

受粉·受精 시기를 이용한 Bialaphos 저항성 형질전환 담배의 개발

이효연* · 노일섭¹ · 김진호 · 유장렬² · 이종석³ · 김학진 · 龜谷壽昭⁴

순천대학교 농과대학, ¹일본 동북대학 농학부, ²과학기술원 유전공학 연구소,
³서울여자대학교 자연과학대학, ⁴일본 동북대학 유전생태연구소

Development of Bialaphos Resistant Transgenic Tobacco Plants by Pollination and Utilization of Fertilization Cycle

Hyo Y. LEE*, Ill S. NOU¹, Jin H. KIM, Jang R. LIU², Jong S. LEE³, Hak J. KIM, and Toshiaki KAMEYA⁴

College of Agriculture, Suncheon National University, Suncheon, 540-742; ¹Faculty of Agriculture, Tohoku University, 981, Japan; ²Plant Cell Biology Lab., Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O. Box 17, Taedok Science Town, Taejon, 305-606; ³College of Natural Science, Seoul Woman University, Seoul, 228-32; and ⁴Institute of Genetic Ecology, Tohoku University, Sendai, 980, Japan. *Corresponding author.

The herbicide bialaphos is a potent inhibitor of glutamine synthetase in higher plants. A bialaphos resistance (*bar*) gene encoding for an acetyltransferase was isolated from genomic DNA of *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. The *bar* gene was ligated to the binary vector pBI121. Pistils of tobacco plants were treated with the *bar* gene containing plasmid DNA at various times after pollination. When the treatment was applied at 30 and 40 h after pollination, a number of transgenic plants were obtained. Primary transformants (T_0 generation) and their progenies (T_2 , T_3) were resistant to both bialaphos and kanamycin at a dosage lethal to untransformed control plants. Stable integration of *bar* gene into chromosomal DNA was proven by Southern blot analysis of genomic DNA isolated from T_1 progenies. These results show that the bialaphos resistant plants could be obtained by treatment to pistils with the exogenous *bar* gene through the fertilization cycle of tobacco.

Key words: *bar* gene, direct transformation, *Nicotiana tabacum*, transgenic plants.

유전자 도입 기술은 여러생물로 부터 분리된 외부유전자를 고등식물에 도입할 수 있는 획기적 수단이며 이러한 기술을 이용하여 이미 바이러스 저항성, 해충저항성 식물 등 농업적으로 유용한 식물들이 만들어 지고 있다. 1년생 작물을 재배할때 어려운 문제점 중의 하나는 제초작업이다. 현재 작물의 생육 기간 중에는 선택성 제초제가 일반적으로 사용되나, 선택성 제초제로는 모든 잡초를 제거하기 어렵다. 비선택성 제초제는 대부분의 쌍자엽, 단자엽의 잡초를

제거 할 수 있으나 재배작물의 생육 기간중에는 사용할 수 없다. 그러므로 주 작물을 재배하기 전의 토양이나 또는 목본류 주위의 잡초제거에만 사용하여 왔다. 그러므로 1년생 작물을 재배하는데 있어서 제초문제를 해결하는 방법으로는 재배작물에 비선택성 제초제를 분해하는 유전자를 도입하는 것이 바람직한 방법이라고 생각된다.

비선택성 제초제의 일종인 bialaphos를 분해하는 유전자가 이미 *Streptomyces hygroscopicus* SF 1293으로부터 분리

동정 되었고(Kondo et al., 1973), 그 기작에 대해서도 보고 되었다(Murakami et al., 1986; Thompson et al., 1987; Kumada et al., 1988).

