

채소작물의 형질전환을 위한 재분화체계 확립 및 항생제 검정

박영두[†] · 구자정

경희대학교 원예학과

Establishment of Regeneration System and Antibiotic Sensitivity Test for Transformation of Various Vegetable Crops

Young-Doo Park[†] and Ja-Jung Ku

Department of Horticulture, KyungHee University, Yongin-Si 449 701, Korea

Abstract

This study was conducted to determine the concentrations of plant growth regulators required for regeneration and the concentrations of antibiotics for the selection of transformed regenerants from lettuce, melon, musk melon and tomato. The optimal concentrations of plant growth regulators for shoot formation were NAA 0.1 mg/ℓ + BA 0.1 mg/ℓ for lettuce, NAA 0.01 mg/ℓ + BA 2.0 mg/ℓ for melon and NAA 0.01 mg/ℓ + BA 0.5 mg/ℓ for musk melon. Shoot induction from tomato, lettuce and melon was completely inhibited by 30 mg/ℓ or higher concentrations of kanamycin. Shoot formation from musk melon was not affected by kanamycin up to 40 mg/ℓ, but was reduced in the presence of 50 mg/ℓ and completely inhibited by 100 mg/ℓ. Shoot formation of all four crops was completely inhibited by hygromycin at 10 mg/ℓ. Both carbenicillin and cefatoxime did not show any negative effects on shoot formation.

Key words – Carbenicillin, Cefatoxime, Hygromycin, Kanamycin, Plant growth regulator

서 론

*Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 형질전환 즉 유용유전자의 식물체로의 전이는 식물분자생물학 분야에 커다란 발전을 가져왔다. *A. tumefaciens*의 이용은 주로 쌍떡잎식물의 경우에 가장 폭넓게 적용될 수 있는 기술로 단자엽 식물에서도 시도된 바 있으나 [2,3] DNA의 전이만 가능할 뿐 형질전환체의 생산에 한계점이 있는 것으로 보고되었다.

이 형질전환방법의 개발로 여러 작물에서 내병성, 내충성 등 유용한 형질의 대상작물로의 전이가 가능케 되었다. 형질전환된 식물세포는 kanamycin [4], hygromycin [17],

streptomycin [6], gentamycin [10] 및 bleomycin [5] 등 항생제에 대한 chimeric 유전자로 선발이 가능하다. 이러한 항생제에 대한 저항성은 선발배지에서 형질전환되지 않은 세포는 죽는 반면에 형질전환된 세포는 살아남을 능력을 가져 재분화될 수 있다.

가장 일반적으로 사용되는 선발 marker로는 원핵생물의 transposon Tn5로부터 분리된 [1] neomycin phosphotransferase, type II (NPT II) 효소이며 이 효소는 kanamycin 과 같은 aminoglycoside 화합물의 독성을 없애줄 수 있다. 이 NPT II 유전자는 많은 식물 종들에서 식물 전사 promoter인 nopaline syntase (NOS) 혹은 cauliflower mosaic

[†] Corresponding author

virus (CaMV) 35S와 결합시켜 형질전환을 효과적으로 시도할 수 있게 하였다. 형질전환체의 선발을 가능케 하는 또 하나의 항생제로는 hygromycin B로 이는 진핵생물이나 원핵생물에서 단백질의 합성을 억제한다. 이 항생제에 대한 저항성은 *E. coli*에서 분리된 hygromycin phosphotransferase (aphIV)에 의해서 얻을 수 있다 [7]. Cephalosporin 계통의 항생제인 carbenicillin과 cefatoxime은 형질전환시 사용되는 *A. tumefaciens*의 제거를 위하여 배양배지에 첨가하는 항생제이다.

따라서 식물의 유전형 및 조직에 따른 kanamycin과 hygromycin에 대한 감응성을 고려해야 유전자 전이 체계 내에서 형질전환된 세포의 선발을 위한 가장 적당한 항생제의 결정이 가능하며 이를 위하여 각 작물별로 가장 적당한 항생제와 사용농도의 결정이 필수적이라 생각된다. 이와 더불어 효과적인 형질전환을 위해서는 대상 작물에 가장 적절한 재분화체계의 확립이 필요하다.

