

꽃양배추로의 프로타제 저해제 II와 β -Glucuronidase 융합 유전자의 도입 및 발현

김창길* · 정재동¹ · 안진홍² · 김경민³

경북농촌진흥원, ¹경북대학교 농과대학 원예학과, ²포항공대 생명과학과, ³경북대학교 농업과학기술연구소

Transfer and Expression of a Tomato Inhibitor II and β -Glucuronidase Fusion Gene in Flowering Cabbage, *Brassica oleracea* var. *acephala* DC.

KIM, Chang Kil* · JHUNG, Jae Dong¹ · AN, Gyn Heung² · KIM, Kyung Min³

Kyungbuk Provincial RDA, Taegu, 302-301, Korea: ¹Department of Horticulture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea: ²Department of Life Science, Pohang University of Science and Technology, Pohang, 790-784, Korea: and ³Institute of Agricultural Science & Technology Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea. *Corresponding author

The highest transformation frequency was observed when cotyledonary and hypocotyl explants of flowering cabbage (*Brassica oleracea* var. *acephala* DC) 'Eunbae' were cultured on shoot induction medium without kanamycin for 1 day, then cocultured with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404::pGA1036 harboring tomato inhibitor II promoter and β -glucuronidase (GUS) fusion gene for 3 days. These explants were transferred to MS medium containing 20 mg/L kanamycin, 500 mg/L carbenicillin, and 1 mg/L BA. The explants were subsequently subcultured every 2 weeks. Incorporation of the GUS gene into flowering cabbage was confirmed by PCR analysis of DNA. Southern blot analysis showed that ECL-labeled GUS gene was hybridized to the expected amplified genomic DNA fragment of about 366 bp from transgenic flowering cabbage. Histochemical analysis based on the enzymatic activity of the GUS protein indicated that PI- I promoter activity was systematically associated with vascular tissue in wounded as well as in non-wounded leaves, petioles and stems, but not in roots. Partial wounding with razor blade showed not systemic induction but partial induction.

Key words; *Agrobacterium tumefaciens*, GUS

식물체는 병원균의 공격부위에서만 만들어지는 phytoalexin類 관련유전자와 단백질분해효소 억제물질을 생성하는 유전자와 같이 공격부위는 물론 공격부위에서 먼 부위에서까지 발현되는 것들이 있다. 이러한 誘導發現을 組織特異的 發現(systemic induction)이라고 하며 proteinaceous protease inhibitor와 관련된 유전자들이 조직 특이적 發現遺傳子의 活性을 이해하기 위해 가장 많이 연구되고 있다 (Plunkett et al., 1982; Walker-Simmons and Ryan, 1984). 단백질분해효소 억제물질이 병원균들에 대한 식물체의 방어 기작과 관련되어 있다고 생각되는 이유는 대부분의 식물 단백질분해효소 억제물질은 미생물과 동물의 protease에만 활성을 나타내고 식물의 proteinase에는 거의 활성을 나타내지 않으며 (Weiss and Bevan, 1991), 식물에서 분리한 단백질 분해효소 억제물질을 여러 곤충의 먹이에 넣어주면 이들의

성장발달이 저해된다는 보고(Johnson et al., 1989)가 있었기 때문이다. 이러한 抑制物質은 곤충 이외에도 선충이나 동물에도 毒性을 띄며 다량 섭취하면 사람의 소화능력에도 障礙를 주나 꿀이는 동안에 파괴되므로 실질적으로 우리의 식생활에는 큰 해가 없을 것으로 보고 있다(Goldburg and Tjaden, 1990).

가지과 및 콩과 식물의 잎들은 해충의 공격이나 다른 기계적 傷處에 의해서 심하게 피해를 입었을 때 serine proteinase인 trypsin과 chymotrypsin의 억제물질을 잎의 액포에 蓄積하게 된다(Ryan, 1973). 이 억제물질에는 두 종류가 있는데 그 중 하나인 proteinase inhibitor I (PI-I)의 경우에는 monomer로 분자량이 8,100고 chymotrypsin에 대하여서는 강한 저해를 나타내나 trypsin에 대한 저해는 약하다. Proteinase inhibitor II (PI-II)는 분자량 12,300의 monomer이

고 trypsin과 chymotrypsin에 다같이 강한 저해를 나타내는 것으로 알려져 있다(Plunkett et al., 1982). 감자의 경우 잎에 상처를 입지 않았을 때는 잎, 줄기, 뿌리에서 PI- II 유전자가 전혀 발현되지 않지만(Green and Ryan, 1972), 괴경에서는 전체 수용단백질의 2~5%까지 차지한다(Bryant et al., 1976). 즉 감자는 해충에 대항하기 위해 괴경에 늘 다량으로 준비된 단백질분해효소 억제물질을 가지고 있으면서 地上部의 일부가 害蟲의 攻撃을 받게되면 지상부 전체에서 단백질분해효소 억제물질이 組織特異적으로 발현되는 것으로 알려져 있다(Ryan, 1973).

