

## Adenosine Deaminase 형질전환식물체와 정상식물체간의 인공씨감자 형성비교

최경화<sup>1)</sup>, 양덕춘<sup>2)</sup>, 전재홍<sup>1)</sup>, 김현순<sup>1)</sup>, 정영희<sup>1)</sup>, 정 혁<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>생명공학연구소 식물조직배양 R.U., <sup>2)</sup>한국인삼연초연구원 유전생리부

### A Comparison of Microtuberization Efficiency between Normal and Adenosine Deaminase Transgenic Potato Plantlets Cultured *In Vitro*

Kyung Hwa Choi<sup>1)</sup>, Deok Chun Yang<sup>2)</sup>, Jae Heung Jeon<sup>1)</sup>, Hyun Soon Kim<sup>1)</sup>, Young Hee Joung<sup>1)</sup>, and Hyouk Joung<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Plant Tissue Culture Research Unit, KRIBB, Taejon, 305-600, Korea

<sup>2)</sup>Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345, Korea

#### ABSTRACT

A study was conducted to investigate comparison of *in vitro* tuberization between normal and transgenic potato plantlets harboring adenosine deaminase gene in potato cultivar of Desiree. In time course study of *in vitro* tuberization, the rate of tuberization in four lines were increased till 6 weeks, but maintained still after 7 weeks. Microtuber initiation of transgenic lines, 43 and 39 were faster than other lines, but no difference was observed after 5 weeks compared with normal plantlets. In all transgenic lines, the majority of microtubers produced were small(less than 100 mg) and medium(100-200 mg) size rather than large size(more than 200 mg). Among 4 lines, line 9 produced the highest number of microtubers per each culture vessel. The results of this experiment suggest that there is no significant differences in microtuber production efficiency between normal and transgenic potatoes.

**Key words:** transgenic lines, microtubers

#### 緒 言

감자는 세계 4 대 주식작물의 하나일 뿐만 아니라 우리 나라에서도 점점 소비가 증가하고 있는 중요한 식량작물이다. 감자를 성공적으로 재배하기 위해서는 여러 가지 해결해야할 문제점들이 있지만 종서 확보와 신품종육성 문제가 그중 중요하다고 할 수 있다. 이제껏 재배농민이 사용할 수 있을 충분한 양의 씨감자를 확보하는데는 최소 10년 이상이나 걸리는 문제점이 있었다. 그러나 Joung(1989)이 개발한 무균 조직배양기술방법을 사용하여 무병, 우량의 인공씨감자를 상업적으로 대량생산할 수 있게 되어서 종서 공급에 일조하고 있다. 또 다른 문제점은 다양

한 품질의 감자 개발만이 국제경쟁에서 살아남을 수 있는 시대가 되었지만 감자는 4배체의 매우 복잡한 유전적 구조를 가지고 있기 때문에(Tiainer, 1992) 교배육종방법으로 신품종을 육성해내는 데 많은 시간이 소요되었다. 그러나 최근 농업생명공학 기술을 이용하여 세포, 조직배양기술과 유전자 조작기술을 통한 다양한 유전적 형질이 전환된 신품종 농작물들이 속속 개발되고 있다. 이 과정에서 유전자를 형질전환시킬 때 형질전환된 식물체만을 선발해낼 수 있는 마커유전자가 꼭 필요하다. 식물유전공학에서 이제껏 주로 이용되는 마커 유전자들로는 항생제 내성유전자(Tavazza 등, 1988), 제초제저항성유전자(Rathore 등, 1993), 또는 눈으로 바로 확인할 수 있는 표지유전자(Filho 등, 1994) 등으로 크게 구분 지을 수 있다.

