

# 수분 수정 시기를 이용한 형질전환 식물의 개발

## Development of transgenic plants by utilization of pollination and fertilization cycle

李孝淵

(순천대학교 자원식물학과)

1980년대부터 분자생물학적 방법이 고등 식물의 연구에도 적용되기 시작했다. 그 후 고등 식물의 염색체에 이종의 DNA를 도입하는 기술이 비약적으로 발전하여 새로운 육종 기술로서 또는 식물 유전자의 발현과 제어를 직접적으로 조사하는 *in vivo* 실험계로서 크게 각광받게 되었다. 이러한 유전자 조작 기술은 미생물에 있어서는 어느 정도 확립되어 있지만 식물의 경우에는 아직도 미비하여 보다 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

형질전환 식물체의 시도는 Ti plasmid에 의한 유전자 도입의 성공한 이후에 지금까지 자연계에 없었던 식물들을 인위적으로 만들 수 있다는 가능성을 보여준 것이다. 형질전환 식물체가 현재 식물 유전공학에 있어서 가장 주목받고 있는 이유는 식물 유전자의 발현과 제어를 조사할 수 있는 새로운 실험계로서의 가치를 가지고 있기 때문이다. 형질전환된 식물의 실험계를 이용하면 살아 있는 식물 중에서 유전자의 발현과 제어를 정성적 또는 정량적으로 연구할 수 있는 가능성이 있다. 현재 식물 분자 생물학자의 관심은 형질전환 식물체에 집중되고 있다고 말해도 과언은 아니다.

지금까지 유용한 유전자를 가진 형질전환된 식물이 상당수 만들어져 있다. 예를 들어 tabtoxin 분해 유전자를 도입한 제초제 저항성 식물, protease inhibitor 유전자를 도입한 해충 저항성 식물, 이외에 virus 저항성 식물 등이 알려져 있다. 그러나 아직도 식물에 필요한 유용 유전자는 그다지 많이 개발되어 있지 않다. 예를 들어 농업에 절대적으로 필요한 내냉성, Virus 이외의 병원균에 대한 저항성, 내건성, 내염성 등 수많은 유용 형질에 관해서는 아직까지 그 분자 기구에 불분명

한 점이 많고, 어떠한 유전자 또는 유전자군을 cloning 하여야 하는지 분명하지 않다. 더구나, 유용 유전자가 cloning 되어도 지금까지는 주로 담배를 model 식물로 사용해 왔다. 그러나, 단자엽 식물(화본과)의 유전자는 대부분의 경우 담배에서 발현되지 않는다고 알려져 왔기 때문에 식물의 종류를 다양하게 사용하여 형질전환 식물체를 만들 필요가 있다.

본 장에서는 필자의 실험을 중심으로 Ti plasmid를 이용한 유전자 도입 방법과 아직 많이 소개되고 있지 않으나 수분 수정 시기를 이용한 direct transformation 방법을 이용하여 쌍자엽, 단자엽 식물에 대해 형질전환 식물체를 만드는 방법에 대해 소개하겠다.

## 1. 受粉·受精 시기를 이용한 bialaphos 저항성 형질전환 식물의 개발

고등식물에 외부유전자를 도입하는 방법은 *Agrobacterium*의 T-DNA를 이용하는 것이 보편적인 방법이고, 그 외에 protoplast에 전기 충격을 주어 도입하는 방법과 최근에는 particle gun 또는 biolistic bombardment를 사용하여 물리적 방법으로 이중 DNA를 식물에 도입하는 방법이 소개되고 있다(Sanford 등, 1987). 상기의 방법은 각각의 장단점이 있다. 예를 들어 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법은 주로 쌍자엽 식물에 국한되어 있으며, 조직배양계가 확립되어 있지 않는 식물에는 적용이 곤란하며 protoplast를 이용한 형질전환 방법은 단자엽 식물에도 적용이 가능하나 이 또한 배양계가 확립되어 있어야 한다. 그 외 particle gun을 이용한 방법은 유전자 도입 방법이 비교적 간단하며 유전자의 발현을 비교적 쉽게 관찰할수 있으나 식물체의 chimera 현상이 일어나기 쉽다.

본 연구에서 사용된 유전자 도입법은 식물의 수분 수정 시기를 이용하여 비선택성 제초제를 분해하는 유전자를 식물에 도입하는 방법에 대해 소개하겠다.

## 재 료 및 방 법

### 식물재료

본 실험에 사용된 재료는 담배(*Nicotiana tabacum* L. cv Wisconsin 38)이며, 온

실에서 약 3개월 재배한후 개화된 개체만을 이용하였다. 벼는 3품종(*Oryza sativa* L. var. Dong jin, Akibare, Nipponbar)을 사용하였다.

#### Plasmid DNA 준비

담배의 야화병을 일으키는 세균(*Pseudomonas syringae* pv. tabaci)으로부터 cloning된 제초제 저항성 유전자(*bar* gene)는 binary vector pBI 121의  $\beta$ -glucuronidase(*Gus*)유전자 부위를 제거하고 그곳에 *bar* 유전자를 치환하여 식물 plasmid pARK5를 만들었다. pARK5의 증식은 *E. coli* HB 101를 숙주로 이용하였으며, plasmid DNA는 Birnboim과 Doly(1979) 방법에 의해 추출하였다.

#### 수분후 Plasmid DNA처리

200  $\mu$ l의 멸균수에 용해된 plasmid DNA 40  $\mu$ g을 담배와 벼의 화분발아용배지 1.8 ml에 혼합해 주었다. DNA 혼합액을 꽃 1개당 micropipette으로 10  $\mu$ l씩 주두 또는 주두를 제거한 암술대의 절단면에 처리하였고, DNA 처리시간은 담배의 경우 자가수분 후 0, 24, 30, 35, 40, 45, 50, 55 시간이 경과한 후에 행하였고, 벼의 경우 개화 2시간 전후에 처리하였다. DNA 처리가 끝난 담배의 꽃은 비닐봉지를 씌워서 DNA가 건조하지 않도록 그늘진 곳에 2일간 보관 하였다.

