

# Phosphinothricin acetyltransferase 유전자를 이용한 현사시의 형질전환

오경은 · 양덕춘<sup>1</sup> · 문흥규<sup>2</sup> · 박재인\*

충북대학교 산림과학부 · <sup>1</sup>한국인삼연초연구원 유전생리부 · <sup>2</sup>임업연구원 임목육종부

## Transformation of *Populus alba* × *Populus glandulosa* Using Phosphinothricin Acetyltransferase Gene

OH, Kyoung Eun · YANG, Deok Chun<sup>1</sup> · MOON, Heung Kyu<sup>2</sup> · PARK, Jae In\*

School of Forest Resources, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea

<sup>1</sup>Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taedok Science Town, Taejon, 305-345, Korea

<sup>2</sup>Forestry Research Institute, Forestry Administration, Suwon, 441-350, Korea

**ABSTRACT** This study was conducted to produce herbicide resistant plants by transferring phosphinothricin acetyltransferase (PAT) gene into *Populus alba* × *Populus glandulosa* No. 3 using *Agrobacterium tumefaciens* MP 90/PAT. Leaf segments from *in vitro* grown shoots of hybrid poplar No. 3 were soaked in a AB medium containing *Agrobacterium tumefaciens* MP 90/PAT for 10 min and cocultivated for 2 days on MS medium containing 1.0 mg/L 2,4-D and 0.2 mg/L kinetin (CIM). Putative transformed calli could be selected after cocultivation of leaf segments on CIM supplemented with 50 mg/L kanamycin and 500 mg/L cefotaxime for 3 weeks. The selected calli were cultured on CIM supplemented with 50 mg/L kanamycin and 500 mg/L cefotaxime for 5~8 weeks before transfer to WPM containing 1.0 mg/L zeatin, 0.1 mg/L BAP, 50 mg/L kanamycin and 500 mg/L cefotaxime for shoot regeneration. Shoots were regenerated from the callus after 4 week cultivation, and the regenerants were grown on the same medium for 7~10 weeks. The plants rooted on 1/2 WPM containing 0.2 mg/L IBA and 50 mg/L kanamycin. To confirm the gene insertion into plants, GUS activity was detected by histochemical assay in the transformed plants. Finally, the presence of both NPT II and PAT genes from the transgenic plants were confirmed by PCR amplification with the gene specific primers and subsequent PCR-Southern blot with DIG-labeled PAT gene probe. After acclimatization in pots for 4 weeks, the plants were sprayed by 3 mL/L of Basta to test resistance to the herbicide. The transgenic plants remained green, whereas all the control plants died after one week.

**Key words:** *Agrobacterium*, Basta, GUS, herbicide resistant plants

### 서 론

목본 식물은 일반 농작물과는 달리 긴 생장기간과 휴면 기

간을 가지며, 수체가 크고 다양한 생육 환경에서 자라는 특징을 지닌다. 더욱이 결실기까지 장기간이 소요되고, 중요 유전정보의 부족 등으로 육종에 많은 노력과 시간이 요구된다 (Confalonieri et al. 1994). 그러나, 최근에는 기존의 육종 방법에 생물 공학적 기술을 접목하여 임목을 개량하려는 시도가 많이 이루어지고 있다 (Walter et al. 1998). 그 한가지 예로는 새로운 외래 유용 유전자를 도입시켜 형질전환된 식물

\*Corresponding author. Tel 0431-261-2535

E-mail jipark@cbucc.chungbuk.ac.kr

체를 육성하여 형질개량은 물론 신품종의 창출을 기대하는 것이다 (Yang et al. 1995).

포플러류는 빠른 성장 및 높은 생물량 (Biomass)으로 인해 용재 생산, 합판재 및 펄프재로써 이상적인 수종이 되어 왔으며, 또한, 재분화 능력이 높아서 목본식물의 생물공학 연구의 모델 수종이 되어 왔다 (Chun 1994). 이미 제초제 저항성 유전자 EPSP, *bar* (De Block 1990), 내충성 유전자 *pin-2*, *Bt* 등이 잡종 포플러로 도입되어 보고된 바 있다 (Klopfenstein et al. 1991; Howe et al. 1994).