본 실험은 토마토에서 분리된 PI-II promoter에 β -glucuronidase (GUS)를 융합시킨 Ti-plasmid binary vector를 *Agrobacterium tumefaciens*를 매개로 하여 種 분화가 다양한 Brassica 屬인 꽃양배추(*Brassica oleracea* var. *acephala* DC)에 도입시켜 형질전환체를 얻고 이 형질전환된 식물체를 대상으로 PI 유전자의 조직특이적인 발현정도를 조사하는 한편, 형질전환시 식물체 재분화 및 형질전환 효율향상에 미치는 몇가지 요인과 유전분석에 관하여 실험한 결과를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

植物材料

꽃양배추(*Brassica oleracea* var. *acephala* DC.) '은배'와 '홍린'의 종자를 1% NaOCl(active chlorine, 10~12%) 용액에 30분간 살균하고 멸균수로 수세한 후 sucrose 3%와 한천 0.8%를 함유한 MS배지(Murashige and Skoog, 1962)에 파종하여 25 ± 2°C, 1일 16시간 명배양하였다. 무균배양 4~8일 후 子葉은 葉柄이 2 mm정도 부착된 상태로 절단하고 하배축은 1 cm 길이로 잘라 각각 사용하였다.

균주

사용한 균주는 binary vector 시스템으로 클로닝된 pGA 1036과 helper plasmid로 pAL4404를 가진 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404로써 포항공대 안진홍 박사로부터 분양을 받았다. pGA 1036의 구조는 *E. coli*의 β -glucuronidase (GUS) 유전자(Jefferson et al., 1986)가 감자에서 분리한 892 base pair의 proteinase inhibitor I promoter와 nopaline synthase의 terminator(T_{nos})사이 에 삽입되어 있고 (Figure 1), 形質轉換植物體를 選拔할 수 있는 표지유전자로 neomycin phosphotransferase gene II (NPT-II)를 Ti-plasmid의 T-DNA border sequence사이 에 가지는 구조이다. pGA 1036이 있는 *A. tumefaciens*를 kanamycin 15 μ g/ml와 tetracyclin 5 μ g/ml이 첨가된 YEP(1% peptone, 1% yeast

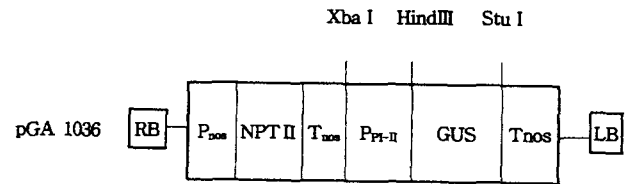


Figure 1. Structure of the binary vector pGA 1036. Abbreviations used are : P_{nos}: nopaline synthase promoter, NPT II: neomycin phosphotransferase type II, T_{nos}: polyadenylation signal of the nopaline synthase gene, P_{PI-II}: PI-II promoter, GUS: coding region of the β -glucuronidase gene of *E. coli*, RB: T-DNA right border, LB: T-DNA left border.

extract, 0.5% NaCl) 液體培地에서 28°C, 暗상태로 48시간 동안 분당 160 rpm으로 진탕배양한 다음 spectrophotometer 600 nm에서 optmal density가 0.5일때 식물조직과 공동배양 (cocultivation)하였다.

식물체 재분화 및 형질전환

植物體 再分化에 영향을 미치는 몇가지 요인을 究明하기 위하여 기본배지로는 MS와 B5(Gamborg and Ojima, 1968)를 사용하였다. 식물 성장조절제의 조성이 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 NAA(0, 0.1 mg/L)에 BA (0, 0.5, 1, 2, 3 mg/L) 또는 zeatin (0, 2, 4 mg/L)이 혼용 첨가된 9종의 배지에 자엽과 하배축을 배양하여 再分化率을 각각 調査하였다. 선발배지내 적정 kanamycin 농도를 알아보기 위하여 BA 1 mg/L가 첨가된 MS 배지에 kanamycin(0, 5, 10, 20, 30 mg/L)을 첨가하여 배양 4주후 자엽과 하배축의 생존율을 조사하였다. 형질전환은 자엽과 하배축을 1일간 전처리한 다음 *A. tumefaciens*와 1~3일간 공동배양후 자엽과 하배축으로부터 균을 제거하기 위하여 carbenicillin 500 mg/L가 첨가된 재분화배지에 옮긴 후 25°C, 16시간 일장하에서 배양하였으며 2주마다 새로운 배지로 옮겨 주었다. 선발배지에서 再分化된 shoot는 250 mg/L의 carbenicillin 과 10 mg/L의 kanamycin이 첨가된 MS 배지에 이식하여 뿌리를 유도하고 뿌리가 형성된 꽃양배추는 포트에 이식하여 온실에서 순화시킨 다음 遺傳分析에 사용하였다.