#### 저항성 식물의 선발

각각의 식물로부터 수확된 종자를 ethanol 70% 용액에 30 초간 담근 뒤 2%의 sodium hypochlorite 용액에 옮겨서 15 분간 표면살균 하였다. 그리고 멸균수로 3회 세척한 후 hormone 무첨가의 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본배지 조성에 kanamycin 80 mg/L과 벼의 경우는 bialaphos 10 mg/L agar 0.8%를 포함한 고형배지에 종자를 치상하였다. 25<sup>o</sup>C의 명조건 하에서 7-30 일간 배양한 후에 전개된 잎이 녹식물로 성장한 것만을 선발하여 순화과정을 거친 뒤 온실에서 재배하였다.

#### T<sub>1</sub> 세대의 kanamycin과 bialaphos 저항성 검증

T<sub>1</sub> 세대로부터 선발된 저항성 식물종에서 외형적으로 정상적인 식물체만을 골라서 자가수분한 뒤에 T<sub>1</sub> 세대의 종자로부터 kanamycin과 bialaphos 저항성 검증을

하였다. 각 처리구의 종자는 상기의 방법과 동일한 방법으로 표면살균한 뒤 hormone 무첨가 MS 기본조성에 kanamycin 80 mg/L 만을 포함한 배지, bialaphos 10 mg/L만을 포함한 배지, kanamycin과 bialaphos를 모두 포함한 고형배지에 종자를 각각 치상하였다. 배양은 25°C 명조조건하에서 행하였다.

#### Southern-blot 및 Northern-blot 분석

T<sub>1</sub> 세대의 형질전환 식물체와 wild type의 담배 및 벼로부터 각각 2 g씩 잎을 채취하여 액체질소로 동결시켜 분쇄한 후 CTAB법(Rogers and Bendich, 1988)에 의해 염색체 DNA를 추출하였다. DNA 10 µg을 *Bam*HI과 *Eco*RI으로 이중절단하여 전기영동에 의해 0.8% agrose gel에 분획한 후 nylon membrane에 전이시켰다. Hybridization은 Southern(1975) 방법에 따라 행하였다.

Probe 제작을 위한 1 Kb의 *bar* 단편(3' nos terminator 포함)은 pARK5 plasmid DNA를 제한효소 *Bam*HI과 *Eco*RI으로 처리하여 얻었으며, 그 단편은 digoxigenin-labelling kits(BM 社, Germany)의 방법에 준하여 표지하였다. 형질전환 식물체와 wild type의 잎으로부터 추출된 전 RNA 50 µg을 formaldehyde를 포함한 1.2% agrose gel에 분획하여 nylon membrane에 전이시켰다. Hybridization 반응조건은 Southern hybridization 방법과 동일하게 행하였다. Band의 검출을 위한 membrane의 발색은 NBT(Nitro-blue tetrazolium)와 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indoly-phosphate)를 기질로 한 표식 항체법에 의해 행하였다.

#### 포장상태에서 담배의 제초제 저항성 검증

T<sub>1</sub> 세대의 식물중에서 bialaphos에 대하여 우성으로 분리되는 개체만을 자식하여 얻은 종자(T<sub>2</sub>)를 실험재료로 이용하였다. 담배 종자는 모래와 상토를 1:1로 혼합한 모판에 파종한 후 온실에서 재배하였다. 본엽이 2-3 매 전개되었을 때 비닐 pot에 묘를 이식하고, 약 1 개월 정도 경과된 후 본엽이 6-7 매 정도 전개 되었을 때 포장에 20 cm 정도의 간격을 두고 정식하였다. 제초제는 정식 후 40 일이 경과된 후에 처리하였고, bialaphos 제초제로는 시판되고 있는 바스타(유효성분 20%, 경농)를 사용하였다. 사용농도는 규정농도(3 g/L)를 중심으로 0.5, 1, 2, 4, 5(g/L)를 살포하였다.

## 결 과

### 1) 담 배

DNA 처리 후 각각의 담배의 화기로부터 형성된 꼬투리에서 종자를 kanamycin이 포함된 MS배지에 파종한 결과 DNA를 처리하지 않은 꽃에서 얻은 종자는 배양 10일 후에 전부 백화되었다. 그러나 수분 후 30-40 시간 사이의 DNA 처리구에서 수확된 종자중에는 kanamycin에 대해 저항성을 보여준 식물들이 출현하였다(Fig.1). 저항성 식물의 출현빈도는 Table 1에서 보여준 것과 같이 DNA 처리 시기에 따라 차이가 있으나 수분후 35 시간이 경과한 후의 DNA 처리구에서 약 0.73%-0.88%로 가장 높게 나타났다. 또 같은 처리구에서도 주두를 제거한 실험구의 종자에서 약간 높은 빈도로 저항성 식물체가 출현하였다.

T<sub>1</sub> 세대의 10주의 식물에 대한 kanamycin과 bialaphos 저항성 유전자의 분리비를 조사한 결과, 7개체에서는 kanamycin과 bialaphos에 대한 저항성 유전형질이 3:1로 분리되었다. 그러나, 남은 3개체중에서 2개체는 저항성 형질이 Mendelian 유전법칙과 다르게 분리되어 현재 검토중이고, 1개체는 bialaphos에 대해서만은 우성형질로 저항성을 나타내지만 kanamycin에 대해서는 비저항성을 보여주었다. 1 Kb의 *bar* 유전자의 단편을 probe로 이용하여 염색체 DNA의 Southern hybridization을 한 결과 wild type에서는 band가 나타나지 않았으나 형질전환 식물체의 DNA에서는 1 Kb 부위에 *bar* 유전자가 존재하는 것이 확인되었고(Fig.2), Northern hybridization한 결과, 형질전환 식물체에서 유전자의 발현을 볼 수 있다(Fig. 3).