비선택성 제초제 Basta의 주성분인 phosphinothricin은 glutamate 유사물질로 glutamine synthetase (GS)의 억제제로 알려져 있다 (Kondo et al. 1973). 이 효소는 암모니아의 동화작용과 질소 대사에서 중요한 역할을 하며 이 효소의 작용이 억제되면 식물 세포에  $\text{NH}_4^+$ 가 축적되어 결국 식물 세포가 죽게 된다 (Tachibana et al. 1986). 본 실험에서 사용한 phosphinothricin acetyltransferase (PAT) 효소는 phosphinothricin을 acetylation 시킴으로써 GS에 작용을 못하게 한다. 따라서, 제초제 저항성 식물을 육성하려는 PAT 유전자의 클로닝과 형질전환 연구가 진행되어 왔으며 주로 *bar* 유전자라고 명명된 *Streptomyces hygroscopicus*에서 클로닝된 유전자를 사용하여 왔다 (De Block 1990). 최근 독일의 Hoechst 사에서는 기존의 *bar* 유전자의 GC 함량 (68.6%, White et al. 1990)을 낮추어 새로운 인공 PAT (GC 함량, 49%; NCBI Accession NO-A02774) 유전자를 합성하였다.

본 실험은 임업연구원에서 육종된 현사시 (*P. alba* × *P. glandulosa*) 3호를 재료로 제초제인 Basta에 저항성을 가진 형질전환체를 유도하고자 PAT 유전자를 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 도입, 발현 여부를 확인하며, 또한 토양에서 제초제를 직접 살포하여 형질전환체의 저항성 유무를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물 재료

기내에서 증식중인 현사시 (*P. alba* × *P. glandulosa*) 3호를 공시 재료로 사용하였다. 다경줄기는 BAP 0.2 mg/L가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에서 유도하였고, 다음 MS 기본배지에 정아 부분을 이식하여 4~8 주간 생장시킨 후 재료로 사용하였다. 이하 모든 실험은 온도  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도 약 70%로 유지되고,  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 냉백색 형광등으로 1일 16시간 조명되는 배양실에서 실시하였다.

### Kanamycin이 현사시 엽절편에 미치는 영향

캘러스 유도 배지 (CIM; callus induction medium)에

kanamycin을 0, 1, 10, 30, 50, 70, 100 mg/L로 여과처리 하였고, 엽절편을  $1 \sim 2 \text{ cm}^2$ 로 하여 20 반복으로 치상하였다. 배양 4 주 후 kanamycin 농도에 따른 엽절편의 생존, 캘러스 형성 유무를 조사하여 형질전환된 캘러스 선발을 위한 최적 농도를 결정하였다.

### 균주

제초제 저항성 유전자는 독일 Hoechst 사에서 인공 합성한 phosphinothricin acetyltransferase 유전자로 (NCBI Accession NO-A02774) NPT::GUS 선발 유전자와 함께 모두 35S-35S- AMV promoter와 Tnos에 부착되어 식물 형질 전환용 binary vector로 재조합된 것이며 캐나다 식물 유전공학 연구소 Dr. Keller로부터 분양받았다. PAT 및 선발 유전자를 함유한 binary vector는 disarmed Ti-plasmid (Hoekema et al. 1986)를 가지고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* MP/90에 들어 있으며 균주를 배양하기 위하여 kanamycin 50 mg/L와 gentamycin 50 mg/L이 첨가된 AB 고체 배지 (An 1987; A1 배지, Table 1)에 플레이팅하였다. 접종용 균주는 항생제가 첨가된 AB 액체 배지 (A2 배지, Table 1)에 24 시간 동안  $28^\circ\text{C}$ 에서 150 rpm으로 진탕 암배양하였다. 배양된 균주를 50 mL 원심분리 튜브에 25 mL씩 나누는 후 원심분리 후 침전된 균에 멸균된 0.85% NaCl 용액을 20 mL 첨가하여 현탁한 후 2~4시간 동안 재진탕 배양하여 형질전환에 사용하였다.