지금까지 비선택성 제초제를 분해하는 유전자를 폐츄니아(Shan et al., 1986), 벼(Toki et al., 1992)등에 형질전환 시켜서 비선택성 제초제인 glyphosate, bialaphos에 대하여 피해가 없는 식물이 개발 되었다. 본 연구에서는 bialaphos 분해유전자(*bar* gene)를 식물의 개화기에 직접 도입하는 direct transformation 방법을 이용하여 비선택성 제초제에 대해서 저항성을 갖는 담배를 만드는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에 사용된 재료는 담배(*Nicotiana tabacum* L. cv Wisconsin 38)이며, 온실에서 약 3개월 재배한 후 개화된 개체만을 이용하였다.

Plasmid DNA 준비

담배의 野火病을 일으키는 세균(*Pseudomonas syringae* pv. tabaci)으로 부터 cloning된 제초제 저항성 유전자(*bar* gene)는 北海道大學의 Dr. Toki로부터 받았다. 이 유전자는 식물체내에서 발현 가능한 binary vector pBI 121의 B-glucuronidase (*gus*)유전자 부위를 제거하고 그곳에 *bar* 유전자를 치환하여 식물 plasmid pARK5를 만들었다. pARK5의 증식은 *E. coli* HB 101를 숙주로 이용하였으며, plasmid DNA는 Birboim과 Doly(1979) 방법에 의해 추출 하였다.

수분 후 Plasmid DNA 처리

200 μ L의 멸균수에 용해된 plasmid DNA 40 μ g을 화분 발아용 배지(H_3BO_3 100 mg/L, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 300 mg/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 200 mg/L, KNO_3 100 mg/L, Sucrose 10%) 1.8 mL에 혼합해 주었다. DNA 혼합액을 꽃 1개당 micro pipette으로 10 μ L씩 주두 또는 주두를 제거한 암술대의 절단면에 처리하였고, DNA 처리시간은 자가수분 후 0, 24, 30, 35, 40, 45, 50, 55시간이 경과한 후에 행하였다. DNA 처리시간을 위와 같이 설정한 것은 Kameya (1992) 등이 보고한 실험결과를 참조하였기 때문이다. DNA 처리가 끝난 꽃은 비닐봉지를 씌워서 DNA가 건조하지 않도록 그늘진 곳에 2일간 보관 하였다. 각 처리구당 사용된 꽃은 3개이고 실험은 3반복으로 행하였다. DNA처리를 하지않고 자가수분 시킨 식물을 대조구로 사용하였다.

Kanamycin 저항성 식물의 선발

DNA 처리 후 약 45일 후에 각 처리구의 꼬투리로 부터 종자를 수확하였다. 각 꼬투리의 종자를 에탄올 70%용액에 30초간 담근뒤 2%의 sodium hypochlorite용액에 옮겨서 15분간 표면 살균 하였다. 그리고 멸균수로 3회 세척한 후 hormone 무첨가의 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지조성에 kanamycin 80 mg/L과 agar 0.8%를 포함한 고형배지에 종자를 치상 하였다. 25°C의 명조건 하에서 30일간 배양한 후에 전개된 잎이 녹색물로 성장한 것만을 선발하여 순화과정을 거친 뒤 온실에서 재배하였다.

T₁세대의 Kanamycin과 Bialaphos 저항성 검증

수분 후 35시간경과 후의 DNA처리구로 부터 선발된 kanamycin 저항성 식물중에서 외형적으로 정상적인 식물 10개체만을 골라서 자가수분한 뒤에 T₁세대의 종자로 부터 kanamycin과 bialaphos 저항성 검증을 하였다.

각 처리구의 종자는 상기의 방법과 동일한 방법으로 표면 살균한 뒤 hormone 무첨가 MS 기본조성에 kanamycin 80 mg/L만을 포함한 배지, bialaphos 10 mg/L만을 포함한 배지, kanamycin과 bialaphos를 모두 포함한 고형배지에 종자를 각각 치상하였다. 배양은 25°C 명조건 하에서 행하였다. Kanamycin과 bialaphose 저항성 검증은 파종 후 30일 후에 조사 하였다.