포장상태에서 바스타에 대한 제초제 저항성 검증은 Fig. 4에서 보여주었다. 바스타의 사용농도인 3 g/L를 살포한 처리구에서 wild type의 담배와 잡초는 처리 20 일 후에 모두 고사하였지만 T<sub>2</sub> 세대의 형질전환 식물체는 모든 개체가 외부적으로 아무런 피해가 없었다. 그리고 wild type의 담배와 잡초는 1 g/L의 바스타에서도 제초제의 피해를 받았으나 형질전환 식물체는 바스타의 사용 규정농도 보다 높은 4 g/L, 5 g/L의 처리구에 있어서도 저항성을 보여 주었다.

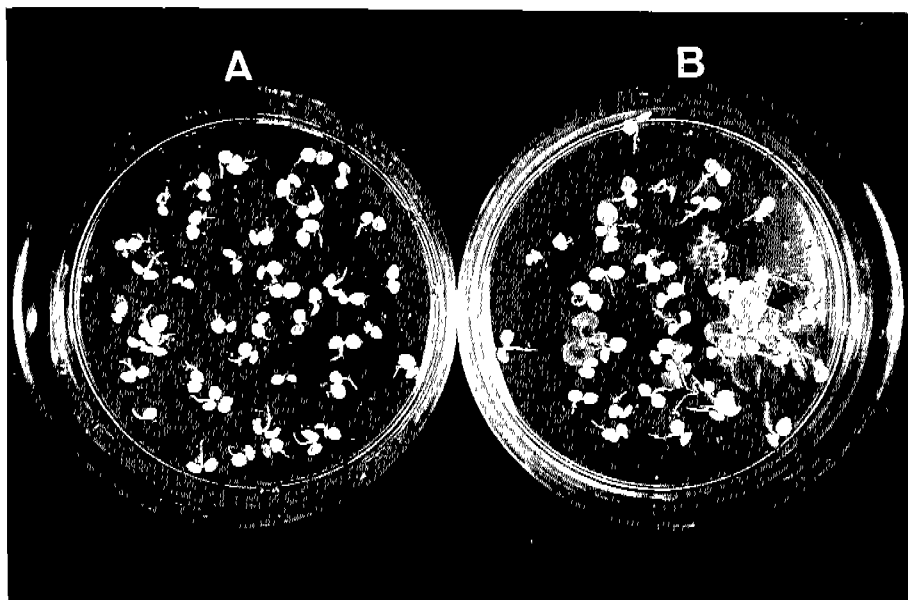


Fig.1. Seedling culture on MS agar medium containing kanamycin sulfate (80 mg/L) for 20 days. A: Wild type seedling B: Seedlings obtained from  $T_0$  seeds. Arrow indicates kanamycin resistant seedlings.

Table 1. Frequency of Kanamycin-resistant seedlings from flowers treated with pARK5 plasmid DNA.

Time of DNA treatment after pollination(hours)	Number of pods	Number of resistant seedlings <sup>a</sup>	Frequency of resistant seedlings(%)
0	7(0) <sup>b</sup>	0(0)	0(0)
24	8(0)	0(0)	0(0)
30	9(5)	23(17)	0.42(0.57)
35	8(8)	35(42)	0.73(0.88)
40	9(9)	12(25)	0.22(0.46)
50	9(9)	0(3)	0(0.55)
55	9(9)	0(0)	0(0)

<sup>a</sup>About 600 seeds per pod were tested for kanamycin resistance.

<sup>b</sup>Numbers in parenthesis indicate data obtained when stigma were removed

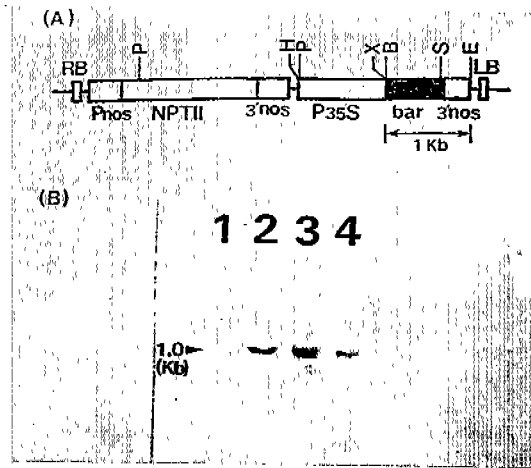


Fig. 2. Profiles of pARK5 map(A) and Southern-blot hybridization(B). pARK5 carrying *bar* gene(800 bp *Bam*HI-*Sac*I fragment), and the fragment replaced the  $\beta$ -glucuronidase gene with the same restriction sites on the plant vector pBI121, locating the *bar* gene between the 35S promoter of CaMV and the nopaline synthase(*nos*) terminator of pTiC58. P, *Pst*I; H, *Hind*III; E, *Eco*RI. The double arrow site was used as probe. Hybridization was carried out using the digoxigenin-labelled *Bam*HI and *Eco*RI(1 Kb). Lane 1, wild type plant; Lane 2,3,4, Bialaphos-resistant plants. In lane 2,3, and 4, a band of 1 Kb showed *bar* gene and 3' *nos* terminator.

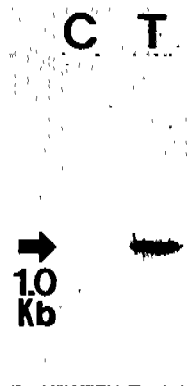


Fig. 3. Profile of Northern blot analysis in progeny( $T_1$ ) of tobacco transformant(T) and wild type(C). Hybridized with non-radioactively labelled(digoxigenin) 1.0 Kb *bar* probe.