### 형질전환체 유도

엽절편 ( $0.6 \sim 0.8 \text{ cm}^2$ )과 *Agrobacterium* 균주를 10~15 분 동안 함께 배양한 후 멸균된 여과지로 가볍게 눌러 blotting을 하였다. 다음 캘러스 유도 공조 배지 (CIM-Co; callus induction medium-cocultivation)에서 암조건으로 2일 동안 배양한 후, 멸균된 0.85% NaCl 용액으로 절편체를 세척하고, 다시 blotting한 다음 캘러스 선발 배지 (CIM-Km; callus induction medium-kanamycin)와 줄기 유도 선발 배지 (SIM-Km; shoot induction medium-kanamycin)로 옮겨 광조건하에서 배양하였다. 선발 배지에서 유도된 캘러스를 재분화 선발 배지 (REG-Km; regeneration medium-kanamycin)로 옮겨 형질전환 식물체의 재분화를 유도하였고, 6~8 주 후 재분화된 줄기는 발근 선발 배지 (R-Km; rooting-kanamycin)에 치상하였다. 발근된 형질전환체는 4 주 동안 순화시킨 후 포트묘로 육성하였다.

### GUS 반응 검정

GUS 활성 반응은 염색액 (1M  $\text{NaPO}_4$  buffer, pH 7.0, 62.5  $\mu\text{L}$ ; 0.25 M EDTA, pH 7.0, 25  $\mu\text{L}$ ; 0.005 M K-Ferricyanide,

**Table 1.** Various media used for transformation of *P. alba* × *P. glandulosa* No. 3 in the present experiments.

Culture steps	Media	Medium components	Culture periods	Culture vessels
Plant material culture	P	MS medium with 0.8% Gum-agar	28~42 days	5 × 11 cm vial
<i>Agrobacterium</i> culture	A1	AB medium with 50 mg/L kanamycin and 50 mg/L gentamycin, 0.8% Gum-agar	7~10 days	87 × 15 mm petri dish
	A2	A1 liquid medium	1~2 days	100 mL flask
Callus induction	CIM	MS medium with 1.0 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L kinetin, 0.8% Gum-agar	7~10 days	87 × 15 mm petri dish
Adventitious bud induction	SIM	WPM (Lloyd and McCown 1981) with 1.0 mg/L zeatin, 0.8% Gum-agar	21~30 days	87 × 15 mm petri dish
Co-cultivation	CIM-Co SIM-Co	CIM or SIM with acetosyringone 100 μM	2 days	87 × 15 mm petri dish
Selection	CIM-Km SIM-Km	CIM or SIM with 50 mg/L kanamycin, 500 mg/L cefotaxime	45~60 days 1 week culture interval	87 × 15 mm petri dish
Regeneration	REG-Km	WPM with 1.0 mg/L zeatin, 0.1 mg/L BAP, 50 mg/L kanamycin, 500 mg/L cefotaxime	55~70 days 1~2 weeks culture interval	87 × 15 mm petri dish, 5 × 11 cm vial
Rooting	R-Km	1/2 WPM with 0.2 mg/L IBA, 50 mg/L kanamycin	7~14 days	5 × 11 cm vial

62.5 μL: 0.005 M K-Ferrocyanide, 62.5 μL: 0.02 M X-Gluc, 62.5 μL: Distilled water 350 μL)을 이용한 Jefferson 등 (1987)의 방법을 변형하여 실시하였다.

#### 형질전환체의 특성검정

잠정적인 형질전환체의 PAT 유전자의 존재 여부를 확인하기 위해 PCR (Perkin Elmer Cetus, Fotodyne Incorporated)을 사용하였다. DNA는 Edwards 등 (1991)의 방법으로 추출하였으며, PCR 반응 조건은 96°C에서 2분간 pre-denaturation한 후, 96°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 2분으로 하여 36 cycle을 반응시킨 다음 72°C에서 15분간 post-extension시켰다. Primer는 NPTII 유전자 (500bp)의 증폭을 위하여 5'-GTGGAGAGGCTATTCGGCTA-3'와 5'-CCACCA-TGATATTCGGCAAG-3'을 사용하였고, PAT 유전자 (356bp)의 증폭을 위해서는 5'-AGGACA-GAGCC-ACAAACACC-3'와 5'-ATGCTTGTATCCAGCTGCG-3'을 사용하였다.

