

Particle Bombardment에 의한 고구마의 형질전환

민성란 · 정원중 · 이영복¹ · 유장렬*

생명공학연구소 식물세포 및 분자생물학 Research Unit, ¹충남대학교 농과대학 원예학과

Genetic Transformation of Sweet Potato by Particle Bombardment

MIN, Sung Ran · JEONG, Won Joong · LEE, Young Bok¹ · LIU, Jang Ryol*

Plant Cell and Molecular Biology Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB),
P.O. Box 115, Yusong, Taejon, 305-606, Korea; and ¹Department of Horticulture, Chungnam National University,
Yusong, Taejon, 305-764, Korea. *Corresponding author.

*β*Glucuronidase (GUS) gene of *Escherichia coli* was introduced into sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cells by particle bombardment and expressed in the regenerated plants. Microprojectiles coated with DNA of a binary vector pBI121 carrying CaMV35S promoter-GUS gene fusion and a neomycin phosphotransferase gene as selection marker were bombarded on embryogenic calli which originated from shoot apical meristem-derived callus and transferred to Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 100 mg/L kanamycin. Bombarded calli were subcultured at 4 week intervals for six months. Kanamycin-resistant calli transferred to MS medium supplemented with 0.03 mg/L 2iP, 0.03 mg/L ABA, and 50 mg/L kanamycin gave rise to somatic embryos. Upon transfer to MS basal medium without kanamycin, they developed into plantlets. PCR and northern analyses of six regenerants transplanted to potting soil confirmed that the GUS gene was inserted into the genome of the six regenerated plants. A histochemical assay revealed that the GUS gene was preferentially expressed in the vascular bundle and the epidermal layer of leaf, petiole, and tuberous root.

Key words: genetic transformation, *β*glucuronidase, *Ipomoea batatas*, particle bombardment, sweet potato

고구마는 세계 6대 작물의 하나(Vietmeyer, 1986)로 생산량의 약 98%가 열대 및 온대지역에서 재배되고 있으며, 탄수화물과 단백질의 공급원으로 이용되고 있다. 고구마는 6배체의 영양번식 작물로 재래적인 육종방법으로는 품종개발을 기대하기가 어렵다. 따라서 고구마에 유용한 유전자를 도입하려면 효율적인 조직배양시스템과 형질전환 방법이 확립되어야 한다.

고구마의 조직배양은 주로 체세포배발생을 통한 식물체 재분화시스템이 가장 널리 이용되는데 특히, 정단분열조직에서는 80-90% 이상의 절편에서 배발생캘러스가 유도되어 식물체로 재분화된다(Liu and Cantliffe, 1984; Cantliffe et al., 1987; Liu et al., 1989; Min et al., 1994).

고구마의 형질전환은 *Agrobacterium*(Otani et al., 1993, 1998; Newell et al., 1995; Gama et al., 1996)과 particle bombardment를 이용한 방법(Prakash and Varadarajan,

1992)이 보고되었다. 그러나 particle bombardment를 이용한 경우에는 식물체로 재분화시키지 못하였다(Prakash and Varadarajan, 1992). 본 연구에서는 국내품종 고구마 '울미'의 배발생캘러스에 particle bombardment를 이용하여 GUS 유전자를 도입하고 체세포배발생을 통하여 형질전환 식물체를 생산하고자 하였다.

재료 및 방법

식물 재료 및 배양배지

생육상에서 자라고 있는 국내품종 고구마 (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.: '울미') 줄기를 2 cm 길이로 잘라 10% 유한락스에 10분간 표면살균 후 멸균수로 3회 수세하였다.

해부현미경하에서 높이 약 150 μm , 지름 약 350 μm 의 정단분열조직을 적출하여 Murashige와 Skoog (MS) (1962) 배지의 무기염에 100 mg/L myo-inositol, 0.4 mg/L thiamin · HCl, 30 g/L sucrose, 1 mg/L 2,4-D 및 4 g/L Gelite를 넣은 고체배지 (MS1D)에 절단면이 배지에 닿도록 치상하여 25°C, 암소에서 배발생캘러스를 유도하였고(Cantliffe et al., 1987; Liu et al., 1989, Min et al., 1994) 배발생캘러스는 같은 배지에 한달 간격으로 계대배양을 하였다. 배발생캘러스 유도 후 약 43개월된 배발생캘러스를 particle bombardment용 재료로 사용하였다.