이들 중에서 가장 널리 쓰이는 항생제 내성 유전자는 환경에 미치는 안정성에 대한 의문이 대두되고 있는 실정이어서(Flavell 등, 1992; Bryant와 Leather, 1992) 보다 안전한 마커 개발에 대한 관심이 고조되고 있다. 본 연구팀도 미생물유래 항생제 내성 유전자 마커가 아닌 원래 동물의 면역체계에 관여하는 유전자인 Adenosine deaminase(E.C.3.5.4.4, ADA) 유전자를 감자의 형질전환체 선발마커로 이용하기 위하여 감자에 도입시켰다(최 등, 1996). 그 결과 감자에서도 쉽고, 빠르며 값이 저렴하게 형질전환체만을 선발할 수 있게 되었다. 그러나 형질전환된 식물체의 경우 도입 유전자가 계속적으로 발현되지 않거나 그 다음세대로 내려가면서 유전자 발현정도가 낮아지는 경우가 발생하기도 한다(Jones 등, 1996). 감자는 영양번식의 형태를 취하고 있기 때문에 생식 번식하는 기타 종자번식작물에 비하여 외부로부터 도입된 유전자의 안정성이 높을 것으로 생각되지만 그 안정성이 어느 정도인지와 또한 이들 형질전환체가 인공씨감자 대량생산체계에 의하여 인공씨감자를 생산할 수 있는지는 신중히 검증되어야 할 필요가 있다. 따라서 본 연구는 ADA 유전자가 삽입되어 발현된 형질전환식물체의 인공씨감자 형성능력이 정상적인 감자식물체와 같은지 알아보기 위하여 배양기간별 인공씨감자 형성능을 정상식물체와 비교하고 형성된 괴경의 크기와 무게 등을 비교, 분석하였다.

## 材料 및 方法

실험재료로 사용한 감자(*Solanum tuberosum* L.)는 ADA 유전자가 도입되고 발현이 확인된 데지레(cv. Desiree) 품종의 4개 라인으로서, 증식용 기내배양을

위해 MS 기본배지에 감자줄기를 치상하여 기내줄기를 유기 하였으며, 형질전환체와 대조구인 정상식물체 모두 Joung(1989)의 방법에 의하여 매 2주마다 계대배양하고 광도 4000 lux, 16시간 광주기 및 23℃ 조건으로 배양한 다음 2주일 정도 자란 기내줄기를 사용하여 인공씨감자 형성을 유도하였다. 씨감자 형성을 위한 배지는 MS(Murashige와 Skoog, 1962) 기본배지에 sucrose 90 g/L를 첨가하였고 광도 1000 lux, 8시간 광주기와 17℃의 배양조건으로 조절하였다.

인공씨감자 형성은 증식용 배양조건에서 자란 기내줄기를 한마디씩 절단하는 방법을 이용하였는데(Kada와 Okazawa, 1988) 마디의 생육에 따른 오차를 줄이기 위하여 정단으로부터 5마디 이하의 줄기 마디만을 집중하였다. 인공씨감자 형성용 배지에 배양 접시당 20개씩 4반복으로 치상하고 배양 1주일 후부터 8주까지 매주 인공씨감자 형성 수를 조사하였다. 이때 인공씨감자의 형성에 대한 판별기준은 줄기 두께보다 2 배가량 원형으로 부풀어 오른 것만 인공씨감자가 형성된 것으로 판정하였다. 대조구와 형질전환체 모두 배양 8주후에 인공씨감자를 수확하여 괴경 형성 수와 신선 중을 조사하였고 수확된 인공씨감자는 대(200mg 이상), 중(100-200mg), 소(100mg 이하) 크기별로 나누어서 분포를 비교하였다.

## 結果 및 考察

외부로부터 ADA 유전자가 감자식물체의 genome에 삽입되었을지라도 인공씨감자 형성 특성이 변하지 않고 그대로 유지되는지 알아보기 위하여 형질전환체와 대조구의 배양기간별 인공씨감자 형성을 조사하였다(Table 1). 4개 라인의 형질전환체와 대조구

Table 1. Comparison of *in vitro* tuberization between transgenic potato lines and normal potato of Desiree cultivar

Explant <sup>a</sup>	Tuberization <sup>b</sup> (%)							
	week							
	1	2	3	4	5	6	7	8
9	10.0 ± 10.0	10.0 ± 0.0	30.0 ± 5.0	32.5 ± 2.5	50.0 ± 5.0	70.0 ± 0.0	95.0 ± 5.0	95.0 ± 5.0
13	5.0 ± 2.9	6.7 ± 1.7	11.7 ± 3.3	20 ± 2.9	48.3 ± 1.7	76.7 ± 3.3	90.0 ± 0.0	91.7 ± 1.7
39	10.0 ± 5.8	40 ± 14.4	45 ± 16.1	50 ± 16.1	55 ± 13.2	66.7 ± 10.1	93.3 ± 1.7	93.3 ± 1.7
43	15.0 ± 0.0	30.0 ± 0.0	42.5 ± 2.5	47.5 ± 2.5	50.0 ± 5.0	60.0 ± 10.0	90.0 ± 0.0	92.5 ± 2.5
control	2.5 ± 2.5	7.5 ± 7.7	12.5 ± 6.0	37.5 ± 1.4	66.3 ± 2.4	88.8 ± 5.1	93.8 ± 2.4	93.8 ± 2.4

a Explants were number of transgenic potato lines and control potato.

b Tubers were harvested at 8 weeks after explanting.

c Mean values ± standard error.