PCR 반응에 의한 遺傳分析

먼저 GUS 유전자가 대상식물체의 염색체내에 삽입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 PCR분석을 수행하였다. 식물체의 잎으로부터 DNA를 分離(Murray and Thompson, 1980)하여 template DNA로 이용하였고, PCR 反應溶液은 10 mM Tris- HCl(pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 15 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP (GIVBCO BRL), 100 ng primer, 50 ng template DNA 및 25 unit Tag DNA

polymerase(Promega)를 넣고 전체 반응용액은 50 μ L이 되게 하였으며, 반응하는 동안 水分蒸發을 막기 위하여 mineral oil을 한 방울씩 첨가하였다. HYBAID Thermal Cycler를 이용한 첫 DNA 변성은 95°C에서 5분간, 그후의 DNA 변성은 95°C에서 1분간, annealing은 58°C에서 2분간 그리고 DNA 합성은 72°C에서 2분으로 35 cycle을 실행 했으며, 최종 DNA 합성은 5분으로 하였다. 합성된 DNA는 1.2% agarose gel로 전기영동하고 EtBr에 염색하여 UV lamp에서 band를 확인하였다. GUS 분석을 위해 사용된 20-mer primer는 포항 공대 안진홍 박사팀으로부터 분양 받아 사용하였다.

Southern blot 分析

PCR方法으로 꽃양배추의 염색체 내에 삽입되어 있는 것으로 확인된 GUS 유전자 가 形質轉換시 사용된 *Agobacterium*내의 binary vector 시스템으로 cloning된 遺傳子 인지를 확인하기 위하여, PCR방법으로 도입된 GUS 유전자를 증폭한 후, plasmid DNA로부터 Xba I, StuI으로 double digestion한 1.8kb의 GUS 절편을 ECL-labelling & Detection Kit (Amersham)을 이용하여 labelling하여 probe로 사용하였다. PCR방법에 의해 증폭된 DNA를 1X TAE buffer를 사용하여 1.2% agarose gel에서 전기영동하고 0.5 μ g/ml ethidium bromide 용액에 염색한 후, 사진을 찍고 capillary transfer 방법(Southern, 1975)으로 nylon membrane에 전이 시켰다. DNA가 전이된 memberane을 prehybridization 용액(ECL golden buffer, 0.5M NaCl, 5% blocking reagent)에서 3시간동안 전처리한 후 ECL labelling kit로 표시된 탐침을 첨가하여 42°C에서 8시간 반응시켰다. Hybridization이 완료된 membrane은 42°C에서 washing buffer(0.4% SDS, 20X SSC, 3.6% urea)용액으로 20분간 2번 세척하였다. 그리고 상온에서 2XSSC용액으로 5분간 2번 세척하였다. 세척된 membrane은 상온에서 X-ray film에 노출시켰다.

Histochemical 分析

분석하고자 하는 잎을 떼내어 면도칼로 얇게 썬 후 고정액(0.3% formaldehyde, 10 mM MES pH 5.6, 0.3 M mannitol)에 담그고 약 1분 정도 감압하여 조직내의 기포를 모두 제거한 다음 상온에서 45분 동안 처리하였다. 50 mM NaPO₄(pH 7.0) 용액으로 여러 번 씻고, 1~2 ml의 histochemical reagent(2 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-GLUC) in 50 mM NaPO₄ pH 7.0)를 넣어 37°C 항온기에서 12~48시간 GUS 반응을 유도하였다. 染色을 확인한 후 메칠알콜로 여러번 씻어서 염록소를 제거한 다음 증류수로 세척하고 준비된 재료를 slide위에 놓고 재료의 변형을 방지하기 위하여 70% glycerol을 떨어뜨려 관찰하였다.