Particle Bombardment

MS1D 고체배지에서 계대배양되고 있는 배발생캘러스를 직경 1~2 mm의 세포괴를 쪼개어 동일 배지 중앙부에 평균직경 1.9 cm내에 20-30개를 치상하여 1일간 배양한 후 bombardment용 식물재료로 사용하였다. Bombardment용 DNA로는 *E. coli*의 β -glucuronidase (GUS) reporter 유전자가 CaMV35S promoter에 연결되어 있고 kanamycin 저항성을 주는 neomycin phosphotransferase (NPT II) 유전자가 선발표지로 되어 있는 pBI121 벡터(Clontech)를 사용하였다. Particle bombardment 기기로는 (주)바이오니아의 'Gene Gun'을 사용하여 60 cmHg의 진공상태에서 헬륨가스를 이용하여 bombarding하였다(Kwon et al., 1996). Sanford 등(1992)의 방법에 따라 텅스텐 입자에 DNA를 코팅하고 DNA농도를 0.62 mg/mL, 압력 15 Kgf/cm², 배발생세포괴와의 거리를 6 cm로 bombarding 하였다. 3일간 25°C, 암소에서 배양한 후 100 mg/L kanamycin을 첨가한 MS1D 고체배지(선발배지)에 한달 간격으로 6개월간 계대배양한 후 배발생캘러스를 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ kanamycin, 0.03 mg/L 2iP, 0.03 mg/L ABA가 첨가된 고체배지로 옮겨 체세포배를 유도하였고 유도된 체세포배는 MS 기본배지로 옮겨 25°C, 약 2,000 lx 배양조건에서 식물체로 재분화시켰다. 재분화 식물체는 순화처리를 거쳐 토양에서 생육시켰다.

GUS 활성의 조직화학적 분석

Bombarding한 배발생세포괴를 25°C에서 24시간 암배양한 것, 이들을 선발배지에서 2개월 동안 계대배양한 것, 이들로부터 재분화된 식물체를 대상으로 GUS 활성의 조직화학적 분석을 Jefferson 등(1987)의 방법에 따라 실시하였다. 배발생캘러스와 식물체의 잎, 엽병, 피근 조직 절편을 5-bromo-4-chloro-3-indoleglucuronide (X-Gluc) (Clontech)가 포함된 1 mL의 반응액에서 16시간 반응시킨 후 70% 알코올로 세척한 후 해부현미경으로 관찰하였다.

PCR과 Northern 분석

토양에서 생육중인 고구마 잎으로부터 Asemota (1995)의 방법으로 DNA를 분리하여 GUS 및 NPT II primer를 이용한 PCR을 수행하였다. GUS의 경우 94°C에서 1분, 57°C에서 1분 및 72°C에서 1분으로 35회 수행하였고 NPT II는 94°C에서 1분, 65°C에서 1분 및 72°C에서 1분으로 35회 수행하였다. 합성된 DNA를 1% agarose gel에 전기영동한 후 밴드를 확인하였다. PCR에 사용된 GUS의 primer는 5'-CGTCCTGTAGAAACCCCAACC-3'와 5'-AGGCACAGCGCATCAAAGAGA-3'이고 NPT II의 primer는 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3'와 5'-ATCGGAGCGGCGATACCGTA-3'이었다.

또한 PCR로 확인된 잠정적인 형질전환 개체의 GUS 유전자 발현을 조사하기 위하여 고구마 잎으로부터 TRIZOL(GIBCO BRL) 용액을 이용하여 total RNA를 분리하였고, 30 μg 의 RNA를 65°C에서 변성시켜 formaldehyde가 함유된 1% agarose gel에 전기영동한 후 20×SSC 용액에서 나일론 막(Turboblotter, Schleicher & Schuell)에 옮기고 [α -³²P] dCTP로 표지된 GUS probe를 이용하여 northern blot을 수행하였다.

결과 및 고찰

Kanamycin 저항성 배발생캘러스로부터 식물체 재분화

pBI121으로 bombarding된 배발생세포괴는 일주일간 MS1D 배지에 배양한 후 100 mg/L kanamycin 배지로 옮겨 한달 간격으로 계대배양하였다. 선발배지에서 계대배양중 대부분의 캘러스가 점액질화하여 배발생능을 잃어버렸으나 몇몇 캘러스는 배발생 능력을 그대로 유지하였다. 배양 6개월 후 이들 배발생 캘러스를 0.03 mg/L 2iP, 0.03 mg/L ABA 및 50 mg/L kanamycin이 첨가된 배지에 옮겨 체세포배를 유도하였다(Figure 1A). 배발생캘러스로부터 유도된 체세포배는 MS 기본배지에서 발아하여 식물체로 재분화되었고(Figure 1B) 순화과정을 거쳐 토양에서 생육중이다(Figure 1C).