인 정상식물체 모두 배양기간이 지날수록 인공씨감자 형성율이 높아졌으며 배양 6주까지는 인공씨감자 형성이 활발히 진행되었으나 배양 7주후부터는 인공씨감자 형성율이 더이상 높아지지 않았다. 39번과 43번 형질전환체의 경우 배양 4주까지는 형질전환체의 인공씨감자 형성율이 대조구에 비하여 월등히 높았으나 배양 5주후부터는 오히려 대조구의 인공씨감자 형성율이 약간 더 높았고 7주후에는 형질전환체와 대조구와의 차이점은 특별히 나타나지 않았다. 9번과 13번 형질전환체는 39번과 43번에 비하여 초기 인공씨감자형성율이 낮았으나 시간이 지날수록 인공씨감자 형성율도 점점 증가하다가 배양 7주후에는 형질전환체와 대조구 모두 비슷한 형성율을 나타냈다. 특히 43번 형질전환체는 배양초기인 1-2주에 인공씨감자가 다른 라인의 형질전환체에 비하여 빠르게 형성되었다. 배양기간동안 낮의 고온과 밤의 저온 조건에서 초기괴경유도가 활성화된다는 보고와(김 등, 1992) 감자 시료의 마디 위치에 따른 소괴경 형성시 오래된 기저부분에서 소괴경 개시가 빨리 나타난다는 결과(전 등, 1991)에 근거해볼 때 43번과 39번 형질전환체의 괴경형성이 초기에 빠르게 형성된 것은 유전자 삽입에 의한 형질전환체의 특징이 나타나는 것이라기보다 감자줄기의 생리적 조건과 배양 조건 때문인 것으로 사료된다. 더욱이 이들 두 형질전환체에서 배양초기의 높은 인공씨감자 형성율이 전배양기간동안 계속 높아지지 않고 배양후기에는 대조구와 비슷한 경향을 나타내는 것으로 보아 이러한 추측이 가능하였다.

배양 8주후에 형성된 인공씨감자를 모두 수확하여 대, 중, 소 크기별로 분류한 조사 결과(Table 2) 형질전환체와 정상식물체 모두 100mg - 200mg인 중간 크

기의 인공씨감자와 100mg 이하인 작은 크기의 인공씨감자 형성비율이 200mg이상의 큰 인공씨감자 형성비율보다 높았다. 이들중 13번 형질전환체는 다른 형질전환체보다 중간크기의 인공씨감자 형성율이 약간 더 높은 것을 제외하고는 차이점이 없었다. 인공씨감자 형성과정중에 단일과 저온처리를 한 후 형성된 인공씨감자의 개수분포와 크기를 조사했을 때 수미품종에서는 큰 크기의 인공씨감자가 가장 많이 형성된 반면 세포디 품종에서는 중간 크기의 인공씨감자가 가장 많이 형성된 것은 품종간의 대사효율 차이 때문이라는(김 등, 1992) 보고를 볼 때 대지레 품종은 수미품종에 비하여 대사물질 이동효율이 낮아서 인공씨감자의 크기가 작은 것으로 생각된다. 그러나 변온 하에서 배양했을 때 전물량이 증가한다는 Bennett 등(1991)의 보고를 볼 때 낮과 밤의 배양온도를 23℃에서 17℃로 변온 시키는 배양조건을 맞춰주고 또한 인공씨감자 형성과정이 배양시 온도나 광도와 같은 환경적 요인 뿐만 아니라 gibberellin과 cytokinin-like substance와 같은 내생 성장조절물질에 의해서도 크게 영향을 받는 것을(Chapman, 1958; Ewing, 1978;

Table 2. Distribution of size of harvested microtuber of transgenic potato lines and normal potato

Explant <sup>a</sup>	Distribution of size <sup>b</sup> (%)		
	large	medium	small
9	13.1 ± 2.0	39.2 ± 5.9	45 ± 5.0
13	9.2 ± 1.9	58 ± 5.4	32.8 ± 3.6
39	14.3 ± 4.7	42.8 ± 4.9	42.9 ± 0.8
43	13.5 ± 2.4	45.8 ± 6.9	40.8 ± 9.2
control	9.2 ± 3.2	46.7 ± 6.9	44.1 ± 7.0

a Explants were number of transgenic potato lines and control potato.

b large : >200 mg medium : 100 - 200mg small : <100 mg

c Mean values ± standard error.

