

Agrobacterium에 의한 더덕의 형질전환과 식물체 재분화

최필선^{1,2} · 김운성¹ · 유장렬^{*1} · 소웅영²

¹한국과학기술연구원 유전공학연구소 생물자원연구그룹,
²전북대학교 자연대학 생물학과

Genetic Transformation and Plant Regeneration of *Codonopsis lanceolata* Using *Agrobacterium*

Pil S. CHOI^{1,2}, Youn S. KIM¹, Jang R. LIU^{*1}, and Woong Y. SOH²

¹Bioresources Research Group, Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O. Box 115, Yusung, Taejeon, 305-600:
and ²Department of Biology, Chonbuk National University, Chonju 565-890. *Corresponding author.

To obtain transformed plants, we cocultured cotyledonary explants of *Codonopsis lanceolata* with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, a disarmed strain harboring a binary vector pBI121 carrying the CaMV35S promoter- β -glucuronidase (GUS) gene fusion used as a reporter gene and NOS promoter-neomycin phosphotransferase gene as a positive selection marker in MS liquid medium with 1 mg/L BA. After 48 h of culture, explants were transferred onto MS solid medium with 1 mg/L BA, 250 mg/L carbenicillin, and 100 mg/L kanamycin sulfate and cultured in the dark. Numerous adventitious buds formed on the cut edges of the explants after 2 weeks of culture. When subjected to GUS histochemical assay, buds showed a positive response at a frequency of 15%. Explants formed adventitious shoots at a frequency of 56.7% after 6 weeks of culture. Upon transfer onto the basal medium, most of the shoots were rooted and subsequently the regenerants were transplanted to potting soil. Southern blot analysis confirmed that the GUS gene was incorporated into the genomic DNA of the GUS-positive regenerants.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, cotyledonary explants, β -glucuronidase, transformed plants

더덕은 초롱꽃과에 속하는 다년생 초본식물로서 주근은 한국, 일본, 중국 등에서 약용 및 식용으로 이용된다. 최근 에 더덕의 수요가 급증하고 있으나 품종개량을 위한 연구 가 거의 이루어지지 않고 있으며 다만 체세포배발생 경로를 이용한 식물체 재분화 시스템이 Min 등(1992)에 의하여 확립된 바 있다.

더덕은 습기가 많은 토양에서 재배할 경우 식물체가 병 원성 곰팡이 감염으로 생장이 억제되거나 부패된다. 이러한 문제를 해결하기 위한 방법으로 담배에서 처럼 외래 chitinase 유전자를 더덕에 도입하여 볼 수 있다 (Brogli et al., 1991). 본 연구에서는 *Agrobacterium*을 이용하여 여러 가지 유용한 유전자를 식물체에 도입시키기 위한 방법을 개발 할 목적으로 reporter gene으로서 대장균의 β -glucuronidase (GUS) 유전자를 더덕의 성숙한 접합자배의 자엽절편에 도입 하여 기관발생 경로로 형질전환된 식물체를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

더덕 (*Codonopsis lanceolata*)의 종자를 발아시킨 유식물 체 (Min et al., 1992)의 자엽을 2 × 3 mm의 크기의 절편으 로 잘라서 *Agrobacterium*과 공동배양하였다.

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환

CaMV 35S promoter-GUS 유전자와 neomycin phosphotransferase (NPT-II) 유전자를 selectable marker를 포함하고 있는 pBI121 binary 벡터 (Jefferson et al., 1987)를 heat shock 방법 (An, 1987)으로 도입한 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 공동배양에 사용하였다. 자엽절편을

YEP 배지에서 대수기 상태에 있는 *Agrobacterium*과 48시간 동안 1 mg/L BA를 첨가한 MS (Murashige and Skoog, 1962) 액체 배지에서 공동배양하였다. 이들 절편을 Whatman 여과지로 blotting한 후 1 mg/L BA, 100 mg/L kanamycin sulfate 및 500 mg/L carbenicillin이 첨가된 MS 고체배지 (0.4% Phytigel)에 옮겨 25°C의 암조건에서 배양하였다. 고체배지는 87 × 15 mm 플라스틱 페트리디쉬에 25 ml씩 분주하여 사용하였으며 절편은 페트리디쉬당 20개씩 10반복으로 배양하였다. 배양 6주째에 부정아 형성률과 형성된 부정아의 GUS 활성여부를 조사하였다.