結果 및 考察

식물체 재분화 및 형질전환

기본배지 및 품종간 식물체 재분화율을 조사하고자 꽃양배추 “은배”와 “홍린”의 자엽과 하배축을 배양한 결과 (Figure 2) 식물체 재분화율은 MS배지가 B5배지보다 높게 나타났으며 품종간에는 “은배”가 “홍린”에 비하여 자엽과 하배축 모두 높은 재분화율을 나타내었다. *Brassica oleracea*의 조직배양에서 Pareek와 Chandra(1972)는 엽절편을 LS배지에, Hui와 Zee(1978)는 자엽과 하배축을 MS배지에, 그리고 Feng와 Cheng(1981)은 胚를 White와 B5 배지에 각각 배양하여 식물체 재분화를 유도하였다. 이와같이 동일한 種에서도 배양재료에 따라 사용된 배지가 다양한 편이지만 본 실험에서와 같이 MS배지를 사용한 예가 많아 *Brassica*屬 식물의 組織培養시 기관분화에는 B5 배지보다 무기염농도가 다소 높은 MS 배지가 적합할 것으로 생각된다. 또한 품종에 따른 再分化率도 상당한 차이를 나타내었는데 이러한 유전자형간 再分化 能力의 차이는 組織培養 초기부터 여러 작물에서 알려져 왔고, *Brassica*屬 식물에서도 *B. campestris* (Hachey et al., 1991), *B. napus* (Ono et al., 1994) 등에서 품종간 재분화 능력의 차이가 보고된 바 있다.

자엽과 하배축배양에서 생장조절제의 종류와 농도에 따른 식물체 재분화율을 조사한 결과(Table 1), 자엽과 하배축 모두 NAA에 BA 또는 zeatin이 혼용첨가된 배지에서보다 BA 또는 zeatin이 단독첨가된 배지에서 전반적으로 식물체 재분화율이 양호하였다. 뿐만아니라 zeatin보다는 BA가 이들 두 조직으로부터 식물체 재분화에 효과적이었고, 특히 BA 1.0 mg/L가 添加된 배지에서 자엽은 56.7%, 하배축은 68.9%로 가장 높은 재분화율을 나타내었다. 이는 *B. juncea*의 조직배양에서 BA가 zeatin, Zip 및 kinetin보다 효과적이

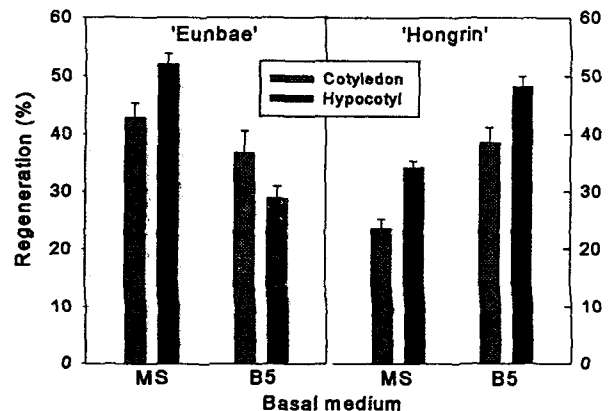


Figure 2. Effect of basal media on shoot regeneration from cotyledon and hypocotyl explants of *B. oleracea* var. *acephala* 'Eunbae'(left) and 'Hongrin'(right)

Table 1. Effect of plant growth regulators on shoot regeneration from cotyledon and hypocotyl explants of *B. oleracea* var. *acephala* 'Eunbae'.

Explants	Plant growth regulators(mg/L)			No. of cotyledons cultured	No. of shoots(%)	No. of roots(%)
	NAA	BA	zeatin			
Cotyledon	0	1.0	0	90	51(56.7)	0(0)
	0	2.0	0	90	46(51.1)	0(0)
	0.1	1.0	0	90	20(22.2)	16(17.8)
	0.1	2.0	0	90	32(35.6)	5(5.6)
	0.1	3.0	0	90	11(12.2)	1(1.1)
	0	0	2.0	90	36(40.0)	0(0)
	0	0	4.0	90	12(13.3)	0(0)
	0.1	0	4.0	90	0(0)	0(0)
Hypocotyl	0	0.5	0	45	15(33.3)	0(0)
	0	1.0	0	45	31(68.9)	0(0)
	0	2.0	0	45	11(24.4)	0(0)
	0.1	1.0	0	45	6(13.3)	9(2.0)
	0.1	2.0	0	45	0(0)	15(33.3)
	0.1	3.0	0	45	0(0)	7(16.0)
	0	0	2.0	45	0(0)	0(0)
	0	0	4.0	45	21(46.7)	0(0)
	0.1	0	4.0	45	13(28.9)	2(4.4)

Table 2. Effect of kanamycin concentrations on shoot regeneration from cotyledon and hypocotyl explants of *B. oleracea* var. *acephala*.