합성된 DNA 밴드는 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 크기를 확인하였다. PCR 산물은 전기영동된 겔을 nylon membrane (Turboblotter, Schleicher and Schuell)에 blot시키고, DIG labeling (DIG-DNA labeling and detection kit, Boehringer Mannheim)된 PAT probe를 사용하여

hybridization을 수행하였다.

#### 제조제 처리

순화된 형질전환체에 Basta 액제 [(주)경농]를 일반 농가에서 실제로 사용하는 농도인 3 mL/L로 조제하여 살포하고, 5일, 7일 및 10일 후의 제조제 약해 여부를 조사하였다.

#### 결과 및 고찰

##### Kanamycin이 현사시 엽절편의 생장에 미치는 영향

정상적인 현사시 엽절편의 kanamycin에 대한 선발 농도는 10 mg/L까지는 캘러스가 정상적으로 형성되었고, 30 mg/L부터는 전혀 캘러스 형성이 없었다. 이 결과로 형질전환 캘러스 선발을 위한 kanamycin 처리 최소농도는 30 mg/L면 충분하다고 생각되었고, 보다 안정적인 형질전환체의 선발을 위해 kanamycin 50 mg/L 농도를 선발 농도로 정하였다.

Tsai 등 (1994)은 *Populus tremuloides*의 형질전환에서 캘러스 선발 단계에서는 kanamycin 40 mg/L을, 줄기 유도 및 발근 단계에서는 kanamycin 100 mg/L을 사용한 바 있다.

**Table 2.** Effect of kanamycin on the inhibition of callus formation using leaf segments.

Kanamycin Conc. (mg/L)	No. of segments cultured	Callus formation (%)
0	20	100
10	20	100
30	20	0
50	20	0
70	20	0
100	20	0

### 형질전환 캘러스 유도 및 증식

*Agrobacterium*과 공조 배양한 후 50 mg/L kanamycin이 처리된 선발 배지에 배양한 결과, 배양 3 주 후 형질전환되어 kanamycin에 대해 저항성을 지니는 것으로 추정되는 캘러스가 엽절편으로부터 작고 동그랗게 유도되었다 (Figure 1A). 캘러스는 주맥과 엽맥 부위에서 주로 형성되었고, 일단 캘러스가 형성되면 생장이 빠르게 진행되었다. 캘러스는 대부분 절편의 상부로 형성되었으나 일부는 배지와 접촉되는 곳에서도 형성되었으며, 캘러스에 따라서는 흰색의 솜털 뿌리도 형성되었다. 캘러스는 배양 7 주 후에도 형성되었으나 캘러스가 형성되지 않은 절편체들은 유리화되거나 백화되며 고사하였다.

여러 형질전환 방법 중에서 *Agrobacterium*의 이용은 매우 안정적으로 외래 유전자를 식물체로 도입시키는 장점을 지닌다. 따라서, 식물 유전공학에서 운반체 *Agrobacterium*의 역할과 기능은 매우 중요한 부분을 차지하고 있으며, *Agrobacterium* 염색체내의 *chvA*, *chvB*, *pscA* 지역의 역할, Ti-plasmid 내의 병원성 부위와 식물 세포의 상처 부위에서 생성되는 페놀 화합물의 상호 작용에 의해 T-DNA가 식물 세포내로 전이되는 기작 등이 상당히 밝혀지고 있고, 이를 토대로 인위적인 형질전환율을 높일 수 있게 되었다 (James et al. 1993).