형질전환된 부정아로부터 식물체 재생

*Agrobacterium*과 공동배양한 후 6주째에 GUS 양성반응을 보인 부정아를 절편으로부터 선별한 다음, 이러한 부정아로부터 완전한 식물체를 얻기 위하여 500 mg/L carbenicillin, 100 mg/L kanamycin sulfate를 첨가한 MS 기본배지에 옮겨 25°C에서 16시간 광주기 (cool-white 형광등, 약 2,000 lx)로 6주 동안 배양 후 재분화율을 조사하였다.

GUS 활성의 조직학적 분석

공동배양한 절편에서 형성된 부정아를 10개씩 4반복으로 취하여 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid (X-gluc) 용액에 첨가하였다. 37°C에서 약 16시간 경과 후 GUS 양성반응을 보인 부정아를 형질전환된 것으로 판정하였다. 대조구로서는 *Agrobacterium*과 공동배양하지 않은 절

편에서 형성된 부정아를 사용하였다.

재분화 개체의 토양이식과 Southern 분석

GUS 양성과 음성반응을 보인 부정아로부터 발달된 재분화 개체를 토양에 이식한 후 순화과정을 거쳐 인공기상실 (RH 60-70%, 27°C 명/ 22°C 암, 16시간 광주기, 약 30,000 lux)에서 키웠다. 이러한 식물체의 잎절편으로부터 게놈 DNA는 CTAB방법에 의해서 추출하였다. 또한 식물체의 오염 여부와 유전자의 삽입 여부를 확인하기 위하여 DNA를 EcoRI과 HindIII 제한효소 반응액에 37°C에서 4시간 동안 반응시켜 절단한 후 0.7% agrose gel에 전기영동하였다. 확인된 DNA 밴드를 positive-charged nylon membrane에 옮겨 digoxigenine로 표지된 2.2 kb GUS NOS poly(A) 검침을 이용하여 Southern 분석을 하였다.

결 과

부정아 형성 및 식물체 재분화

*Agrobacterium*과 공동배양한 후 MS배지에서 배양한 자엽 절편은 배양후 2주째부터 절단면으로부터 캘러스를 형성하지 않고 직접 많은 수의 부정아를 형성하였다 (Figure 1A). 배양 6주후에는 절편중 약 43%가 괴사하였으며, 56.7% ± 2.19 (표준오차)에서 shoot가 발달하였다 (Figure 1C). 1 cm 정도의 shoot을 기본배지로 옮겨서 배양한 결과, 4주 후 대

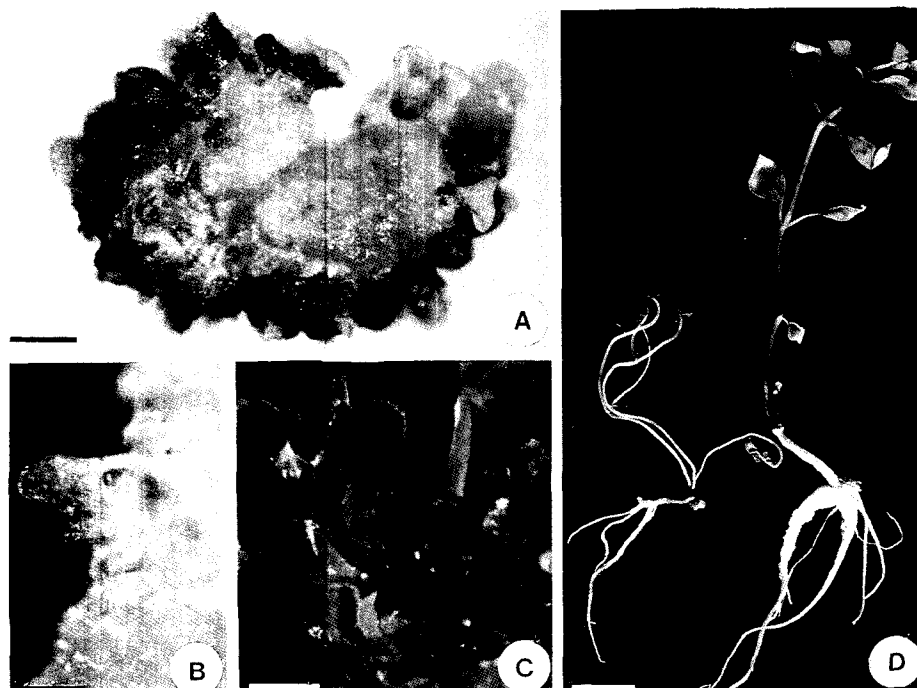


Figure 1. Plant regeneration in cotyledonary explant cultures of *C. lanceolata*. A: Numerous adventitious buds formed on the cut edge of cotyledonary explant after 2 weeks of culture (bar = 500 μm); B: GUS-positive adventitious bud (bar = 200 μm); C: Elongated shoots from adventitious buds after 6 weeks of culture (bar = 800 μm); D: A regenerant potted in soil (bar = 3 cm).