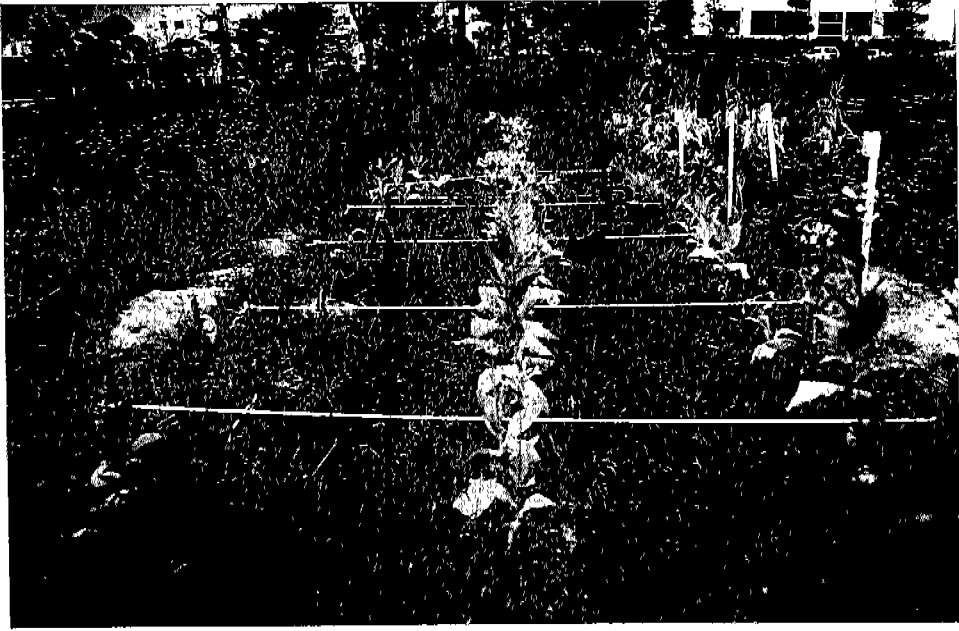


Fig. 4. Growth inhibiting effect of bialaphos in wild types and bialaphos resistant tobacco plants. Transgenic and wild type plants were sprayed with Basta of 0, 5, 1, 2, 3, 4, 5(g/L) per 1.8 m<sup>2</sup>. Transgenic plants(B, C) survived bialaphos spraying and grew to maturity while the control plants(A) stopped growing and died. The photograph shows plants 20 days after spraying.

## 2) 벼

벼의 경우는 DNA 처리구의 화기로부터 종자를 수확하였으나 약 20% 정도의 이삭에서 종자가 맺히지 않았다. 수확된 종자 약 3500 粒에서 kanamycin과 bialaphos에 대해 저항성을 보인 유식물은 7개체(동진2, 추청 3, 일본청2)이었고 정상적으로 생육된 식물은 4개체(동진1, 추청3)이었다.

T<sub>0</sub> 자식세대의 식물(T<sub>1</sub>)에 대한 bialaphos 저항성 유전자의 분리비를 조사한 결과, 개체수가 적어서 아직 분명하지는 않으나, 동진의 경우 우성으로, 추청의 경우 우성과 열성으로 분리되는 것이 모두 포함되어 있었다(Fig. 5). 현재 T<sub>2</sub> 세대의 개체에 대해서 조사중이다.



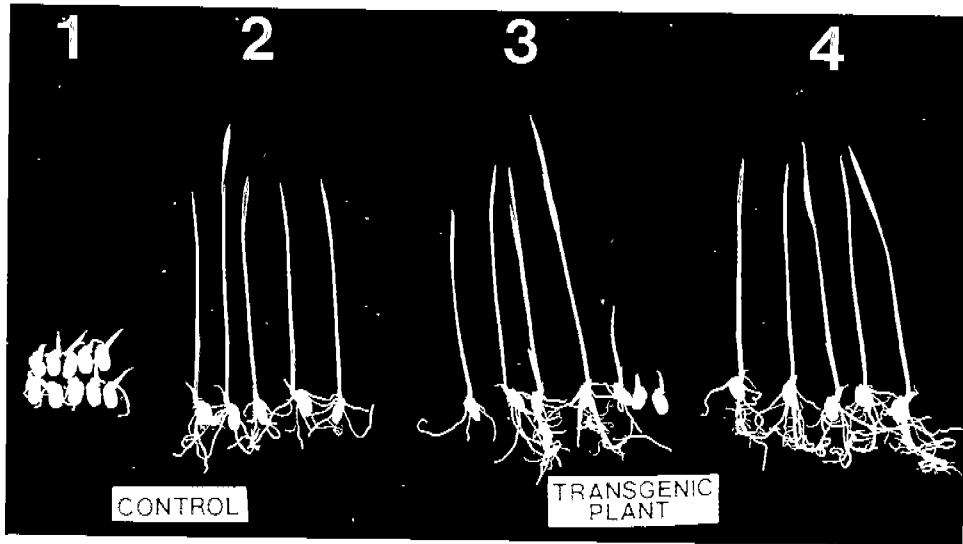


Fig. 5. Growth of progenies(3, 4) of transgenic plants( $T_0$ ), and of the original variety, Dong jin(1, 2), in MS medium with bialaphos or without bialaphos. 1, 3, 4: with 10 mg/L bialaphos; 2: without bialaphos.

1 Kb의 *bar* 유전자의 단편을 probe로 이용하여 DNA와 전체 RNA를 Southern/Northern hybridization을 한 결과 wild type에서는 band가 나타나지 않았으나 형질전환 식물체의 DNA에서는 1 Kb부위에 *bar* 유전자가 존재하는 것이 확인되었고, RNA에서도 1 Kb 부근에서 band가 나타났다(Fig. 6).



Fig. 6. Profile of Northern blot analysis in progeny( $T_1$ ) of rice transformant(T) and wild type(C). Hybridized with non-radioactively labelled(digoxigenin) 1.0 Kb *bar* probe.

