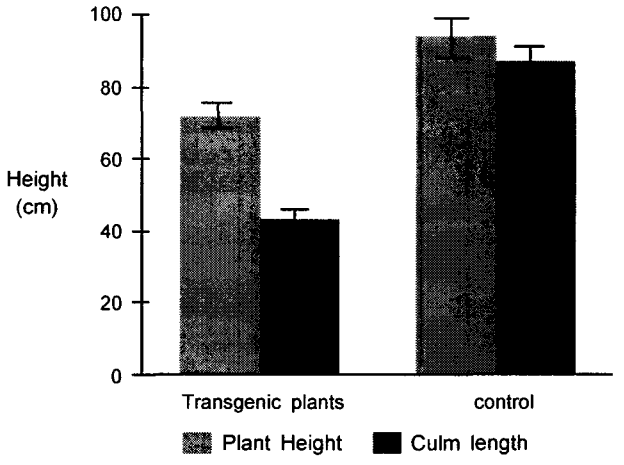

Fig. 4. Difference of plant height and culm length analysis between transgenic plants and control plants.

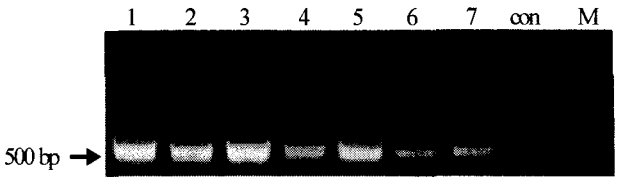

Fig. 5. PCR products amplified from NPTII gene of transgenic plants (T_0). M: Size marker (1kb ladder marker). Lane 1 to 7 ; transgenic Donjinbyeo, con ; untransformed Dongjinbyeo.

적 요

GA 생합성에 결정적 역할을 하는 GA 3β-hydroxylase를 pIG121-Hm 벡터에 GUS 유전자를 빼고 antisense로 클로닝하여 이를 동진벼에 도입한 결과 17개체의 절간신장이 억제된 형질전환한 식물체를 얻을 수 있었다. 일반 재배 동진벼를 대조군으로 하여 비교하였을때 antisense GA 3β-hydroxylase 유전자가 형질도입된 식물체의 획득형질은 평균적으로 대조군에 비해 절간 신장의 억제가 확인되었다. 절간신장의 억제가 보인 개체의 엽육조직을 co취하여 Southen blot hybridization 분석 결과 3개의 line에서 모두 single copy로 도입된 것으로 나타났다. 이로써 T_0 식물체 내에 antisense GA 3β-hydroxylase 유전자를 내포하고 있는 것으로 확인되었다. 이것은 antisense GA 3β-hydroxylase 유전자가 생체 내에서 직접 또는 간접적으로 GA 3β-hydroxylase 유전자의 발현에 관여한 것이라 사료되어진다. .

참 고 문 헌

1. Badula, S. K. and V. K. Sawhaney. 1991. Protein analysis during the ontogeny of ormal and male sterile stamenless-2 mutant stamens of tomato. *Biochem Genet.* **29**, 29-41.
2. Chan, M. T., H. H. Chang., S. L. Ho., W. F. Tong and S. M. Yu. 1993. Agrobacterium-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha-amylase promoter/beta-glucuronidase gene. *Plant Mol Biol.* **22(3)**, 491-506.
3. Chiang, H. H., I. Hwang and H. M. Goodman. 1995. Isolation of the Arabidopsis GA4 locus. *Plant Cell.* **7**, 195-201.
4. Fujioka, S., H. Yamane & Spray, C. R., P. Gaskin, J.

MacMillan, B. O. Phinney and N. Takahashi. 1988. Qualitative and quantitative analyses of gibberellins in vegetative shoots of normal, *dwarf-1, dwarf-2, dwarf-3, and dwarf-5* seedlings of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* **88**, 1367-1372.