Kanamycin (mg/L)	No. of cotyledons		No. of hypocotyls	
	cultured	with shoots(%)	cultured	with shoots(%)
0	90	46(51.1)	45	33(73.3)
5	90	38(42.2)	45	30(66.7)
10	90	2(0.2)	54	5(0.1)
20	81	0(0)	54	0(0)
30	90	0(0)	54	0(0)

었다고 한 Sharma 등(1990)과 Chi 등(1989)의 연구결과 및 유채의 자엽배양에서 BA가 효과적이었다고 한 Ono 등(1994)의 연구결과와 비슷한 경향이였다. 또한 BA 1 mg/L 단용 처리구에서 가장 높은 식물체 재분화율을 나타내어 *Brassica*屬 식물의 조직배양에서 NAA와 BA를 혼용하는 것이 효과적이었다고 한 Hachey 등(1991)의 연구결과와는 차이가 있었으나 *B. oleracea*의 자엽과 하배측 배양시 식물체 재분화에는 auxin이 전혀 필요없거나(Clare and Collin, 1974) auxin의 활성이 비교적 낮은 IAA가 고농도로 첨가되는 것이 효과적이라고 한 보고(Bajaj and Nietsch, 1975)와는 비슷한 양상을 보였다. 그러나 이들이 밝힌 생장조절제의 종류와 농도와는 다소 차이가 있었는데 이는 材料植物의 유전자형과 組織部位가 서로 다른 데서 비롯된 결과라고 생각된다.

꽃양배추의 자엽과 하배측을 이용한 형질전환 실험에서 선발배지내의 kanamycin농도를 究明하기 위하여 실험한 결과(Table 2), 배지내 kanamycin의 농도가 20 mg/L이상 일때는 자엽과 하배측으로부터 재분화된 식물체를 얻을 수 없

Table 3. Effect of cocultivated periods on regeneration from cotyledon and hypocotyl explants of *B. oleracea* var. *acephala*.

Coculture period (days)	Explants	No. of explants cultured	Regeneration efficiency(%)	
			Green shoot	White shoot
0	Cotyledon	90	0(0)	0(0)
	Hypocotyl	45	0(0)	0(0)
1	Cotyledon	90	0(0)	0(0)
	Hypocotyl	45	0(0)	3(6.7)
2	Cotyledon	90	4(4.4)	9(10.0)
	Hypocotyl	45	16(35.6)	3(6.7)
3	Cotyledon	90	11(12.2)	6(5.6)
	Hypocotyl	45	7(15.6)	2(4.4)

었으므로 이후 *A. tumefaciens*와 공동배양후 선발배지에서 형질전환된 식물체를 획득하기 위한 적정 kanamycin농도는 20 mg/L로 조절하였다. NPT-II 유전자는 많은 植物 種의 형질전환에 選拔 maker로써 有用하게 활용되고 있으며 배지내에 첨가되는 kanamycin의 농도는 식물의 종류에 따라 매우 다양하게 보고되고 있다. *Brassica*屬 식물의 경우에는 배지내 첨가되는 kanamycin의 농도가 비교적 낮은편인데 유채(Moloney et al., 1989)에서 15 mg/L, *B. oleracea* (Dong and McHughen, 1991)에서 50 mg/L, *B. juncea* (Barfield and Pua, 1991)에서 20 mg/L의 kanamycin을 첨가하여 形質轉換體를 획득한 예가 있다. 반면 *Brassica*屬 식물로써는 다소 높은 농도이기는 하나 Srivastava 등(1988)은 *B. oleracea*의 葉切片으로부터 形質轉換體를 획득하기 위하여 kanamycin을 배지내에 100 mg/L 첨가하여 사용한 예도 있다. 뿐만 아니라 배지내에 첨가되는 kanamycin의 농도에 따라 같은식물의 동일한 조직에서도 형질전환 효율에 차이가 나타난다

는 연구 보고(Radke et al., 1988)도 있으므로 kanamycin을 選拔 maker로 이용할 경우에는 반드시 대상식물에 알맞은 농도 구멍이 선행되어야 할 것으로 생각된다.

공동배양기간이 자엽과 하배측으로부터 식물체 재분화에 미치는 影響을 조사한 결과(Table 3), 자엽과 하배측 모두 대조구에서는 재분화된 식물체를 얻을 수 없었다. 뿐만 아니라 자엽은 1~2일간, 하배측은 1일간 *Agrobacterium*과 공동배양된 조직에서는 재분화된 식물체가 모두 백화현상을 나타내어 녹색 식물체를 얻을 수가 없었다. 자엽은 3일, 하배측은 2일간 *Agrobacterium*과 공동배양한 처리에서 녹색 식물체 재분화율이 가장 높은 것으로 나타났다.