Southern-blot 분석

T₁세대의 형질전환 식물체와 wild type의 담배로 부터 각각 2g씩 잎을 채취하여 액체질소로 동결시켜 분쇄한 후 CTAB법(Rogers and Bendich 1988)에 의해 염색체 DNA를 추출하였다. DNA 10 μ g을 BamHI과 EcoRI으로 2중소화하여 전기영동에 의해 0.8% agrose gel에 분획한 후 nylon membrane에 전사시켰다. Hybridization은 Southern(1975)방법에 따라 행하였다. probe작제를 위한 1Kb의 *bar* 단편은 (3'nos terminator포함) pARK5 plasmid DNA 를 제한효소 BamHI과 EcoRI으로 처리하여 얻었으며, 그 단편은 digoxigenin-labelling kits (BM社, Germany)의 방법에 준하여 labelling 하였다. Band의 검출을 위한 membrane의 발색은 NBT(Nitro-blue tetrazolium)와 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indoly-phosphate)를 기질로한 표식 항체법에 의해 행하였다.

포장상태에서 제초제 저항성 검증

T₁세대의 식물중에서 bialaphos에 대하여 우성으로 분리

되는 개체만을 자식하여 얻은 종자(T₂)를 실험재료로 이용하였다.

담배종자는 모래와 상토를 1:1로 혼합한 모판에 파종한 후 온실에서 재배하였다. 본엽이 2-3매 전개 되었을때 비닐 pot에 묘를 이식하고, 약 1개월정도 경과된 후 본엽이 6-7매 정도 전개 되었을때 포장에 20 cm정도의 간격을 두고 묘를 정식 하였다. 제초제는 정식 후 40일이 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 살포 하였다.

결 과

DNA 처리 후 각각의 화기로 부터 형성된 꼬투리에서 종자를 kanamycin이 포함된 MS배지에 파종한 결과 DNA를 처리하지 않은 꽃에서 얻은 종자는 배양 10일 후에 전부 백화 되었다. 그러나 수분 후 30-40시간 사이의 DNA 처리구에서 수확된 종자중에는 kanamycin에 대해 저항성을 보여준 식물들이 출현 하였다(Fig. 1). 저항성 식물의 출현빈도는 Table 1에서 보여준 것과 같이 DNA 처리시기에 따라 차이가 있으나 수분 후 35시간이 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.

T₁세대의 10주의 식물에대한 kanamycin과 bialaphos 저항성 유전자의 분리비를 조사한 결과, 7개체에서는 kanamycin과 bialaphos 대한 저항성 유전형질이 3:1로 분리되었다. 그러나, 남은 3개체중에서 2개체는 저항성 형질이 Mendelian 유전법칙과 다르게 분리되어 현재 검토중이고, 1개체는

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 ^a	Frequency of resistant seedling (%)
0	7 (0) ^b	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)

^aAbout 600 seeds per pod were tested for kanamycin resistance.

^bNumbers in parentheses indicate data obtained when stigma were removed.

bialaphos에 대해서만은 우성형질로 저항성을 나타내지만 kanamycin에 대해서는 비저항성을 보여주었다. 1Kb의 bar 유전자의 단편을 probe로 이용하여 염색체 DNA의 Southern hybridization을 한 결과 wild type에서는 band가 나타나지 않았으나 형질전환 식물체의 DNA에서는 1Kb부위에 bar 유전자가 존재하는 것이 확인 되었다(Fig. 2).