식물 페놀성 화합 물질 중 acetosyringone (AS)은 *Agrobacterium* Ti-plasmid내의 *vir* (virulence) 유전자 부위를 특이적으로 활성화시켜 T-DNA의 이탈과 T-DNA가 식물체 게놈 안으로 전이하는데 중요한 역할을 한다 (Lipp Joao and Brown 1993). 본 실험에서 acetosyringone 100  $\mu$ M를 처리하여 형질전환하였을 때 대조구보다 형질전환 효율이 크게 높아지는 것으로 나타났다. 배양 8 주 후 캘러스의 유도율은 acetosyringone 처리로 80% 이상인 반면, 무처리시는 40% 미만이었다 (결과 미제시). 이와 유사한 결과로, Nishibayashi 등 (1996)은 오이의 하배축을 이용한 형질전환에서 acetosyringone을 첨가한 경우 형질전환된 캘러스의 빈도를 높일 수 있었으며, 형질전환 유무를 GUS activity로 확인할 수 있었다. 이같은 결과들은 AS 처리가 형질전환 효율

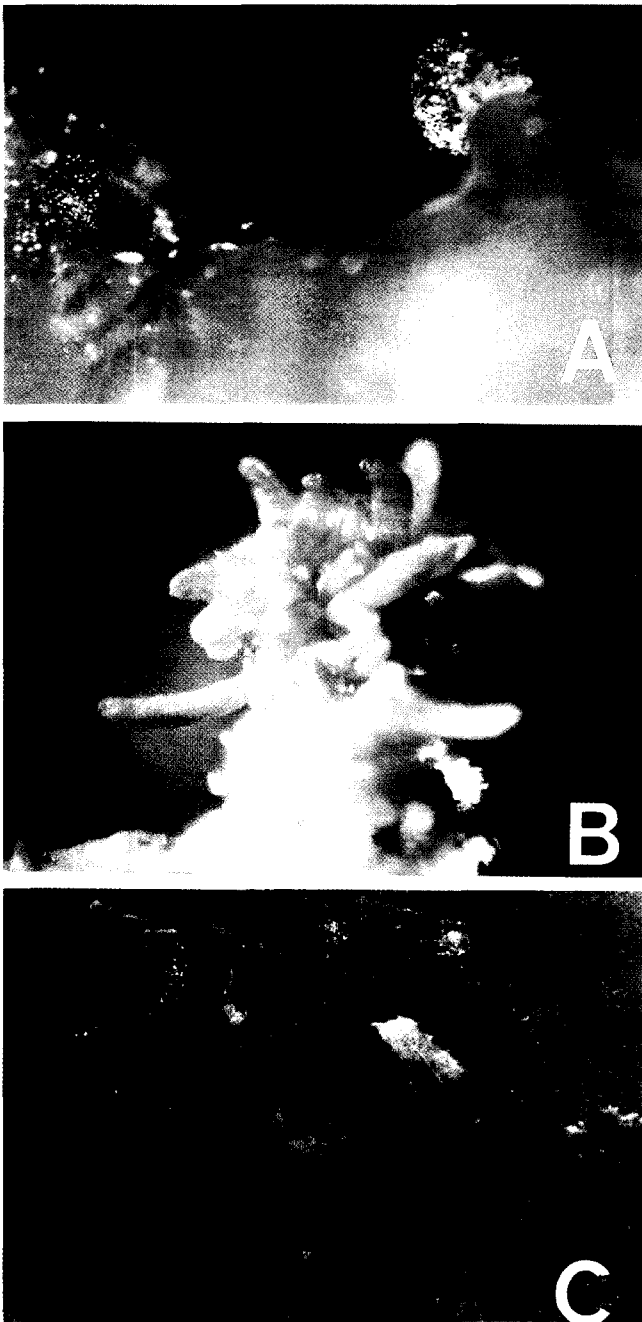
을 높이는 중요한 한 요인임을 시사해 준다.