## 고 찰

담배의 야화병균인 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*는 담배에 감염하면 tabtoxin이라는 독소를 식물체내에 주어 담배의 glutamine 생합성 대사를 저해하게 된다. 그러면 체내의 암모니아가 축적되어 식물잎에 노란 병반이 나타난다고 보고되었다(Anzai *et al.*, 1989). 이러한 독소를 내는 세균 자체는 그 독소를 분해하는 효소를 갖고 있기 때문에 독소에 대한 피해가 없다. 그러므로 효소 유전자를 식물에 도입하면 식물자체가 독소를 분해할 수 있기 때문에 tabtoxin에 대해 저항성을 보일 수 있다. 현재 사용되고 있는 비선택성 제초제의 일종인 bialaphos는 glutamine 대사를 억제하여 식물체를 고사시키는데 매우 효과적이다. 본 연구에 사용된 *bar* 유전자도 세균(*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*)에서 cloning된 유전자로서 tabtoxine과 bialaphos를 분해할 수 있는 효소 유전자이다.

pARK5의 유전자를 담배에 형질전환 시켜본 결과 T<sub>0</sub> 세대의 종자 중에서 배지상태에서 kanamycin에 대해서 저항성을 보여주는 개체가 선발되었고, Southern blot한 결과 T<sub>1</sub>세대의 식물염색체 DNA 내에도 *bar* 유전자가 안정하게 식물체 내에 존재하는 것이 확인되었다. 특히 그 유전자가 우성 형질에 의해 지배되고 있기 때문에 교배에 의해 F<sub>1</sub> 세대의 다른 품종에 그 형질을 도입할 수 있으리라 생각되며, 야화병에 대해서도 저항성을 갖고 있는지 검토중이다. 포장상태에서 제초제 저항성 실험의 경우에도 형질전환 식물체는 제초제에 저항성을 나타내었고, 바스타를 규정농도 혹은 그 이상으로 살포하여도 외관상 아무런 피해를 받지 않았기 때문에 농업적인 측면에서도 사용 가능하리라 생각된다. 본 실험에 사용된 형질전환 방법은 식물의 수분 수정 시기를 이용한 방법으로서 연구자에 따라 약간의 차이가 있으나 지금까지 옥수수(Dewet *et al.*, 1985; Ohta, 1986), 벼(Luo and Wu, 1988), 담배(Kameya *et al.*, 1992)에서 형질전환 식물체가 만들어졌다. 이 방법의 특징은 쌍자엽, 단자엽 식물에 모두 적용 가능하며, 식물체의 재분화계가 확립되지 않은 식물에도 적용시킬 수 있다. 또 종자를 직접 수확할 수 있기 때문에 다음 세대의 유전적 검증이 매우 유리하며, 조직배양시 많이 발생하는 체세포 변이가 매우 적다. 그러나 꽃 1개당 많은 종자가 맺는 식물이 아니면 처리구를 많이 늘려야 하는 불편한 점이 있고, 수정시기를 정확하게 알고 있지 않으면 형질전환 식물체를

적이다. 그러나 꽃 1개당 많은 종자가 맺는 식물이 아니면 처리구를 많이 늘려야 하는 불편한 점이 있고, 수정시기를 정확하게 알고 있지 않으면 형질전환 식물체를 만들기 어렵다. 현재 어떠한 경로를 통해 외부 유전자가 식물체내에 도입되는지는 분명하지 않으나 수분 수정시기가 하나의 요인이라 생각되고, 화분발아용 buffer의 조성이 형질전환율에 매우 중요한 역할을 하고 있다고 생각된다. 이러한 부분에 대해서는 현재 검토중이며 앞으로 보다 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

이상의 내용으로부터 미생물 자체가 내는 독소를 분해 또는 불활성화하는 효소 유전자가 식물에 도입되어도 그 유전자가 안정된 상태로 발현되기 때문에 앞으로 여러 생물의 균주로 부터 해독 유전자를 cloning하면 식물의 병충해 및 제초제 저항성 품종의 육성에 크게 도움이 되리라 생각된다.

## 2. *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 서양고추냉이(*Armoracia rusticana*)에 옥수수 유동 유전자 도입

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환은 host 범위의 제한성으로 쌍자엽식물의 담배, 토마토, 페튜니아, 애기장대 등의 모델식물 중심으로 연구되고 있다. 이것은 *Agrobacterium*을 이용한 유전자의 식물체 도입에는 여러 제약조건이 있기 때문이며 확립된 배양계가 선행되어야 한다. 십자화과 식물의 경우에는 지금까지 재분화계가 확립된 종은 별로 많지 않으며 형질 전환율도 그다지 높지 않은 것으로 알려져 있다.

서양고추냉이(*Aromoracia rusticana*)는 십자화과의 내한성이 강한 다년생식물로 독특한 향기와 매운 맛이 있고 와사비(*Wasabia japonica*)와 같은 신미성분(sinigrin)이 있어서 일본에서는 粉와사비로 이용되고 있다.

본 실험에서는 십자화과 식물에서 유용유전자를 도입할 목적으로 재분화 능력이 좋은 식물을 탐색하던 중 서양고추냉이 식물조직으로부터 기관의 재분화에 적합한 성장조절물질(NAA와 BA)의 조성을 밝히고, 이의 결과를 토대로 식물체의 잎, 엽병, 뿌리조직에 옥수수의 유동유전자(Ac/Ds)를 식물체 내로 도입시키는데 효과적인 방법과 조건들을 조사하였다.

## 재 료 및 방 법

### 무균 식물의 육성 및 재분화 능력 조사

공시재료는 식물의 세포간극에 세균이 침입되어 있으므로 노지 식물의 잎을 사용해서는 무균식물을 육성하기는 어렵다. 무균주를 육성하기 위해서는 40°C에서 1일간 식물체를 열처리한 후 70% 에탄올에서 15 초간, 2% calcium hypochlorite에서 20분간 소독한 후 각각 3-4회 멸균수로 수세하여 성장점 부위를 해부현미경 하에서 1-2 mm 크기로 적출하여 MS 배지에 치상하여 8개체의 무균식물을 얻었다. 식물들은 기내에서 8주간 배양한 후 잎은 5x5 mm로, 엽병은 굵기가 일정(1 mm)한 것을 길이 7-8 mm로, 뿌리는 직경 0.8 mm 굵기의 것을 길이 10 mm로 절단하여 샐레에 각 처리구당 5 반복씩 치상하였다.