포장상태에서 바스타에 대한 제초제 저항성 검증은 Fig. 3에서 보여 주었다. 바스타의 사용농도인 3 g/L를 살포한 처리구에서 wild type의 담배와 잡초는 처리 20일 후에 모두 고사하였지만 T₂세대의 형질전환 식물체는 모든 개체가 외부적으로 아무런 피해가 없었다. 그리고 wild type의 담배

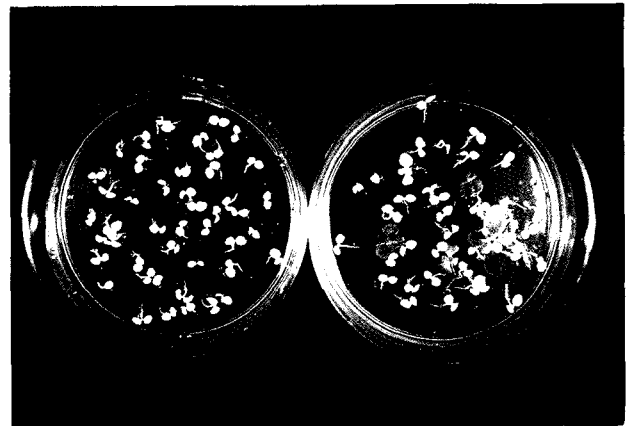


Figure 1. Seedling culture on MS agar medium containing kanamycin sulfate (80 mg/L) for 20 days. A: Wild type seedlings B: Seedlings obtained from T₀ seeds. Arrow indicates kanamycin-resistant seedlings.



Figure 3. 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 m² 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.

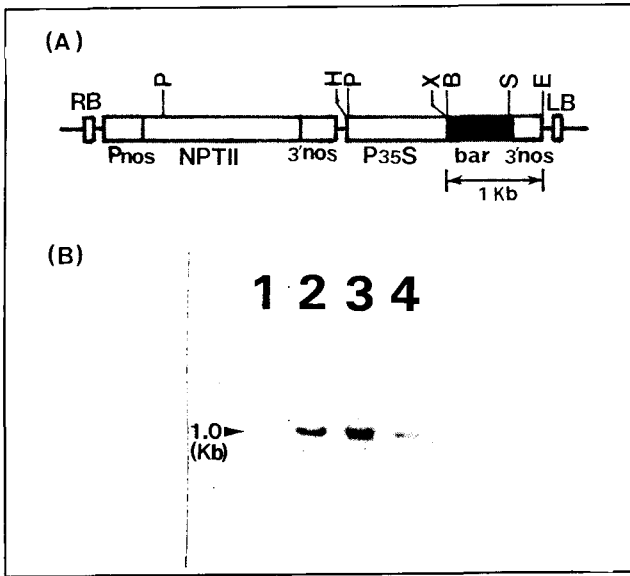


Figure 2. Profiles of pARK5 map (A) and Southern-blot hybridization (B). pARK5 carrying bar gene (800bp BamHI-SacI fragment), and the fragment replaced the B-glucuronidase gene with the same restriction sites on the plant vector pBI121, locating the bar gene between the 35S promoter of CaMV and the nopaline synthase (nos) terminator of pTiC58. P: PstI, H: HE: EcoRI. The double arrow site was used as probe. Hybridization was carried out using the digoxigenin-labeled BamHI and EcoRI (1kb). Lane 1: Wild type plant. Lane 2, 3, 4: Bialaphos-resistant plants. In lane 2, 3, and 4, a band of 1kb showed bar gene and 3'nos terminator.

와 잡초는 1 g/L의 바스타에서도 제초제의 피해를 받았으나 형질전환 식물체는 바스타의 사용 규정농도 보다 높은 4 g/L, 5 g/L의 처리구에 있어도 저항성을 보여 주었다.

고 찰

담배의 야화병균인 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*는 담배에 감염하면 tabtoxin이라는 독소를 식물체내에 주어 담배의 glutamin 생합성 대사를 저해하게 된다. 그러면 체내의 암모니아가 축적되어 식물잎에 노란 병반이 나타난다고 보고 되었다(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 분해 할 수 있기 때문에 tabtoxin에 대해 저항성을 보일 수 있다.