따라서 본 실험은 첫째 여러 채소작물중 재분화체계가 확립되지 않은 작물의 재분화를 위한 성장조절제의 적정 농도를 결정하고 두 번째는 형질전환시 필요한 항생제의 적정 사용 농도를 결정하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

성장조절제가 상추, 참외, 멜론의 신초형성에 미치는 영향 재분화체계가 확립되지 않은 상추 (적치마상치, 서울종묘), 참외 (금보라참외, 중앙종묘), 멜론 (로맨스멜론, 동부한농종묘)의 재분화를 위한 성장조절제의 적정농도를 결정하기 위한 실험에서는 각 작물에 따라 auxin류의 naphthalene acetic acid (NAA)와 cytokinin류의 benzyladenine (BA)의 여러 조합을 첨가한 Murashige와 Skoog (MS)배지를 사용하였다. 무균상태에서 발아된 상추, 참외, 멜론의 자엽을 각각 조합이 다른 배지에 7개씩 치상하고 각 처리는 6반복으로 실시하였다. Callus 형성정도, 신초형성수 (5 mm 이상), 뿌리 형성수를 치상 후 4주부터 매주 조사하여 가장 효과적인 농도를 결정하였다.

항생제가 신초형성에 미치는 영향

항생제 감응성 검정은 MS 배지에 토마토 (광수토마토, 중앙종묘)는 3.5 mg/ℓ IAA와 0.4 mg/ℓ zeatin이 첨가되

고, 참외 (금보라참외, 중앙종묘), 상추 (적치마상치, 서울종묘), 멜론 (로맨스멜론, 동부한농종묘)은 실험 I에서 결정된 성장조절제가 첨가된 재분화 배지에 kanamycin (0, 10, 20, 30, 40, 50 및 100 mg/ℓ), hygromycin (0, 5, 10, 20, 30 및 40 mg/ℓ), carbenicillin (0, 500 및 1000 mg/ℓ) 그리고 cefatoxime (0, 200 및 400 mg/ℓ)을 각각 filter로 소독한 후 첨가하여 실시하였다. 무균상태에서 발아된 작물의 자엽을 각각 다른 항생제 농도를 가진 배지에 7개씩 치상하였고 각 처리는 6반복으로 실시하였다.

결과 및 고찰

성장조절제가 상추, 참외, 멜론의 신초형성에 미치는 영향 재분화를 위한 성장조절제의 적정농도를 결정하기 위한 실험에서는 NAA와 BA의 조합을 다양하게 하여 실시하였다.

Callus는 참외, 멜론, 상추 공히 성장조절제를 첨가하지 않은 무처리구와 0.01 및 0.05 mg/ℓ의 NAA만 첨가된 배지를 제외하고는 모든 단용 및 혼용처리에서 양호하게 형성되었다 (자료 미제시). 신초형성은 상추는 NAA 0.1 mg/ℓ와 BA 0.1 mg/ℓ의 혼용처리가 가장 효과적이었으며 (Table 1), 참외는 NAA 0.01 mg/ℓ와 BA 2.0 mg/ℓ (Table 2), 멜론은 NAA 0.01 mg/ℓ와 BA 0.5 mg/ℓ (Table 3)의 처리가 가장 효과적 이었다. 특히 BA가 첨가되지 않은 배지에서는 신초가 전혀 형성되지 않았으며 모든 작물에서 NAA의 첨가 유무에 관계없이 BA의 첨가만으로도 많은 수의 신초가 형성되기도 하였다. 이는 신초형성이 cytokinin류인 BA에 영향을 받고 auxin류인 NAA와의 상호작용에 의해 그 효과가 상승하는 것으로 보여진다.

NAA는 0.01 이나 0.05 mg/ℓ의 첨가가 0.1 mg/ℓ의 첨가보다 효과가 더 있었으며 이는 신초형성이 NAA의 농도보다는 BA와의 상호비율에 더 영향을 받는 것으로 판단 된다. 그러나 참외와 멜론의 경우 NAA 0.01 mg/ℓ와 BA의 혼용처리와 BA 단용처리를 비교할 때 큰 차이가없어 참외는 BA 2.0 mg/ℓ, 멜론은 BA 0.5 mg/ℓ 첨가가 신초형성에 효과적이라 할수 있었다. 뿌리 형성은 낮은 농도의 NAA 단용처리가 보다 효과적이었으며 오히려 0.1 mg/ℓ의 첨가나 BA와 혼용처리는 뿌리형성에 도움이 되지 않았다 (data not shown). 따라서 새로 형성된 신초의 뿌리 유

Table 1. Effect of NAA and BA on number of shoots induced from cotyledons of 'Jukchima lettuce'