Table 3. Comparison of fresh weight and number of microtuber between transgenic potato lines and normal potato

Explant <sup>a</sup>	No. of tuber <sup>b</sup> /1 petri dish	Total M.T fr wt (g)/1 petri dish	Mean fr wt (mg)/each M.T
9	19.0 ± 1.0	2.1 ± 0.1	110.0 ± 0.6
13	18.3 ± 0.3	2.3 ± 0.1	123.3 ± 2.5
39	18.7 ± 0.3	2.2 ± 0.2	119.7 ± 9.4
43	18.5 ± 0.5	2.2 ± 0.3	118.5 ± 13.3
control	18.8 ± 0.5 <sup>c</sup>	2.2 ± 0.2	116.3 ± 9.1

a Explants were number of transgenic potato lines and control potato.

b Tubers were harvested at 8 weeks after explanting.

c Mean values ± standard error.

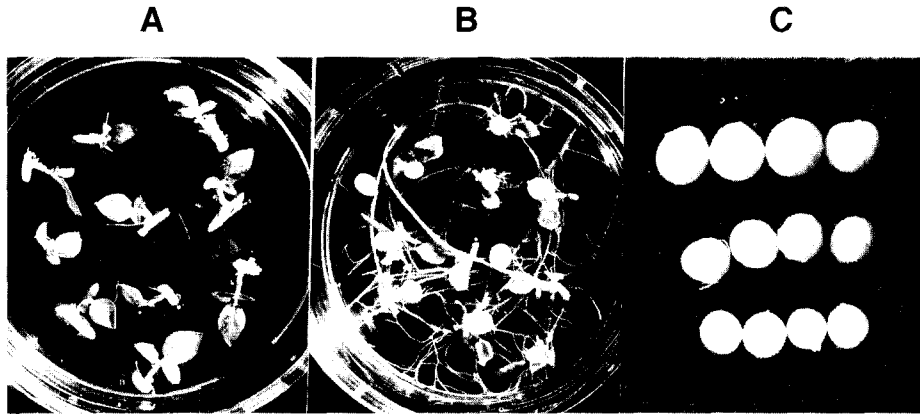


Fig. 1. *In vitro* tuberization of transgenic potato cv. Desiree. A) One node stem segments culture *in vitro*. The stem cutting were cultured for 8 weeks in 9 % sucrose medium. B) Tuber formed at the axillary bud. C) Harvested tubers. There was no phenotypic changes in tuberization between normal and transgenic potatoes.

Davis 등, 1986) 고려하여 형질전환체의 과정을 유기 시킨다면 200mg 이상인 큰 인공씨감자의 형성비율을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

배양용기당 인공씨감자의 형성갯수와 신선 중을 조사해본 결과(Table 3) 형질전환체와 대조구인 정상 식물체 사이의 차이점은 나타나지 않았다. 9번 라인이 배양용기당 인공씨감자 형성갯수가 약간 많았지만 인공씨감자 개당 신선중은 오히려 가장 적어서 작은 크기의 인공씨감자 비율이 높음을 알 수 있었다. 나머지 세 라인의 형질전환체는 비슷한 경향을 나타냈고 수확된 인공씨감자 무게와 인공씨감자 크기에 대한 결과를 함께 고려할 때 중간크기의 인공씨감자의 비율이 높았던 13번 라인의 신선중 또한 높았으며 개당 인공씨감자 무게도 가장 무거웠다. 단일마디 배양법에 의한 인공씨감자형성과 수확된 인공씨감자의 형태적 특성은 형질전환체와 대조구 모두 똑같은 모양으로 차이점을 발견할 수 없었다(그림 1). 이상의 실험 결과를 보면 감자의 기내과경 형성양상이 형질전환체와 정상식물체간에는 별다른 차이가 나타나지 않음을 알 수 있었다. 이로서 외부유전자가 도입된 감자 형질전환체도 기존의 인공씨감자 대량생산체계를 적용하여 다량의 형질전환 인공씨감자를 생산할 수 있음이 밝혀졌다.