GUS 유전자의 조직학적 분석

pBI121으로 bombarding한 후 배발생 캘러스를 X-Gluc 기질 용액에 반응시켜 GUS의 발현을 관찰하였다. Bombardment 후 1일이 지난 배발생세포괴의 일시적인 GUS 발현을 보면 수많은 청색반점이 관찰되었으나(Figure 2A), DNA를 코팅하지 않고 bombarding한 대조구의 배발생캘러스에서는 청색반점이 나타나지 않았다(Figure 2D,E). Bombarding 후 배양 2개월동안 선발된 배발생캘러스와 체세포배의 일부 및 전체부위에서는 강한 청색을 띠었다

(Figure 2B,C). 체세포배의 전부위에서 강한 청색을 나타낸 것은 GUS 유전자가 도입된 단세포가 분열하여 체세포배로 발달한 것이고, 일부 부위에서 청색을 나타낸 것은 이미 발달중인 어린 체세포배에 GUS 유전자가 도입되어 그 부위가 분열한 것으로 추정된다. 또한 선발과정을 거쳐 배발생 캘러스로부터 재분화된 식물체를 토양으로 이식하여 생육중인 고구마의 잎, 엽병과 괴근 조직의 GUS 활성 조사에서도 형질전환된 조직의 경우 강한 청색을 띠었으나(Figure 3D,E,F) 대조구에서는 반응이 전혀 없었다(Figure 3A,B,C). 특히 형질전환된 엽병의 경우 관다발계와 표피층을 중심으로 강한 발현을 보였고(Figure 3D) 잎에서는 주맥을 따라 GUS 유전자가 강하게 발현되었으며 특히, 잎의 절단면(Figure 3E)에서 가장 강한 발현이 이루어졌다. 이는 CaMV35S promoter가 constitutive promoter라고는 하지만 분열조직의 유전자 발현 수준이 비분열조직 보다 높으니까

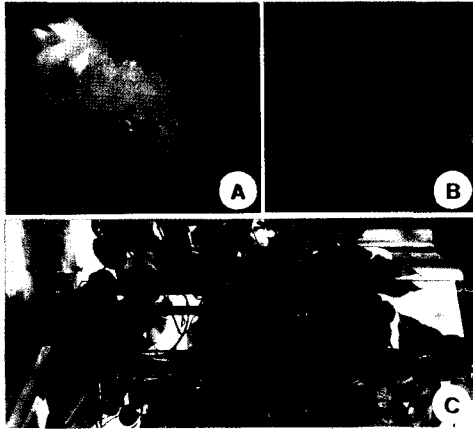


Figure 1. Plant regeneration through somatic embryogenesis from embryogenic calli after particle bombardment of sweet potato. A: Somatic embryos derived from embryogenic calli; B: Plantlets developed from somatic embryos; C: Transgenic plants growing in potting soil.

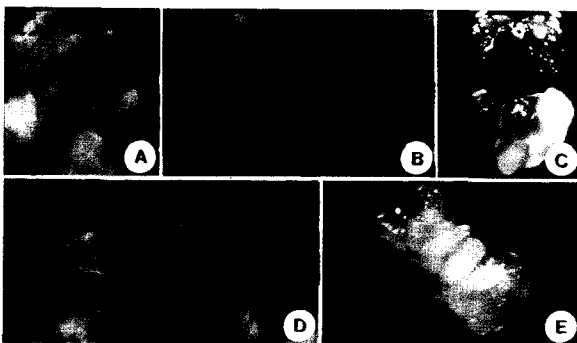


Figure 2. GUS gene expression in embryogenic calli and somatic embryos of sweet potato. A: Transient GUS expression of embryogenic calli after particle bombardment; B,C: GUS expression in embryogenic callus and somatic embryos developed from callus after particle bombardment; D,E: Somatic embryos derived from embryogenic calli after bombarding of uncoated particle.

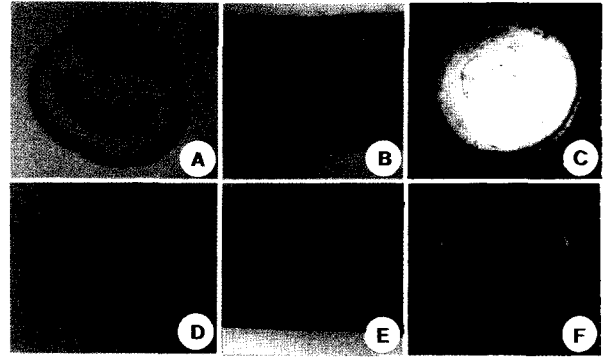


Figure 3. Histochemical assay of GUS activity in petiole, leaf, and tuberous root of sweet potato. A, B, C: Cross section of petiole, leaf, and tuberous root segment of nontransformed plant; D, E, F: Transformed petiole, leaf, and tuberous root of sweet potato.