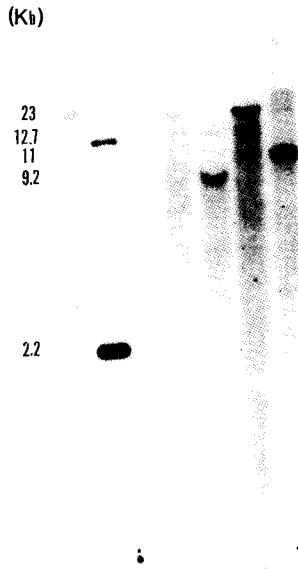


Figure 2. Southern blot analysis of GUS-positive and GUS-negative regenerants of *C. lanceolata*. Each lane was loaded with the following DNA: Lane 1: pBI121 digested with *EcoRI/BamHI*; Lane 2: GUS-negative regenerant digested with *EcoRI*; Lane 3: GUS-positive regenerant I digested with *EcoRI*; Lane 4: GUS-positive regenerant I digested with *HindIII*; Lane 5: GUS-positive regenerant II digested with *EcoRI*; Lane 6: GUS-positive regenerant III digested with *HindIII*. Regenerant I, II, and III indicate three individual regenerants.

부분 발근하였으며 (Figure 1D) 이를 토양에 이식하여 인공 기상실에서 키웠다.

GUS 활성 분석

배양 2주 후 공동배양한 절편에서 형성된 부정아 중 15% \pm 2.9 (표준오차) 가 GUS 양성반응을 보였으며 (Figure 1B), 공동배양하지 않은 절편에서 형성된 부정아는 모두 음성반응을 나타내었다.

Southern 분석

재분화개체를 토양에 이식하여 인공기상실에서 성숙시킨 후 이들 개체로부터 추출한 게놈 DNA의 Southern 분석 결과, 밴드의 크기와 수는 재분화된 식물체 모두에서 같은 경향을 나타내었다. *EcoRI*을 처리하였을 때에는 23 kb 이상되는 단일밴드가, *HindIII*에서는 서로 다른 두개의 개체로부터 9.2 kb와 11 kb 크기의 단일 밴드가 각각 관찰되었다. 또한 벡터크기 (12.7 kb)의 밴드는 관찰되지 않았으므로 더덕 식물체 게놈 DNA에서 확인된 밴드는 *Agrobacterium* 오염에 의한 것이 아님을 알 수 있었다 (Figure 2). 이와 같이 GUS 양성반응을 보인 부정아로부터 발달된 식물체의 게놈 DNA 일부에 GUS 유전자가 삽입되어 있음을 Southern 분석을 통하여 확인함으로써 형질전환된 식물체로 확정하였다.

고 찰

Southern 분석결과 더덕 식물체의 게놈 DNA에 GUS 유전자가 삽입되어 있고 들어간 유전자는 single copy임을 알 수 있었다. 또한 GUS 유전자의 삽입된 위치는 적어도 두 개체에서 다르게 나타났다 (Figure 2). 본 연구에서의 형질 전환율 15%는 완두콩 (Davies et al., 1993), 렌즈콩 (Warkentin and McHughen, 1992), 멜론 (Dong et al., 1991), 수박 (Choi et al., 1994) 및 카네이션 (Lu et al., 1991) 등에서 기관분화 시스템을 이용하여 GUS 유전자를 식물세포에 도입시킨 경우의 형질전환율 6-16%의 범주에 속하였다.

부정아의 기원에 따라 삽입되는 유전자의 copy수가 어느 정도 달라진다는 보고가 있는데 기원이 단세포일 경우 single copy, 다세포일 경우 multicopy일 가능성이 높다고 하였고 (Polito et al., 1989), 특히 다세포 기원이 되는 기관분화는 multicopy일 가능성이 높다는 연구결과 (Yang, 1993)에 비추어 볼 때 본 연구에서 재분화된 개체들은 대부분 단세포 유래로 판단된다. 또한 다세포 기원이 되는 기관분화나 particle bombardment 방법에 의해 얻어지는 형질전환 식물체에서 일반적으로 나타나는 chimeric과 같은 특징은 본 연구에서 얻어진 형질전환된 식물체에서는 관찰되지 않았다. 따라서 본 연구결과는 재래식 육종방법으로는 품종 개량을 피하기 어려운 더덕에 항곰팡이성, 제초제 내성, 내충성 및 기타 여러 가지 병원균에 대한 저항성을 가진 유용 유전자를 도입한 새로운 품종의 개발을 기대할 수 있게 되었다.