NAA(mg/ℓ)	Number of shoots regenerated per cotyledon			
	BA(mg/ℓ)			
	0	0.1	0.2	0.5
0	0.00 ^z	1.10 ± 0.3 ^y	3.10 ± 0.7	3.05 ± 0.7
0.01	0.00	3.86 ± 0.7	5.19 ± 0.8	3.48 ± 0.5
0.05	0.00	8.95 ± 2.4	5.57 ± 1.5	3.00 ± 0.8
0.10	0.00	12.86 ± 1.2	9.76 ± 2.1	9.48 ± 0.7

^z: Each value represents a mean of 6 replication of 7 cotyledons each.

^y: Standard error

Table 2. Effect of NAA and BA on number of shoots induced from cotyledons of 'Eunchun melon'

NAA(mg/ℓ)	Number of shoots regenerated per cotyledon			
	BA(mg/ℓ)			
	0	0.1	0.2	0.5
0	0.00 ^z	1.43 ± 0.2 ^y	2.14 ± 0.7	2.86 ± 0.9
0.01	0.00	1.57 ± 0.5	2.38 ± 0.4	4.00 ± 0.8
0.05	0.00	0.89 ± 0.3	2.14 ± 0.5	2.00 ± 0.4
0.10	0.00	1.90 ± 0.7	1.86 ± 0.5	2.24 ± 0.7

^z: Each value represents a mean of a 6 replications of 7 cotyledons each.

^y: Standard error

Table 3. Effect of NAA BA on number of shoots induced from cotyledons of 'Romance musk melon'

NAA(mg/ℓ)	Number of shoots regenerated per cotyledon			
	BA(mg/ℓ)			
	0	0.1	0.5	1.0
0	0.00 ^z	1.76 ± 0.4 ^y	6.43 ± 0.8	6.67 ± 1.8
0.01	0.00	2.62 ± 0.5	8.57 ± 1.1	5.29 ± 0.6
0.05	0.00	4.19 ± 0.8	6.19 ± 1.5	4.00 ± 0.6
0.10	0.00	4.81 ± 1.2	6.81 ± 1.3	6.05 ± 1.0

^z: Each value represents a mean 6 replication of 7 cotyledons each.

^y: Standard error

기를 위한 계대배양시 NAA 0.01이나 0.05 mg/ℓ를 배지에 첨가하면 효과적일 것으로 판단된다.

항생제가 신초형성에 미치는 영향

본 실험은 형질전환시 필요한 항생제의 적정 사용농도를 결정하기 위하여 토마토, 참외, 상추 및 멜론을 kanamycin, hygromycin, carbenicillin, cefatoxime 등 4가지 항생제를 이용하여 신초형성 정도를 검정하였다 (Table 4). Kanamycin의 경우 토마토, 참외 상추는 공히 30 mg/ℓ에서 신초형성이 완전히 억제되었으나 멜론은 50 mg/ℓ

처리에서도 신초가 형성되어 멜론이 타 작물보다 kanamycin에 대하여 저항성이 더 있었다. 그러므로 kanamycin을 선발 maker로 사용할 경우 토마토, 참외, 상추는 30 mg/ℓ, 멜론은 50 mg/ℓ 이상의 농도로 처리하는 것이 효과적이라고 판단된다. Kanamycin에 대한 내성은 작물의 종류와 품종에 따라 다른데 본 실험의 결과와는 달리 Sharon 등 [15]은 유체의 형질전환체 선발에 25 mg/ℓ 고추에서는 100 mg/ℓ [8,9]를 사용하였다. Hygromycin은 Kanamycin보다 낮은 농도에서 억제현상이 일어났다. 토마토, 참외, 상추, 멜론 등 모든 작물에서 10 mg/ℓ 처리부터 완전히 억제

Table 4. Effect of kanamycin, hygromycin, carbenicillin and cefatoxime on number of shoots induced from cotyledons of various vegetable crops