인하는 것 같다. 유사한 경향은 CaMV35S promoter를 이용한 다른 종의 형질전환 식물체에서도 보고된 바 있다 (Jefferson et al., 1987).

PCR과 Northern 분석

Kanamycin 저항성 캘러스로부터 체세포배발생을 거쳐 재분화된 식물체에서 도입된 외래 유전자를 확인하기 위하여, 토양에서 생육중인 식물체의 잎 조직으로부터 분리한 엽채 DNA로 PCR을 실시하였다. 21-mer의 oligomer로 된 GUS와 NPT II 유전자의 염기서열 양쪽 말단 특이 primer를 사용하여 PCR을 수행한 결과 6개체 전부 GUS primer를 이용한 경우 1,388 bp, NPTII primer를 사용하였을 때는 700 bp 크기의 DNA 밴드가 각각 얻어졌다(Figure 4A,B). 또한 고구마 잎으로부터 총 RNA를 분리하여 northern 분석을 수행한 결과 GUS 유전자의 mRNA 크기와 같은 약 2.1 kb에 해당하는 부위에 강한 발현이 나타났다(Figure 5).

Particle bombardment 방법을 이용하여 형질전환시킨 Prakash와 Varadarajan (1992)은 고구마의 비배발생 캘러스와 부정근에서만 GUS 유전자를 확인하고 식물체로 재분화시키지 못했지만, 본 연구에서는 현재 식용으로 이용되고 있는 국내품종 고구마에 GUS 유전자를 도입하여 재분화 개체를 얻었다. 또한 토양에서 생육중인 형질전환된 고구마의 정단분열조직을 배양하여 얻은 체세포배에서도 GUS 유전자가 강하게 발현됨을 조직화학적 분석을 통해 재확인하였다. 이는 GUS 유전자가 핵겨눔에 도입되어 안정적으로 체세포 분열과정에서 유지되고 있음을 시사한다. 이와 같이 본 연구에서는 particle bombardment를 이용하여 처음으로 형질전환 고구마 식물체를 얻을 수 있었다.

Particle bombardment 방법에 의한 식물의 형질전환법은 *Agrobacterium*법의 대용으로 사용될 수 있다. 특히 형질전환하고자 하는 식물의 종이나 품종이 *Agrobacterium*의 숙주범

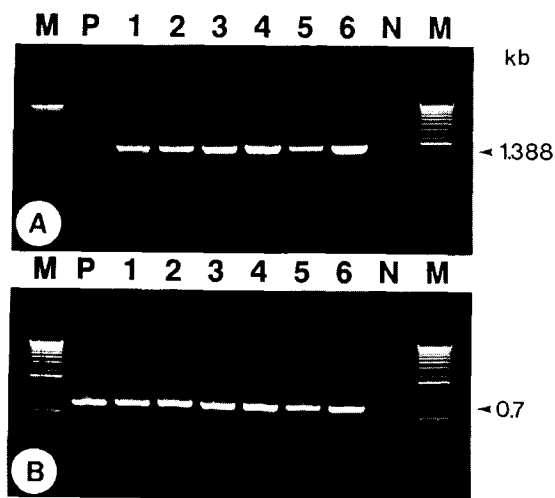


Figure 4. The detection of GUS (A) and NPT II (B) gene in the genomic DNA from transformed sweet potato by PCR. Lane M: Molecular size marker: P:pBI121 as positive control: 1-6: Transgenic plants: N: Nontransformed plant.

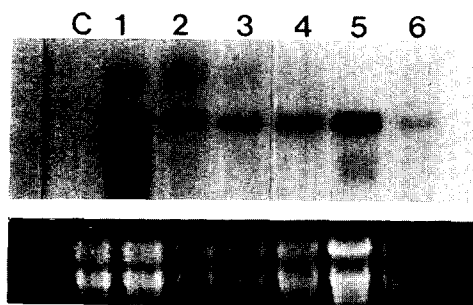


Figure 5. Northern blot analysis of transgenic sweet potatoes. Lane C: Nontransformed plant: 1-6: Transgenic plants. The lower part of each panel shows an ethidium bromide-stained gel.

위에 들지 않을 때 유용하다. 우리는 예비실험에서 *A. tumefaciens* LBA4404를 사용하였으나 형질전환 고구마 식물체를 얻는데 실패하였다. 그러나 Gama 등(1996)과 Otani 등(1998)은 *A. tumefaciens* EHA101을 사용하여 성공하였다. Particle bombardment법은 식물체 재분화가 보장되는 조직을 재료로 할 때 큰 어려움없이 형질전환 식물체를 얻을 수 있는 잇점이 있다. Prakash와 Varadarajar (1992)은 고구마의 잎과 엽병을 사용하는데 비배발생 캘러스와 뿌리 이외의 기관을 얻지 못한 바 있다.