### 식물체의 유도

CIM-Km 배지에서 4~6 주 간 캘러스를 성장시킨 후 줄기 유도 배지로 계대하였다. 계대배양 후 일부 캘러스는 생장이 멈추고 갈변화되며 고사되었다. 그러나, 대부분 캘러스는 REG-Km 배지로 옮긴지 20일 후부터 부정아가 유도되었다. 배양 4 주 후에는 부정아가 모두 줄기로 성장하였고 새로운 줄기 발생을 계속하였다 (Figure 1B). 배양 6 주 후에는 거의 모든 캘러스에서 줄기가 유도되어 다경 줄기로 자랐고, 일부 캘러스에서는 회고 긴 부정근도 형성되었다. 증식된 줄기 (10-20 mm 길이)는 분리하여 동일한 선발 배지로 계대하고 일부는 발근 유도하였다. 발근은 R-Km 배지에서 1 주 후 가능하였으며, 2 주 후에는 90% 이상 발근되었다 (Figure 1C). 그러나, 극히 일부 식물체들은 엽조직이 갈변화되고, 발근도 이루어지지 않았다. *Agrobacterium*을 이용한 양버들 (Kim et al. 1995)과 사과나무 (James et al. 1989)의 형질전환에서도 이와 비슷한 현상이 관찰되었는데, 양버들에서는 일부 형질전환체의 갈변과 발근 억제를 보고하면서 이 현상은 kanamycin에 의한 뿌리 원기 유도의 저해라고 추정했으며, 사과나무 형질전환체의 발근 유도에서도 kanamycin 처리가 발근을 억제하였다고 보고한 바 있다. 또한, 캘러스로부터 재분화된 식물체가 모수의 식물체보다 발근율이 낮았다는 결과와 비형질전환체와 형질전환체간의 유사한 발근율을 보여 재분화된 형질전환체의 kanamycin 처리시 발근 억제는 형질전환 여부와 관련이 없을 수도 있다고 한 바, 형질전환체 선발 과정에서 발근 유무로 형질전환체를 선정하는 것은 불확실하다는 것을 제시하였다. 그러나, Tsai 등 (1994)은 *P. tremuloides*의 형질전환에서 발근 단계일 때 고농도 kanamycin의 처리는 형질전환체 선발에 효과적이라하여 수종에 따라 많은 차이가 있음을 시사하였다.

### 형질전환체의 특성검정

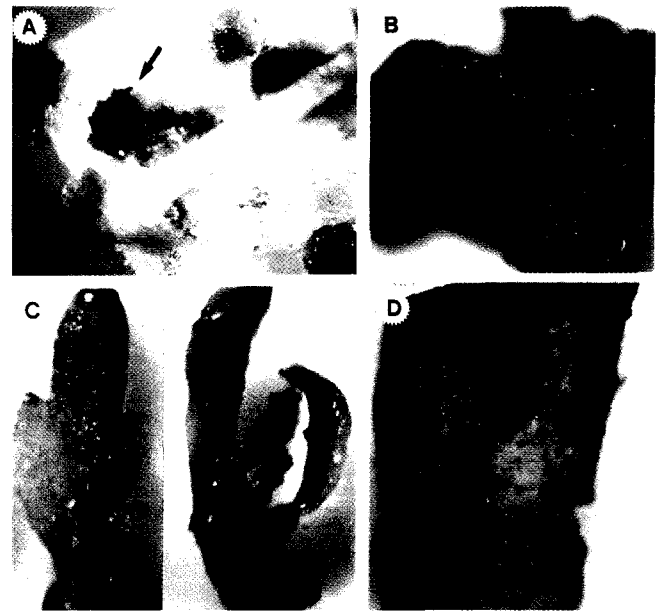
GUS 활성 반응은 분석이 빠르고 용이하여 유전자의 발현 위치와 정도를 쉽게 확인할 수 있어 외래 유전자 도입의 검정을 위한 선발 단계로 이용할 수 있다 (Jefferson et al. 1987). 본 실험에는 REG-Km 배지에서 10일간 배양한 캘러스로 GUS 염색시킨 결과, 양성 반응을 나타내어 이 유전자가 정상적으로 세포내에 삽입되었음을 보여주었다 (Figure 2A, B). 한편, REG-Km 배지에서 6 주 배양된 형질전환 줄기와 10~12 주 배양된 성숙한 형질전환체의 엽조직의 GUS 분석 결과 양성 반응을 보여 GUS 유전자가 현상시도 도입된 것을 가시적으로 확인할 수 있었다 (Figure 2C, D). Tsai 등 (1994)도 histochemical assay를 이용하여 형질전환된 *P. tremuloides*의 잎, 줄기, 뿌리 조직의 GUS 반응으로 도입된 유전자