배지는 MS 기본배지에 8 g/L의 agar와 30 g/L의 sucrose를 첨가하였고 배지의 pH는 5.8로 적정하였다. 배양 온도는 20°C, 광은 1,500 lux 전후에서 1일 18시간 조명하였다. 성장조사는 배양 6주 후부터 신초, 뿌리, 생체중으로 나누어 조사하였고, 오옥신으로 naphthalene acetic acid(NAA), 시토키닌은 6-benzyladenine(BA)을 각각 0에서 4.0 mg/L까지 단계별로 농도를 조합하여 처리하였다.

### 공시균주

형질전환에 사용된 식물 vector는 binary vector인 pEND4K였고, pEND4K 증식에 사용된 균주는 *E. coli* HB101이었고 식물의 형질전환에 사용된 균주는 pEND4K로 형질전환시킨 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로써 vector T-DNA의 RB와 LB 사이에 neomycin phosphotransferase II(NPT II) gene과 옥수수 유동유전자인 Ac와 Ds gene이 삽입되어 있다.

### 식물체의 형질전환 및 재분화

기내 식물체의 잎을 5 mm 직경의 코르크보러로 적출하였고, 엽병과 뿌리는 상기 기관분화 시와 동일한 조건으로 절단하여 NAA 0,1 mg/L와 BA 1.0 mg/L가 포함된 MS 배지에 preculture 한 뒤 하루 간 배양한 *Agrobacterium*(LBA4404)을 preculture 호르몬 조성과 동일한 MS 액체 배지에 희석( $10^7$  cell/L)하여 침적, 감염시켰다. 감염된 잎은 멸균된 filter paper로 여분의 액을 제거하고 상기와 동일

한 호르몬 조성의 MS 고체 배지 위에 멸균된 여과지를 한장 깔고 그 위에 시료를 치상하여 28°C, 암소에서 coculture하였다. Coculture에 의해 감염된 잎절편은 상기의 호르몬 조성에 carbenicillin 500 mg/L을 포함한 MS 고체 배지에서 7-10일간 배양하고, 상기 배지에 kanamycin 100 mg/L를 첨가한 배지로 옮겨 3-4주간 25°C에서 배양하였다. 재분화된 shoot는 MS hormone free 배지에 이식하여 발근시켰다. 형질전환에 미치는 preculture 시간(0-4 일), 침적시간(1-30 분), cocultivation 시간(12-72 시간)의 영향을 조사하였다. 엽조직의 kanamycin 내성정도 조사를 위하여 상기의 carbenicillin 배지에 kanamycin 농도별(0-200 mg/L)로 처리하였다. 직접 균주를 묻혀 감염시키는 방법에 의한 형질전환은 엽병을 이용하여 상기의 방법을 토대로 수행하였다.

## 결 과 및 고 찰

### 식물체의 재분화 조건

MS 배지에 NAA와 BA를 각각 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L 농도로 단용 및 조합처리하여 잎, 엽병, 뿌리 부위를 치상한 다음 배양 6 주재 기관 분화율을 조사한 결과, 생존율은 잎에서 53%로 가장 높았고 뿌리에서 19%로 가장 낮았다. 싹형성과 뿌리 형성도 같은 결과를 보였고 유식물체 형성도 잎에서 가장 높았고 엽병, 뿌리부위 순이었다(Table 2).

Table 2. Percentage of organogenesis from leaf, petiole and root explants of horseradish(*Armoracia rusticana*).

Explant	Total number of cultured explant	Survival (%)	Shooting (%)	Rooting (%)	Plantelet formation(%)
Leaf	360	53	31	42	26
Petiole	360	39	20	24	18
Root	360	18	11	15	8

생장조절제의 농도별, 처리조합별 기관분화의 양상은 잎, 엽병, 뿌리부위에서 그 결과가 유사하였는데, BA 0.1-1.0 mg/L까지 multiple shoot가 형성되었고 NAA 0.1-1.0 mg/L까지는 싹과 뿌리형성이 이루어졌으나 NAA와 BA 모두 2.0 mg/L 이상의 고농도에서는 기관분화가 극히 저조하였다. NAA 0.1 mg/L와 BA 1.0 mg/L의 조합 처리구에서 기관분화가 90% 이상으로 가장 높았다(Fig. 7). 생장조절물질을 처리하지 않는 경우에도 기관분화의 시간은 길었으나 싹과 뿌리 형성을 이루어 식물체 조직의 어느 부위에서도 기관분화가 가능하였다.

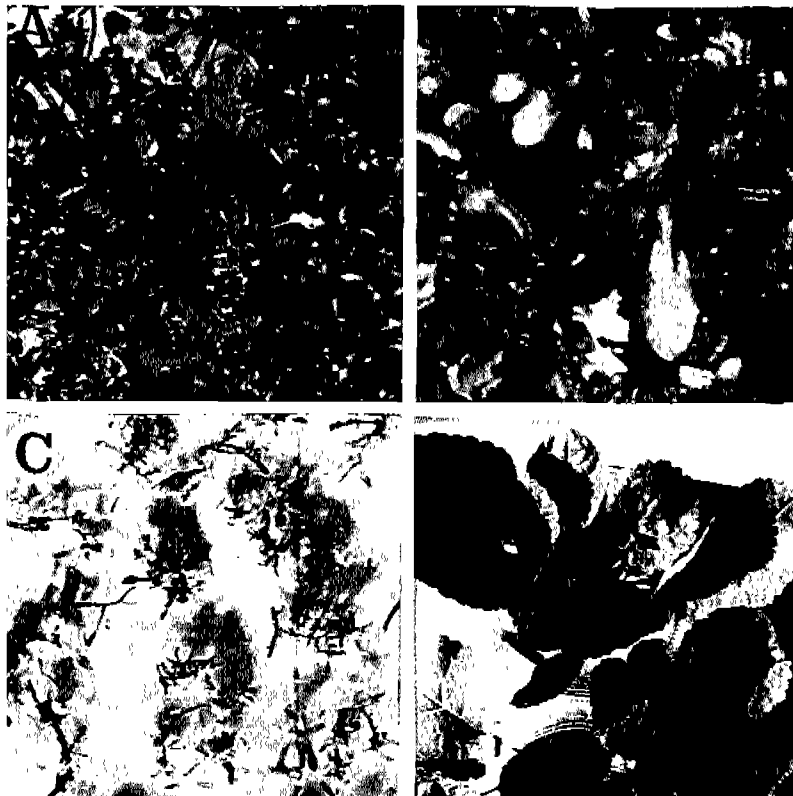


Fig. 7. Plantlet regenerated from leaf(A), petiole(B), and root segment(C) of horseradish. The shoot induced on MS medium supplemented with NAA 0.1 mg/L and BA 1.0 mg/L. D: The plants cultured for 12 weeks.