形質轉換 確認 및 유전자 發現

상기의 방법에 준하여 *Agrobacterium*과 공동배양후 재분화된 개체중에서 形質轉換이 된 것으로 추정되는 꽃양배추의 게놈상에 GUS 遺傳子가 정확히 삽입되었는지를 알아보기 위해서 PCR을 수행한 결과(Figure 3A) 형질전환된 꽃양배추에서 366 bp 절편을 확인할 수 있었다. Lane 1은 plasmid로부터 분리한 GUS 유전자를 증폭한 것이며, lane 3, 4, 5, 6, 7은 형질전환된 꽃양배추로부터 증폭된 GUS 유전자이다. 이들 모두 366 bp의 절편을 볼 수 있으나 形質轉換되지 않은 꽃양배추(lane 2)에서는 이 절편이 보이지 않아 GUS 유전자가 꽃양배추 게놈속으로 삽입되어 있음을 알 수 있었다. PCR로 증폭한 366 bp의 절편이 GUS 유전자 인지를 검정하기 위하여 plasmid에서 분리된 GUS 유전자를 probe로 사용하여 Southern blot을 수행한 결과, 형질전환된 꽃양배추(lane 3, 4, 5, 6, 7)와 plasmid로부터 분리한 GUS

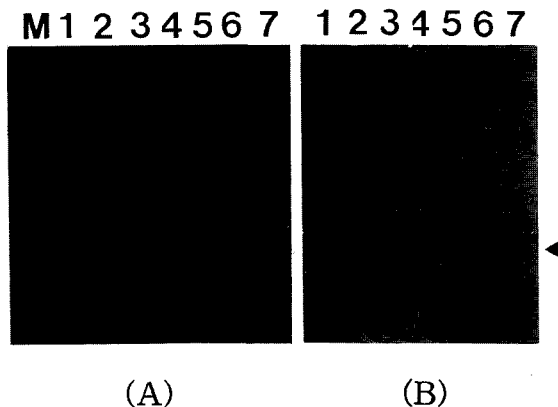


Figure 3. Agarose gel electrophoresis (A) and Southern blot analysis (B) of PCR amplification products. m : marker, lane 1: amplified product from plasmid pGA 1036, lane 2: amplified product from genomic DNA of nontransformed *B. oleracea* plant, lanes 3, 4, 5, 6 and 7 amplified products from genomic DNA of transgenic *B. oleracea* plants transformed with pGA 1036. The arrow indicates approximately 366 bp of amplified GUS product.

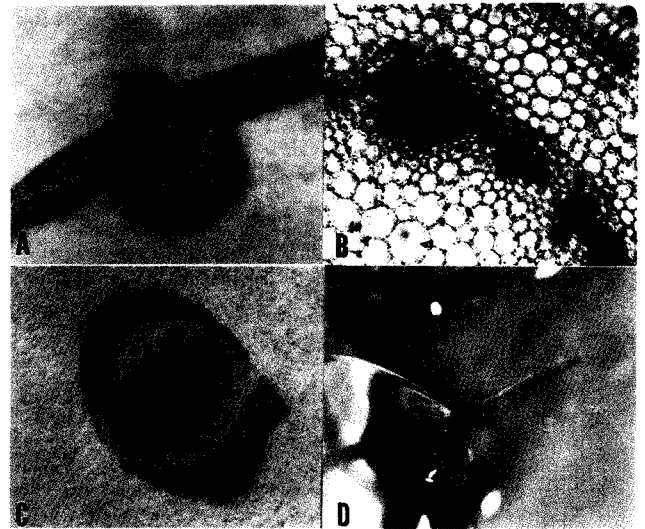


Figure 4. Histochemical localization of the PI-II promoter-GUS gene expression in transgenic *B. oleracea* var. *acephala* by wounding treatments. Explants were incubated in X-Gluc for 24hr. at 37°C. A: cross section of leaf, B: cross section of petiole, C: cross section of stem, D: root