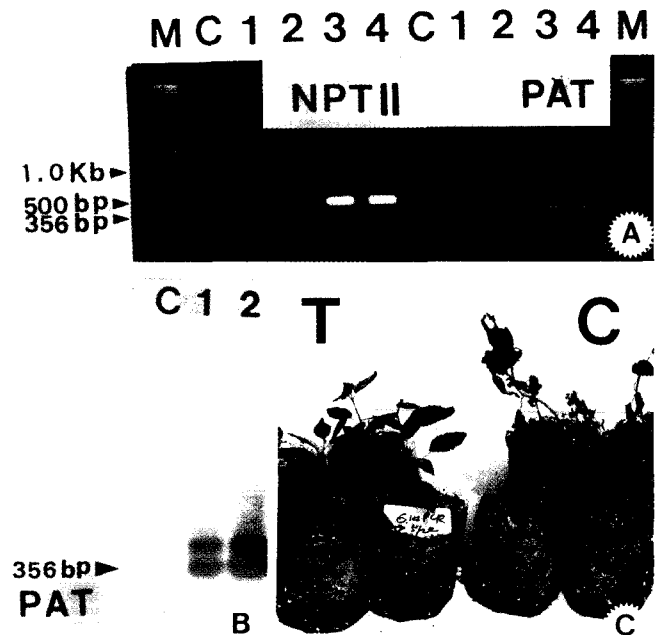
**Figure 1.** Transformation and regeneration of hybrid poplar, *P. alba* × *P. glandulosa* No. 3 by *Agrobacterium tumefaciens* MP90/PAT. (A) Transgenic callus (arrow) with PAT gene induced from leaf tissue on the selective medium containing 50 mg/L kanamycin after 3 weeks culture; (B) Regenerated shoot from the putative transformed callus cultured on REG-KM for 4 weeks; (C) Transgenic plants of *P. alba* × *P. glandulosa* No. 3 with root system.

의 발현을 가지적으로 확인할 수 있었음을 보고했다.

한편, 형질전환된 현사시로부터 NPTII 유전자와 PAT 유전자의 존재 여부를 PCR 기법으로 확인한 결과, 형질전환체에서는 NPTII (500 bp) 유전자와 PAT (356 bp) 유전자를 확인할 수 있었으나 정상식물체에서는 전혀 NPTII 유전자나 PAT 유전자가 나타나지 않았다 (Figure 3A).



**Figure 2.** Histochemical assay for GUS activity of transgenic hybrid poplar, *P. alba* × *P. glandulosa* No. 3. (A) Transgenic callus showing positive GUS activity derived from leaf explant; (B) Whole transgenic callus grown on selective medium; (C) Regenerated shoot from transgenic callus; D; GUS positive leaf.



**Figure 3.** Analysis of NPT II and PAT genes by PCR (A), PCR Southern blot (B) and bioassay with 3 mL/L basta (C). (A) Agarose gel electrophoresis of PCR amplification product of control (lane C), untransgenic plants (lane 1, 2) and transgenic plants (lane 3, 4); (B) Southern blot analysis of PCR products from control (C) and transgenic plants (lane 1, 2). The amplified DNAs were hybridized with PAT probe; (C) Test of transgenic plants by spraying Basta from control (right) and transgenic plants (T).

또한, PCR에 의해 확인된 형질전환체로부터 DNA를 추출하고 PCR을 수행하여 얻어진 PCR 산물을 nylon membrane

으로 전이시키고 DIG를 사용하여 labeling된 PAT 유전자의 probe와 membrane을 hybridization하여 Southern blot 분석을 실시한 결과 동일한 위치에서 band를 확인할 수 있었다 (Figure 3B). 따라서, 형질전환체 현사시의 게놈 안으로 PAT 유전자가 안정적으로 도입되어 있음을 암시한다.