## 식물체 형질전환 및 재분화

NPT II gene을 선발 marker로 이용하기 위하여 잎절편의 자체 kanamycin 내성을 조사한 결과 배지내의 kanamycin의 농도가 10 mg/L 이상에서는 기관분화가 전혀 불가능하였다(Fig. 8).

형질전환에 미치는 preculture 시간의 영향은 preculture를 하지 않는 경우보다 preculture를 한 경우가 kanamycin 100 mg/L의 선발배지에서 생존율이 높았고 1일간 처리에서 가장 양호하였다. 희석시킨 균주의 식물절편의 침적(감염)시간은 2-3 분에서 가장 효율이 높았고 5분 이상에서는 절편체가 고사하였다. Cocultivation 시간은 24-36 시간에서 가장 양호하였고 cocultivation시 여과지를 고체배지 위에 깔고 배양한 경우가 여과지를 깔지않고 coculture한 경우보다 kanamycin 선발배지에서 생존율이 높았다.

상기의 방법에 의하여 식물조직을 절취하여 1 일간 25°C에서 preculture한 다음 2-3분간 균주에 침적, 감염시켜 24-36 시간 coculture하였다. carbenicillin 500 mg/L가 첨가된 배지에서 5-7 일간 경과한 후 kanamycin 100 mg/L 선발배지로 옮겨 3-4 주 배양시킨 결과 잎과, 엽병, 뿌리 조직중에서 잎에서는 kanamycin 100 mg/L 선발배지에서 shoot가 형성되었으나 엽병과 뿌리에서는 극히 불량하였고(Fig. 9), 감염시킨 잎절편은 배양 5-7 일부터 조직에 미세 캘러스가 형성되면서 2 주후부터는 기관분화가 이루어졌다(Fig. 10). 옥수수 유동유전자 Ac/Ds의 형질전환율은 잎에서 8-10% 정도였고, 엽병에서는 4%의 형질전환 식물체가 출현하였다. 그러나, 뿌리에서는 형질전환 식물체를 얻을 수 없었다(Table 3).

이상의 결과를 종합해 보면, 서양고추냉이는 식물의 각 조직으로부터 높은 재분화율을 보이며, 형질전환율도 잎조직을 이용할 경우 대단히 높기 때문에 십자화과 식물의 유전자 발현과 제어를 연구하기 위한 형질전환계로서 매우 유리한 식물이라고 사료된다.

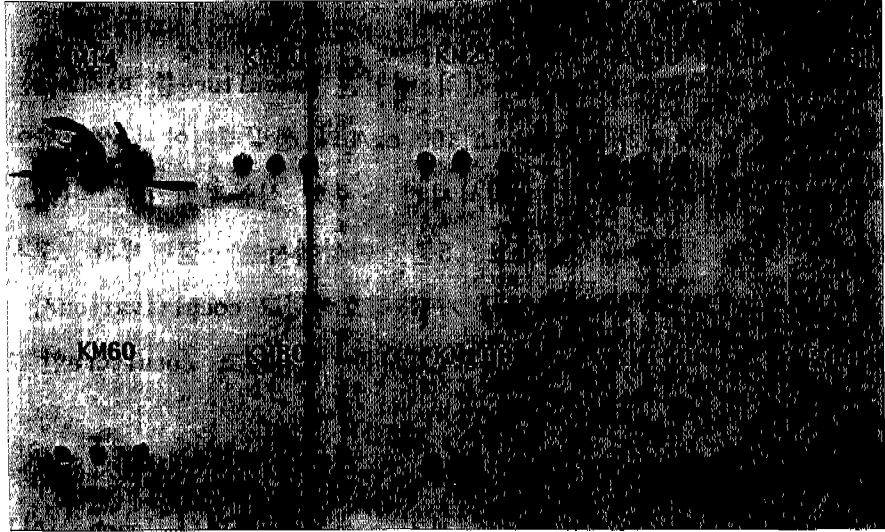


Fig. 8. The effect of kanamycin concentration added to culture medium on survival rate of leaf discs.

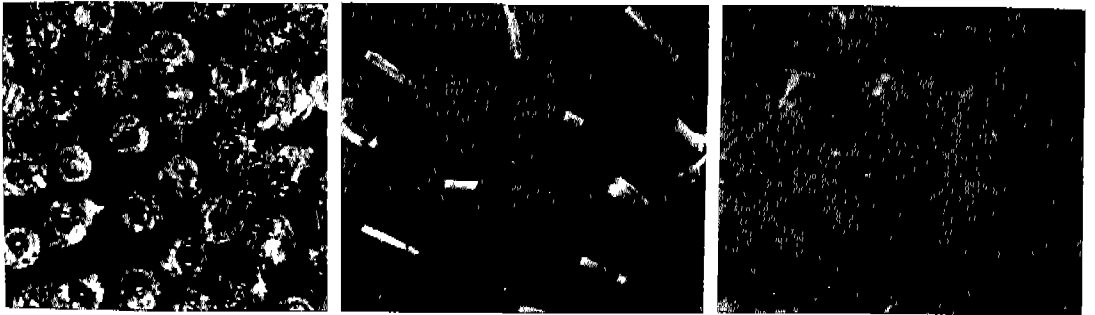


Fig. 9. Shoots induced from horseradish tissues(A: leaf, B: petiole, C: root) on selection medium containing 100 mg/L kanamycin and 500 mg/L carbenicillin. Shoot primordia were formed after one week of inoculation.