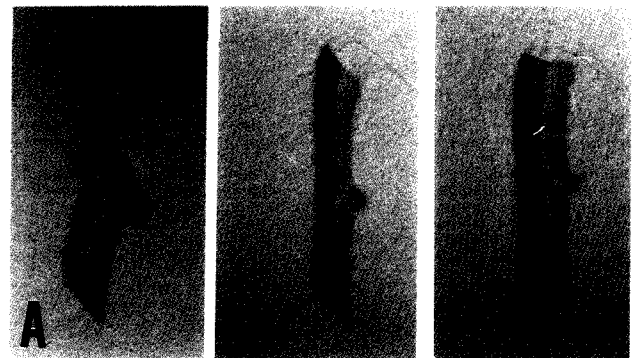


Figure 5. Histochemical localization of GUS gene expression in transgenic *B. oleracea* var. *acephala* containing the PI-II promoter-GUS gene upon partial sharp wounding (A), partial pricking(B), severe pricking (C). In order to enhance the contrast between the stained and unstained tissues in the cuttings, stereomicroscope was used (×7).

유전자를 증폭한 것(lane 1)에서 모두 band가 나타나 증폭된 DNA가 GUS 유전자임을 확인할 수 있었다(Figure 3B).

형질전환된 꽃양배추에서 PI promoter-GUS 융합 유전자를 이용한 PI-II 유전자의 組織特異的 發現 程度를 알아보기 위하여 국지적 상처에 의한 GUS 활성을 검색해 본 결과(Figure 4), 잎에서부터 시작하여 엽병과 줄기에서 관다발을 중심으로 GUS활성이 확인되었으나 뿌리에서는 전혀 GUS 활성이 나타나지 않았다. 이것은 상처부위에서 발생한 signal이 관다발을 따라 이동하면서 관다발 주위의 PI-II promoter를 活性化 시키기 때문인 것으로 추정(Keil et al.,

1989)하고 있으며 대부분의 다른 방어 關聯 遺傳子의 발현도 형질전환된 식물체의 유관속 組織을 중심으로 일어나고 있음이 밝혀져 있다(Keil et al., 1990).

상처정도와 부위에 따른 signal의 분포와 강도를 알아보기 위하여 GUS 활성정도를 조사해본 결과 잎의 중륵을 중심으로 한쪽면의 일정부분을 면도날로 잘라내었을 때는 상처 부위 쪽에서만 GUS 활성을 나타내었다(Figure 5A). 그러나 예리한 면도날 대신 핀셋 끝부분으로 눌러 주었을 때에는 잎전체에서 GUS 활성이 나타났으며(Figure 5B), 중륵을 중심으로 양쪽 잎의 양쪽부분을 핀셋 끝으로 심하게 눌러 상처를 주었을 때도 잎 전체에서 GUS 활성이 관찰되었다(Figure 5C). 이러한 결과는 Stanford 등(1990)이 감자와 담배에 win I-GUS 융합 遺傳子를 導入하여 機械的 傷處에 의한 GUS 활성 조사에서 식물체에 가해지는 상처의 정도에 따라 GUS 활성의 차이가 크다고 한 보고와 유사하였으며 이 결과로부터 상처에 의한 신호전달은 외부에서 가해지는 상처가 일정수준 이상일 때 가능하다는 것을 알 수 있었다

摘 要

꽃양배추 '은배' 종자를 무균 파종한 후 6일째된 하배축 조직을 BA 1 mg/L, sucrose 30 g/L, 환천 8 g/L가 첨가된 MS 재분화배지에 1일간 전처리한 다음, PI promoter-GUS 융합 유전자가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 와 2일간 동일조성의 MS 액체배지에서 공동배양하여 carbenicillin 500 mg/L와 kanamycin 20 mg/L가 첨가된 MS 재분화배지로 옮겨 주었을 때 가장 많은 형질전환체를 얻을 수 있었다. PCR 분석결과, PI promoter-GUS 융합 유전자가 형질전환체의 게놈상에 삽입되어 있음을 확인하였다. Southern 분석결과, ECL-labelling된 PI promoter-GUS 융합 유전자 probe의 coding sequence와 동일한 것으로 판단되는 약 366bp 위치에서 밴드를 확인할 수 있었다. 그러나 형질전환되지 않은 식물체에서는 이들 밴드를 확인할 수 없었다. 조직내 GUS 유전자의 활성은 잎부위에서부터 시작하여 엽병과 줄기의 관다발을 중심으로 나타났으며 상처의 정도가 심할수록 높은 편이었고 그 범위도 넓었다.