한편 예비실험에서 여러 종류의 cytokinin을 단독으로 첨가한 배지에서 더덕 자엽절편의 부정아 형성빈도는 BA를 첨가하였을 때가 kinetin과 zeatin에 비하여 높았다. 이러한 현상은 이미 많은 연구에서 보고된 것처럼 부정아 형성은 다른 cytokinin 보다 BA가 효과적이라는 사실 (Ashis et al., 1990)과 본 연구결과와 일치된다. 또한 기관분화에 의한 더덕의 재분화는 본 연구에서 처음으로 이루어졌다.

적 요

CaMV35S promoter- β -glucuronidase (GUS) 유전자와 선발 표지로서 neomycin phosphotransferase 유전자를 가진 pBI121 binary 벡터를 도입한 *Agrobacterium tumefaciens* LAB4404와 더덕 유식물체의 자엽 절편을 1 mg/L BA가 첨가된 MS 배지에서 48시간 동안 공동배양한 후 1 mg/L BA, 250 mg/L carbenicillin, 100 mg/L kanamycin sulfate을 첨가한 고체배지에 옮겨 명조실에서 배양하였다. 배양 2주 후 절편의 절단면 부근으로부터 수많은 부정아가 형성되기 시작하였다. 이들 부정아의 GUS 활성을 조사한 결과 15%가 양성반응을 나타내었다. 배양 6주 후 절편이 형성한 수많은 부정아로부터 56.7% 빈도로 shoot이 발달하였다. 이들 shoot은 기본배지에 옮겨서 4주 경과되었을 때 대부분 발근하였으며, 재분화된 개체는 토양에 이식하였다. Southern 분석결과 GUS

양성을 보인 재분화 개체의 게놈 DNA에 GUS 유전자가 삽입되었음이 확인되었다.

사 사 이 논문은 과학기술처 특정과제 (G70880)의 연구결과이다. 원고에 대하여 세심한 수정과 논평을 해준 백경희, 박상수, 이문순, 이형순 박사와 원고작성을 도와준 김창숙씨에게 감사한다.

인 용 문 헌

An G (1987) Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis. *Methods Enzymol* **153**: 292-305

Ashis TR, Deepesh ND (1990) Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of *Calotropis gigantea* (Linn.) R. Br. *Plant Cell Tissue Organ Cultre* **20**: 229-233

Broglie K, Chet K, Hallyday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais CJ, Broglie R (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* **254**: 1194-1197

Choi PS, Soh WY, Kim YS, Yoo OJ, Liu JR (1994) Genetic transformation and plant regeneration of watermelon using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* **13**: 344-348

Davies DR, Hamilton J, Mullineaux P (1993) Transformation of peas. *Plant Cell Rep* **12**: 180-183

Dong JZ, Yang MZ, Jia SR, Chua NH (1991) Transformation of melon

(*Cucumis melo* L.) and expression from cauliflower-mosaic virus 35S promoter in transgenic melon plants. *Bio/Technology* **9**: 858-863

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**: 3901-3907

Lu CY, Nugent G, Wardley-Richardson T, Chandler SF (1991) *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Bio/Technology* **9**: 864-868

Min SR, Yang SG, Liu JR, Choi PS, Soh WY (1992) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of *Codonopsis lanceolata*. *Plant Cell Rep* **10**: 621-623

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 478-497

Polito VS, McGranahan G, Pinney K, Leslie (1989) Origin of somatic embryos from repetitively embryogenic cultures of walnut (*Juglans regia* L.): implications for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep* **8**: 219-221

Warkentin TD, McHughen A (1992) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated beta- β -glucuronidase (GUS) gene expression in lentil (*Lens culinaris* Medik.) tissues. *Plant Cell Rep* **11**: 274-278

Yang NS (1993) Transgenic plants from Legumes. In SD Kung, R Wu, eds, *Transgenic Plants*, Vol 2. Academic Press, New York, pp 79-102

(1994년 10월 14일 접수)