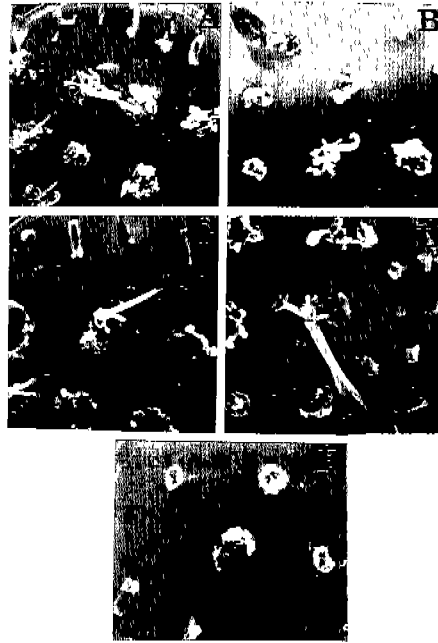


Fig. 10. Shoots formed from leaf disks when they were infected with pEND4K(A), TAc7(B), TAcD1(C), and TDS in *A. tumefaciens* LBA4404 strain. on the other hand without the infection of *A. tumefaciens*, the leaf disks died as shown on the E. The shoots were pictured after incubation on MS medium containing 100 mg/L kanamycin for 2 weeks.

Table 3. Shoot regeneration from different explants of *A. rusticana* with *Agrobacterium*

Explants	No. of explants inoculated <sup>a</sup>		No. of explants producing shoots(%) <sup>b</sup>	
	Ac	Ds	Ac	Ds
Leaf	50	50	5(10)	4(8)
Petiole	50	50	2(4)	2(4)
Root	50	50	0(0)	0(0)

<sup>a</sup>Medium : MS + 0.1 mg/L NAA + 1.0 mg/L BA + 30 g/L sucrose + 8 g/L agar

<sup>b</sup>Shoots were counted at 30 days after explant culture.

## 참 고 문 헌

- Anzai, H., Yoneyama, K., Yamaguchi, I. (1990) Transgenic Tobacco resistant to a bacterial disease by the detoxification of a pathogenic toxin. *Mol. Gen. Genet.* 219: 492-494
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979) A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523
- Dewet, J.M.J., Bergquist, R.R., Harian, J.R., Brink, D.E., Newell, C.E., Dewet, A.E. (1985) Exogenous gene transfer in maize (*Zea mays*) using DNA treated pollen. In experimental manipulation of ovular tissue Chapman, G., S.H. Mantell and W. Daniel (ed.), Longman, London, pp 197-209
- Kameya, T., Lee, H.Y., Toki, S., Kanzaki, H. (1992) Induction of transgenic tobacco plant by utilization of fertilization cycle. *Japan J. Breed* 42: 431-435
- Kondo, Y., Shomura, T., Ogawa, Y., Tsuruoka, T., Watanabe, H., Totsukawa, K., Suzuki T, Moriyama, C., Yoshida, J., Inouye, S., Niidat. (1973) Studies on a new antibiotic SF-1293. Isolation and physico-chemical and biological characterization of SF-1293 substance. *Sci. Rep. Meiji Seika Kaisha* 13: 34-41
- Kumada, Y., Anzai, H., Takano, E., Murakami, T., Hara, O., Itoh, R., Imai, S., Satoh A, Nagaoka, K. (1988) The bialaphos resistance gene (*bar*) plays a role in both self-defense and bialaphos production in *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Antibiot.* 41: 1838-1845
- Luo, Z., Wu, R. (1988) A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. *Plant Mol. Biol. Report* 6: 165-174
- Murakami, T., Anzai, H., Imai, S., Satoh, A., Nagaoka, K., Thompson, CJ (1986) The bialaphos biosynthetic gene of *Streptomyces hygroscopicus*: Molecular cloning and characterization of the gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* 205: 42-50

- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15: 473-497
- Ohta, Y. (1986) High efficiency genetic transformation of maize by a mixture of pollen and exogenous DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 715-719
- Rogers, S.O., Bendich, A.J. (1988) Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual* A6: 1-10
- Toki, S., Takamatsu, S., Nojiri, C., Ooba, S., Anzai, H., Iwata, M., Christensen, A.H., Quail, P.H., Uchimiya, H. (1992) Expression of a maize ubiquitin gene promoter-bar chimeric gene in transgenic rice plants. *Plant Physiol.* 100: 1503-1507
- Shan, D.M., Horsch, R.B., Klee, H.J., Kishore, G.M., Winter, J.A., Tumer, N.E., Hironaka, C.M., Sanders, P.R., Gasser, S.C., Aykent, S., Siegel, N.R., Rogers, S.G., Fraley, R.T. (1986) Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233: 479-481
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.* 98: 505-517
- Thompson, C.J., Movva, N.R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J.E., Lauwereys, M., Botterman, J. (1987) Characterization of herbicide-resistance *bar* gene from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* 6: 2519-2523
- 김진희, 박우권. 1988. 고추냉이의 기관분화시 기관분화에 미치는 NAA 및 BA의 효과. *한국원예학회지*. 29(4): 272-282.
- 손재근, 조현석. 1991. 유체의 자엽조직과 *Agrobacterium tumefaciens*와의 Cocultivation에 의한 형질전환. *식물조직배양학회지*. 18(2): 113-118.
- 안병준, 노희영, 최윤영. 1993. 옥수수 유동유전자 재조합에 의한 페추니아 유전자 표시. *식물조직배양학회지*. 20(1): 9-14.
- 임용표, 박성원, 천제이, 델라포타 에스엘, 최광태. 1990. Binary vector pEND4K를 이용한 유동유전자 Ac와 Ds의 연초내 형질전환. *식물조직배양학회지*. 17(2): 119-127.