引用文獻

- Bajaj YPS, Nietsch P (1975) In vitro propagation of red cabbage(*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). J Exp Bot 26: 883-890
- Barfield DG, Pua EC (1991) Gene transfer in plants of *Brassica juncea* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Plant Cell Reports 10: 308-314
- Bryant J, Green TR, Guresaddaiahand T, Ryan CA (1976) Proteinase inhibitor I from potatoes ; Isolation and characterization of its promoter components. Biochemistry 15: 3418-3423
- Chi GL, Pua EC (1989) Ethylene inhibitors enhanced de novo shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* (Chinese cabbage) in vitro. Plant Science 64: 243-250
- Clare MY, Collin HA (1974) The production of plants from tissue cultures of brussel sprout (*Brassica oleracea* L. var. *gemmifera* DC.) Ann Bot 38: 1067-1076
- Dong JZ, McHughen A (1991) Patterns of transformation intensity on flax hypocotyls inoculated with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports 10: 555-560
- Feng W, Cheng YH (1981) Artificial amphidiploids obtained in an interspecific cross(*Brassica oleracea* L. × *B. pekinensis* Rupr.). Acta Horticulturae Sinica 8: 37-40
- Gamborg Ol, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50: 151-158
- Goldburg RJ, Tjaden G (1990) Are B.T.K. plants really safe to eat? Bio/Technology 8: 1011-1015
- Green GA, Ryan CA (1972) Wound induced proteinase inhibitor from tomato leaves ; a possible defense mechanism against insects. Science 175: 776-777
- Hachey JE, Sharma KK, Moloney MM (1991) Efficient shoot regeneration of *Brassica campestris* using cotyledon explants cultured in vitro. Plant Cell Reports 9: 549-559
- Hui LH, Zee SY (1978) In vitro plant formation from hypocotyls and cotyledons of leaf-mustard cabbage (*Brassica juncea* Coss.). Z Pflanzenphysiol 89: 77-80
- Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D (1986) β -glucuronidase from *Escherichia coli* as gene-fusion marker. Proc Natl Acad Sci 83: 8447-8451
- Johnson R, Narvaez J, An G, Ryan C (1989) Expression of Proteinase inhibitor I and II in transgenic tobacco plant ; Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. Proc Natl Acad Sci USA 86: 9871-9875
- Keil M, Sanches-Serrano J, Willmitzer L (1989) Both wound-inducible and tuber-specific expression are mediated by the promoter of the potato proteinase inhibitor family. EMBO J 8: 1323-1330
- Keil M, Sanches-Serrano J, Shell J, Willmitzer L (1990) Localization of elements important for the wound-inducible expression of a chimeric potato proteinase inhibitor-II-CAT gene in transgenic tobacco plant. Plant Cell 2: 61-70
- Moloney MM, Walker JM, Sharma KK (1989) High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. Plant Cell Reports 8: 238-242
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497

- Murray MG, Thompson WF** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl Acids Res 8: 4321-4325
- Ono Y, Takanata Y, Kaizuma N** (1994) Effect of genotype on shoot regeneration from cotyledonary explants of rapeseed(*Brassica napus* L.). Plant Cell Reports 14: 13-17
- Pareek LK, Chandra N** (1972) Growth and differentiation in *Brassica juncea* tissues grown in vitro. Indian Sci Cong Assoc Proc 59(part): 372-373
- Plunkett G, Senear DF, Zuroske G, Ryan CA** (1982) Proteinase inhibitor I and II from leaves of wounded tomato plants ; purification and properties. Arch Biochem Biophys 213: 463-472
- Radke SE, Andrews BM, Moloney MM, Crouch ML, Kridl JC, Knauf VC** (1988) Transformation of *Brassica napus* L. using *Agrobacterium tumefaciens* ; developmentally regulated expression of a reintroduced napin gene. Theor Appl Genet 75: 685-694
- Ryan CA** (1973) Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. Annu Rev Plant Physiol 24: 173-196
- Sharma KK, Bhojwani SS, Thorpe TA** (1990) Factors affecting high frequency differentiation of shoots and roots from cotyledon explants of *Brassica juncea* (L.) Czern. Plant Science 66: 247-253
- Southern E** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98: 503-512
- Srivastava V, Reddy AS, Guha-Mukherjee S** (1988) Transformation and regeneration of *Brassica oleracea* mediated by an oncogenic *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports 7: 831-835
- Stanford AC, Northcote DH, Bevan MW** (1990) Spatial and temporal patterns of transcription of a wound-induced gene in potato. EMBO J 9: 593-603
- Walker-Simmons MK, Ryan CA** (1984) Proteinase inhibitor synthesis in tomato leaves ; Induction by chitosan oligomers and chemically modified chitosan chitin. Plant Physiol 76: 787-790
- Weiss C, Bevan M** (1991) Ethylene and a wound signal modulate local and systemic transcription of win2 genes in transgenic potato plants. Plant Physiol 96: 943-951

(1997년 10월 16일 접수)