현재 사용되고 있는 비선택성 제초제의 일종인 bialaphos는 glutamin대사를 억제하여 식물체를 고사 시키는데 매우

효과적이다. 본 연구에 사용된 bar유전자도 세균(*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*)에서 cloning된 유전자로서 tabtoxin과 bialaphos를 분해 할 수 있는 효소 유전자이다.

pARK5의 유전자를 담배에 형질전환 시켜본 결과 T0세대의 종자 중에서 배지상태에서 kanamycin에 대해서 저항성을 보여주는 개체가 선발 되었고, Southern blot한 결과 T1세대의 식물염색체 DNA내에도 bar유전자가 안정하게 식물체내에 존재하는 것이 확인 되었다. 특히 그 유전자가 우성 형질에 의해 지배되고 있기 때문에 교배에 의해 F1세대의 다른 품종에 그 형질을 도입 할 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 만들어 졌다. 이 방법의 특징은 쌍자엽, 단자엽 식물에 모두 적용 가능하며, 식물체의 재분화계가 확립되지 않은 식물에도 적용 시킬 수 있다. 또 종자를 직접 수확 할 수 있기 때문에 다음세대의 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 정확히 알고 있지 않으면 형질전환 식물체를 만들기 어렵다. 현재 어떠한 경로를 통해 외부 유전자가 식물체내에 도입되는 지는 분명하지 않으나 수분 수정시기가 하나의 요인이라 생각되고, 이러한 부분에 대해서는 현재 검토중이며 앞으로 보다 많은 연구가 필요하다고 생각 된다.

이상의 내용으로 부터 미생물 자체가 내는 독소를 분해 또는 불활성화 하는 효소 유전자가 식물에 도입 되어도 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.

적 요

비선택성 제초제인 bialaphos는 고등식물에 있어서 glutamine 합성을 억제하여 식물체를 고사 시키는 능력을 갖고 있다. 본 연구에서 acetyltransferase에 의해 encoding된 bialaphos 저항성 유전자(bar gene)는 세균(*Pseudomonas*

syringae pv *tabaci*)의 genomic DNA로 부터 cloning된 것을 사용하였다. 수분시킨 담배의 花柱에 일정한 시간별로 *bar* 유전자를 처리한 결과 수분 후 30-40시간 사이의 처리구에서 형질전환 식물체가 가장 많이 얻어 졌다. 그러한 형질전환 식물체의 kanamycin과 bialaphos 저항성 형질은 자식 후대(T₁, T₂)에 있어서도 우성형질로 유전 되었으나 wild type의 담배는 상기의 약제를 처리 하였을때 전부 고사 하였다. 그리고, T₁세대의 형질전환 식물체로 부터 전 염색체 DNA를 추출하여 Southern 분석한 결과 *bar*유전자가 식물의 염색체상에 안정하게 존재하는 것을 확인 하였다. 이상의 결과로부터 담배의 수분, 수정 시기에 외부유전자인 *bar*를 화주에 처리함으로써 bialaphos 저항성 식물을 만들어 낼 수 있었다.

사 사

본 논문은 1992-1993년도 유전공학연구소의 위탁 연구과제에 의해 수행된 것임. 포장시험에 도움을 주었던 송동석 선생님과 엄순임양에게 감사한다.

인 용 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
- Bimboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7** : 1513-1523
- Dewet JMJ, Bergquist RR, Harian JR, Brink DE, Newell CE, Dewet AE (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 HY, 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 Molec 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 USA* **83** : 715-719
- Rogers SO, Bendich AJ (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 AH, Quail PH, Uchimiya H (1992) Expression of a maize ubiquitin gene promoter-*bar* chimeric gene in transgenic rice plants. *Plant Physiol* **100** : 1503-1507
- Shan DM, Horsch RB, Klee HJ, Kishore GM, Winter JA, Tumer NE, Hironaka CM, Sanders PR, Gasser SC, Aykent S, Siegel NR, Rogers SG, Fraley RT (1986) Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* **233** : 479-481
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98** : 505-517
- Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Cramer R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J (1987) Characterization of herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J* **6** : 2519-2523

(1994년 1월 19일 접수)