5. Hedden, P. and Y. Kamiya. 1997. Gibberellin biosynthesis: Enzymes, genes and their regulation. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 431-460.
6. Hiei, Y., T. Komari and T. Kubo. 1994. Transformation of rice mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Mol Biol.* **35(1-2)**, 205-218.
7. Ingram, T. J., J. B. Reid, W. C. Potts and I. C. Murfet. 1983. Internode length in *Pisum*: The *Le* gene controls the 3ß-hydroxylation of gibberellin A_{20} to gibberellin A_1. *Physiol. Plant.* **59**, 607-616.
8. Itoh, H., M. Tanaka-Ueguchi, H. Kawaide, X. Chen, Y. Kamiya and M. Matsuoka. 1999. The gene encoding tobacco gibberellin 3ß-hydroxylase is expressed at the site of GA action during stem elongation and flower organ development. *Plant J.* **20**, 15-24.
9. Jacobsen, S. E and N. E. Olszewski. 1991. Characterization of the arrest in anther development associated with gibberellin deficiency of the gib-1 mutant of tomato. *Plant Physiol.* **97**, 409-414.
10. Kaneko, M., H. Itoh, M. Ueguchi-Takara, M. Ashikari and M. Matruoka. 2002. The alpha-amylase induction in endosperm during rice seed germination is caused by gibberellin synthesized in epithelium. *Plant Physiol.* **128(4)**, 1264-1270.
11. Kobayashi, M., A. Sakurai, H. Saka and N. Takahashi. 1989. Quantitative - analysis of endogenous gibberellins in normal and dwarf cultivars of rice. *Plant Cell Physiol.* **30**, 963-969.
12. Kobayashi, M., Y. Kamiya, A. Sakurai, H. Saka and N. Takahashi. 1990. Metabolism of gibberellins in cell-free-extracts of anthers from normal and dwarf rice. *Plant Cell Physiol.* **31**, 289-293.
13. Kinoshita, T and N. Shinbashi. 1982. Identification of dwarf gene and their Character expressions in the isogenic background Genetical studies on rice plant. *Jpn. J. Breed.* **32**, 219-231.
14. Koornneef, M and J. H. Van der Veen. 1980. Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana (L) Heynh. Theor. Appl. Genet.* **58**, 257-263.
15. Lange, T., S. Robatzek and A. Frisse. 1997. Cloning and expression of a gibberellin 2ß, 3ß-hydroxylase cDNA from pumpkin endosperm. *Plant Cell.* **9**, 1459-1467.
16. Murakami, Y. 1972. Dwarfing genes in rice and their relation to gibberellin biosynthesis. In Carr DJ, ed, Plant Growth Substrances. p166-174.
17. Murray, M. C and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**, 4321-4325.
18. Rasid, H., S. Yokoi, K. Toriyama and K. Hinata. 1996. Trangenic plant production mediated by Agrobacterium in indica rice. *Plant Cell Rep.* **15**, 727-730.
19. Ross, J. J., I. C. Murfet and J. B. Reid. 1997. Gibberellin mutants. *Physiol. plant.* **100**, 550-560.
20. Saghai-Maroof, M. A., K. A. Soliman, R. A. Jorgensen and R. W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacerlength polymorphisms in barley : Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dyanmics. *Proc Natl Acad Sci USA.* **81**, 8014-8018
21. Silverstone, A. L., C.-W. Chang, E. Krol and T. P. Sun. 1997. Developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene GA_1 in *Arabidopsis thaliana. Plant J.* **12**, 9-19.
22. Smith, R. H. and E. E. Hood. 1995. Reviw and interpretention : Agrobacterium *tumefaciens* transformation of monocotyledons. *Crop Sci.* 301-309.
23. Toyomasu, T., H. Kawaide, W. Mitsuhashi, Y. Inoue and Y. Kamiya. 1998. Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiol.* **118**, 1517-1523.
24. Talon, M., M. Koornneef and J. A. Zeevaart. 1990. Endofenous gibberellins in *Arabidopsis thaliana* and possible steps blocked in the biosynthetic pathways of the semidwarf ga4 and ga5 mutants. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87(20)**, 7983-7987.