## 摘 要

ADA 형질전환식물체와 정상식물체의 기내 인공씨감자 형성능을 비교하였다. 배양기간별 인공씨감자 형성능을 보면 4 라인 모두 6주까지는 과경형성율이 증가하였으나 7주 이후에는 인공씨감자 형성율이 거의 변함이 없었다. 43번과 39번 라인 형질전환체는 다른 라인과 대조구에 비하여 배양초기의 인공씨감자 형성율이 높았으나 배양 5주 이후에는 인공씨감자 형성율의 증가가 둔화되는 양상을 나타내었다. 대조구와 형질전환체 모두 인공씨감자 1개당 무게가 100 mg 이하인 작은 크기와 100mg - 200mg인 중간 크기의 인공씨감자 비율이 200mg 이상인 큰 인공씨감자보다 많이 형성되었다. 4개의 형질전환체 라인들 중에서 9번 라인의 형질전환체가 배양용기당 형성된 인공씨감자 수가 가장 많았다. 이상의 결과를 놓고 볼 때 인공씨감자를 형성하는 능력에 있어서 ADA유전자가 도입된 형질전환체는 정상식물체와 비교해서 별다른 차이가 없음을 알 수 있었다.

## 引 用 文 獻

- Bennett S.M., Tibbitts T.W., Cao W. 1991. Diurnal temperature fluctuation effects on potatoes grown with 12hr photoperiods. *Am. Potato Journal* 68: 81-86.
- Bryant J., Leather S. 1992. Removal of selectable

- marker genes from transgenic plants: needless sophistication or social necessity?. Trends Biotechnol. 10: 274-275.
- Chapman, H.W. 1958. Tuberization in the potato plant. *Physiologia Plantarum* 11: 215-224.
- 최경화, 전재홍, 김현순, 정영희, 양덕춘, 정혁. 1996. Mouse Adenosine Deaminase 유전자 발현을 통한 감자 형질전환체의 효율적인 선발방법. 식물조직배양학회지 23:97-101.
- Davis, J.M., Loescher W.H., Hammond M.W., Thornton R.E. 1986. Response of potatoes to nitrogen form and to change in nitrogen form at tuber initiation. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111: 70-72.
- Ewing, E.E. 1978. Shoot, stolon, and tuber formation on potato (*Solanum tuberosum* L.) cuttings in response to photoperiod. *Plant Physiol.* 61: 348-353.
- Filho, E.S.F., Figueiredo L.F.A., Monte-Neshich D.C. 1994. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) cv. Mantigueira using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Reports* 13: 666-670.
- Flavell, R.B., Dart E., Fuch R. L. S, Fraley R.T. 1992. Selectable marker genes: safe for plant?. *Bio/Technology.* 10: 141-144.
- 전재홍, 정혁, 박세원, 김현순, 변시명. 1991. 감자줄기의 생리적 상태가 기내 소과 경형성에 미치는 영향. 식물조직배양학회지 18: 233-238.
- Jones, J.D., Goldsbrough P.B., Weller S.C. 1996. Stability and expression of amplified EPSPS genes in glyphosate resistant tobacco cells and plantlets. *Plant Cell Reports* 15: 431-436.
- Joung H. 1989. Mass production of potato microtuber by tissue culture technique and its application. '89 Agricultural biotechnology symposium pp. 100-124.
- 김현순, 전재홍, 박세원, 정혁. 1992. 밤.낮의 변온처리가 감자의 기내소과경형성에 미치는 영향. 한국원예학회지 33: 432-437.
- Koda Y., Okazawa Y. 1988. Detection of potato tuber-inducing activity in potato leaves and old tubers. *Plant Cell Physiol.* 29: 969-974.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Rathore K.S., Chowdhury V.K., Hodges T.K. 1993. Use of bar as a selectable marker gene and for the production of herbicide-resistant rice plants from protoplasts. *Plant Mol. Biol.* 21:871-884.
- Tavazza R., Tavazza M., Ordas R. J., Ancora G., Benvenuto E. 1988. Genetic transformation of potato(*Solanum tuberosum*):An efficient method to obtain transgenic plants. *Plant Science* 59:175-181.
- Tiainer, T. 1992. The role of ethylene and reducing agents on anther culture response of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Cell Report* 10: 604-607.