우리는 현재 본 형질전환 시스템을 이용하여 고구마 자체의 AGPase 효소생산을 방해함으로써 당의 함량을 증가시키기 위해 고구마 유래 AGPase anti-sense cDNA(Bae and Liu, 1997)를 particle bombardment 방법으로 배발생캘러스에 도입하여 현재 kanamycin 배지에서 선발중에 있다.

적 요

*Escherichia coli*의 β -glucuronidase (GUS) 유전자를 고구마의 배발생세포피에 particle bombardment로 도입하여 재분화 식물체에 발현시켰다. CaMV35S-GUS 융합유전자와 선발표지로서 neomycin phosphotransferase 유전자가 들어있는 binary 운반체 pBI121 DNA를 텅스텐 입자로 코팅하여 정단분열 조직 유래의 배발생 세포피에 bombarding하였다. Bombarding된 세포피를 1 mg/L 2,4-D와 100 mg/L kanamycin이 첨가된 MS 배지로 옮겨 한달 간격으로 6개월 동안 계대배양하였다. Kanamycin 저항성 캘러스를 0.03 mg/L 2iP, 0.03 mg/L ABA 및 50 mg/L kanamycin이 들어있는 MS 배지로 옮겨 체세포배를 유도하였고, kanamycin이 첨가되지 않은 MS 기본배지에서 식물체로 발달시켰다. 토양에서 생육중인 6개체의 식물체를 대상으로 PCR과 northern 분석을 수행한 결과 GUS 유전자가 식물체 genome에 안정적으로 도입, 발현되었음이 확인되었다. 조직화학적 분석으로 GUS 유전자가 형질전환 식물체에서 발현됨을 밝혔다.

사사 - 원고에 세심한 논평을 해준 이형순, 김재훈 박사에게 감사한다.

인용 문헌

- Asemota HN (1995) A fast, simple, and efficient miniscale method for the preparation of DNA from tissues of yam (*Dioscorea spp.*). *Plant Mol Biol Rep* 1:19-21
- Bae JM, Liu JR (1997) Molecular cloning and characterization of two novel isoforms of the small subunit of ADPglucose pyrophosphorylase from sweet potato. *Mol Gen Genet* 254:179-185
- Cantliffe DJ, Liu JR, Schultheis JR (1987) Development of artificial seeds of sweet potato for clonal propagation through somatic embryogenesis. In WH Smith, JR Frand, eds, *Methane from Biomass: A Systems Approach*. Elsevier Applied Sci, New York, pp 183-195
- Gama MICS, Leite Jr RP, Cordeiro AR, Cantliffe DJ (1996) Transgenic sweet potato plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 46:237-244
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion: -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901-3907
- Kwon SY, Liu JR, Kim JJ, Park HO (1996) A Low-priced DNA delivery system using microprojectiles for plant cell transformation. *Korean J Plant Tissue Culture* 23:51-54
- Liu JR, Cantliffe DJ (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir.).

- Plant Cell Rep 3: 112-115
- Liu JR, Cantliffe DJ, Simonds SC, Yuan JF** (1989) High frequency somatic embryogenesis from cultured shoot apical meristem domes of sweet potato (*Ipomoea batatas*). SABRAO J 21:93-101
- Min SR, Liu JR, Rho TH, Kim CH, Ju JI** (1994) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of Korean cultivar sweet potatoes. Korean J Plant Tissue Culture 21:157-160
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Newell CA, Lowe JM, Merryweather A, Rooke LM, Hamilton WDO** (1995) Transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) with *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of plants expressing cowpea trypsin inhibitor and snowdrop lectin. Plant Sci 107:215-227
- Otani M, Mii M, Handa T, Kamada H, Shimada T** (1993) Transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Sci 94: 151-159
- Otani M, Shimada T, Kimura T, Saito A** (1998) Transgenic plant production from embryogenic callus of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Biotech 15:11-16
- Prakash CS, Varadarajan U** (1992) Genetic transformation of sweet potato by particle bombardment. Plant Cell Rep 11:53-57
- Sanford JC, Smith FD, Russell JA** (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. Meth Enzymol 217:485-509
- Vietmeyer ND** (1986) Lesser-known plants of potential use in agriculture and forestry. Science 232:1379-1384

(1998년 7월 10일 접수)