Antibiotics(mg/ ℓ)	Number of shoots regenerated per cotyledon			
	Tomato	Melon	Lettuce	Musk Melon
Kanamycin				
0	9.76 ^z ± 2.2 ^y	3.43 ± 1.1	12.10 ± 3.0	9.05 ± 2.5
10	3.95 ± 0.9	3.33 ± 1.0	7.14 ± 1.2	5.14 ± 1.3
20	4.86 ± 1.2	1.43 ± 0.3	2.05 ± 0.7	4.05 ± 0.7
30	0.00	0.00	0.00	2.05 ± 0.4
40	0.00	0.00	0.00	3.14 ± 0.8
50	0.00	0.00	0.00	1.90 ± 0.6
100	0.00	0.00	0.00	0.00
Hygromycin				
0	9.76 ± 2.2	3.43 ± 1.1	12.10 ± 3.0	9.05 ± 2.5
5	6.56 ± 0.8	--	2.52 ± 0.8	3.10 ± 0.6
10	--	0.00	0.00	0.00
20	0.00	0.00	0.00	0.00
30	0.00	0.00	0.00	--
40	0.00	0.00	0.00	0.00
Carbenicillin				
0	9.76 ± 2.2	3.43 ± 1.1	12.10 ± 3.0	9.05 ± 2.5
500	11.67 ± 2.0	9.05 ± 2.3	11.10 ± 1.3	10.71 ± 1.8
1000	5.24 ± 0.8	2.86 ± 0.7	9.05 ± 2.0	4.05 ± 1.3
Cefatoxime				
0	9.76 ± 2.2	3.43 ± 1.1	12.10 ± 3.0	9.05 ± 2.5
200	10.95 ± 2.1	2.38 ± 0.4	11.90 ± 1.3	9.05 ± 1.5
400	9.43 ± 1.7	2.33 ± 0.3	10.57 ± 0.7	2.86 ± 0.7

^z : Each value represents a mean of 6 replications of 7 cotyledons each

^y : Standard error

되어 이 농도를 이용 형질전환 세포를 선발할 수 있으리라 사료된다. 멜론의 경우 kanamycin 처리에서 타 작물보다 저항성을 보였으나 hygromycin 처리에서는 같은 농도에서 억제현상이 일어나 타 작물에 비해 저항성을 보이지 않았다. 낮은 농도의 hygromycin 처리에서 오히려 신초의 형성이 촉진되었다는 보고도 [13] 있으나 본 실험에서는 비슷한 결과를 보이지는 않았다. 그러나 hygromycin이외에도 penicillin과 같은 항생제도 낮은 농도에서는 담배의 세포배양에서 촉진효과를 나타낸 것으로 [14] 미루어보아 아직 밝혀지지 않은 낮은 농도의 항생제가 오히려 세포배양에 촉진효과가 있어 신초형성이 어려운 작물에서는 이용할 수 있으리라 판단된다.

Carbenicillin과 cefatoxime의 경우 네 가지 작물 모두에

서 어떠한 억제현상도 발견하지 못했다. 오히려 토마토는 carbenicillin 500 mg/ ℓ 처리와 cefatoxime 200 mg/ ℓ 처리에서 참와는 carbenicillin 500 mg/ ℓ 에서 신초형성이 촉진되는 결과를 보여 보리 [12], 자작나무 [16] 및 밀 [11]의 세포배양시 보였던 촉진 효과와 일치하였다. 결과적으로 *A. tumefaciens*를 제거하기 위하여 사용되는 carbenicillin 500 mg/ ℓ 와 cefatoxime 200 mg/ ℓ 는 재분화에 아무 영향을 주지 않아 효과적으로 사용될 수 있다고 판단된다.

대부분의 작물 (예, 담배, 감자 등)에서는 kanamycin을 selection marker로 사용할 때 50 ~ 100 mg/ ℓ 를 사용하나 이보다 재분화율이 낮은 채소작물의 경우에는 이 범위의 농도가 적당치 않다고 판단되어 형질전환체를 선발할 수 있는 최소의 kanamycin 농도를 결정함으로써 재분화율의

감소를 최소화할 수 있으리라 생각된다. 또한 kanamycin 외에 사용되고있는 hygromycin의 사용농도도 결정함으로써 두 개의 유용유전자를 동시에 전이할 수 있는 가능성도 제시하였다.

본 연구를 통해 결정된 생장조절제와 항생제의 농도는 유용유전자의 획득 시 이를 원하는 채소작물에 전이할 수 있어 변이의 폭을 넓히고 따라서 다양한 품종개발을 유도하는 효과가 기대된다.

요 약

본 실험은 여러 채소작물종 재분화체계가 확립되지 않은 작물의 재분화를 위한 생장조절제의 적정농도를 결정하고, 형질전환시 필요한 항생제의 적정 사용농도를 결정하기 위하여 실시하였다. 신초형성은 상처는 NAA 0.1 mg/ℓ BA 0.1 mg/ℓ의 혼용처리가 가장 효과적 이었으며 참외는 NAA 0.01 mg/ℓ와 BA 2.0 mg/ℓ, 멜론은 NAA 0.01 mg/ℓ와 BA 0.5 mg/ℓ 혼용처리가 가장 효과적 이었다. 토마토, 참외, 상추는 공히 kanamycin 30 mg/ℓ 처리에서 신초형성이 완전히 억제되었으나 멜론은 50 mg/ℓ 처리에서도 신초가 형성되었다. Hygromycin은 토마토, 참외, 상추, 멜론 등 모든 작물에서 10 mg/ℓ 처리부터 완전히 억제되었다. Carbenicillin과 cefatoxime의 경우 네가지 작물 모두에서 어떠한 억제현상도 발견하지 못했다.

감사의 글

본 연구는 97년도 경희대학교 교비연구비 지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. and Schaller, H. 1982. Nucleic acid sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn. *Gene.*, **19**, 327-335
2. Bruno, D., Philippe, G. and Jullien, M. 1993. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Asparagus officinalis* L. long-term embryogenic callus and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell. Rep.*, **12**, 129-

- 132.
3. Hernalsteens, J. P., Thia-Tong, L., Schell J. and van Montagu, M. 1984. An *Agrobacterium*-transformed cell culture from the monocot *Asparagus officinalis*. *EMBO J.*, **13**, 3039-3941.
4. Herrera-Estrella, L., De Block, M., Messens, E., Hernalsteens, J. P., van Montague, M. and Shell. J. 1983. Chimeric genes as dominant selectable makers in plant cells. *EMBO J.*, **4**, 2987-2995.
5. Hille, J., Verheggen, F., Roelvink, P., Franssen, H., van Kammen, A. and Zabel. P. 1986. Bleomycin resistance : a new dominant selectable marker for plant cell transformation. *Plant Mol. Biol.*, **7**, 171-176.
6. Jones, J. D. G., Svab, Z., Harper, E. C., Hurwitz, C. D. and Maliga, P. 1987. A dominant nuclear streptomycin resistance marker for plant cell transformation. *Mol. Gen. Genet.*, **210**, 86-89.
7. Kaster, K. R., Burgett, S. G., Rao, R. N. and Ingolia, T. D. 1983. Analysis of a bacterial hygromycin B resistance gene by transcription and translation fusions and by DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 6895-6899.
8. Kim, D. S., Kang, B. C., Kim, K. T., Oh, D. G. and Yoon, J. Y. 1996. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). The Korean Society for Horticultural Science, *Horticulture Abst.*, **14**(1), 46-47.
9. Lee, H. D. 1993. Studies on in vitro regeneration and transformation of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). MS thesis, Seoul National University.
10. Maria, B. H., Medford, J. I., Hoffman, N. L., Rogers, S. T. and Klee, H. J. 1988. Development of a plant transformation selection system based on expression of genes encoding gentamycin acetyltransferase. *Plant Physiol.*, **86**, 1216-1222.
11. Mathias, R. J. and Boyd, L. A. 1986. Cefatoxime stimulates callus growth embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat *Triticum aestivum* L. *Em. Thell. Plant Sci.*, **46**, 217-224.
12. Mathias, R. J. and Musaka, C. 1987. The effect of cefataxime on the growth and regeneration of callus from varieties of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Rep.*, **6**, 454-457.
13. Park, Y. D., Ronis, D. H., Boe, A. A. and Cheng, Z. M. 1995. Plant regeneration from leaf tissue of four North Dakota Genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.) *Amer. Potato J.*, **72**, 329-338.
14. Pollock, K., Barfield, D. G. and Shields, R. 1983. The

- toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant Cell Rep.*, **2**, 35-39.
15. Sharon, E., Joann, C. R., Turner C. and Daniel, F. 1992. Transformation and regeneration of *Brassica rapa* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell. Rep.*, **11**, 499-505.
16. Valobra, C. P. and James, D. J. 1990. In vitro shoot regeneration from leaf discs of *pendula* "Dalecarlica" EM85. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **21**, 54-55.
17. Waldron, C., Murphy, E. B., Roberts, J. L., Gustafson, G. D., Armour, S. L. and Malcolm, S. K. 1985. Resistance to hygromycin B. A new marker for plant transformation. *Plant Mol. Biol.*, **5**, 103-108