마지막으로 현사시에 도입된 PAT 유전자가 정상적으로 발현되어 제초제에 내성을 나타내는지의 여부는 Basta 액제 [(주)경농]를 3 mL/L 농도로 살포하여 조사하였다. 살포 후 하루만에 대조구 식물체에서는 제초제 약효가 나타나 잎이 검게 괴저되기 시작했다. 5일 후에는 대조구 식물체들은 약해가 더욱 심해지고 7일 후에는 하단부 잎까지 완전히 검게 고사되었고, 10일 후에는 줄기외의 모든 조직이 검게 고사되었다 (Figure 3C-C). 반면, 형질전환체들은 전혀 약해를 받지 않고 모두 정상적으로 생육하였다 (Figure 3C-T). 이와 비슷한 연구로 Choi 등 (1996)은 감자 형질전환체에 제초제를 살포하여 하루만에 잎의 괴저현상을 관찰하였고, 1 주 후 모든 대조구가 고사된 반면, 형질전환체는 정상적으로 생육하여 본 실험과 유사한 결과를 보여주었다. 한편, 제초제 저항성 유전자를 이용한 잡종 포플러의 형질전환에서 De Block (1990)은 *bar* 유전자가 도입된 형질전환체에 Basta 20 L/ha 농도로 살포하여 생육 반응 및 유전자 발현을 시험하였다. 제초제 살포 2 주 후 형질전환체만이 생존했으며, 살포 24 시간 후 식물체의  $\text{NH}_4^+$  축적을 조사한 바, 대조구 식물체의  $\text{NH}_4^+$  양이 형질전환체 보다 약 100 배 정도 많았다고 했으며, 형질전환체의  $\text{NH}_4^+$  양은 제초제를 살포하지 않은 정상 식물체와 같은 수준이었음을 보고한 바 있다. 이것은 제초제 살포시 형질전환체의 PAT 효소가 생산되어 GS 활성을 정상적으로 작용시켰음을 의미한다.

이상의 결과로 PAT 유전자로 현사시를 형질전환 시켜 제초제 내성을 지닌 새로운 형질전환체의 개발이 가능하였으며, 앞으로 야의 시험으로 제초제 내성 현사시의 생육 특성을 계속 관찰할 예정이다.

## 적 요

우리나라의 주요 개량 포플러의 하나인 현사시 3호를 대상으로 *Agrobacterium tumefaciens* MP 90/PAT을 이용하여 비선택성 제초제인 Basta에 내성을 갖는 형질전환체를 획득하고자 본 실험을 수행하였다. 기내 배양된 엽절편을 재료로 균주에 10분간 감염, 2일간 공조 배양 및 3 주간 선발배지에서 배양으로 kanamycin에 내성을 갖는 잠정적인 형질전환 캘러스를 유도하였다. 선발된 캘러스로부터 배양 4 주 후 줄기를 유도하였으며, 증식된 줄기는 발근시켜 완전한 형질전환체를 얻었다. 형질전환체는 PCR 기법 및 Southern blot 분석으로 PAT 유전자 전이를 확인하고, 유전자의 발현은 GUS 유전자의 발색 반응으로 확인하였다. 형질전환체는 풋트로 이식

하여 4 주간 생장시킨 후 제초제 Basta로 살포한 결과 대조구 식물체는 고사되었으나, 형질전환체는 정상적인 생육이 가능하였다.

## 인용문헌

- An G (1987) Binary Ti vector for the plant transformation and promoter analysis. *Methods in Enzymol* 153:292-305
- Choi KH, Jeon JH, Kim HS, Joung YH, Cho SJ, Lim YP, Joung H (1996) Development of herbicide-resistant transgenic potato. *Kor J Plant Tiss Cult* 23:161-165
- Chun YW (1994) Application of *Agrobacterium* Vector Systems for Transformation in *Populus* Species. Conservation and Manipulation of Genetic Resources in Forestry. Kwang Moon Kag Pub, Seoul, pp 206-218
- Confalonieri M, Balestrazzi A, Bisoffi S (1994) Genetic transformation of *Populus nigra* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 13:256-261
- De Block M (1990) Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. *Plant Physiol* 93:1110-1116
- Edwards K, Johnson C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19:1349
- Hoekema A, Van Haaren MJJ, Felinger AJ, Hooykaas PJJ, Schiperoort RA (1986) Non-oncogenic plant vectors for use in the *Agrobacterium* binary vector system. *Plant Mol Biol* 5:85-89
- Howe GT, Goldfarb B, Strauss SH (1994) *Agrobacterium*-mediated transformation of hybrid poplar suspension cultures and regeneration of transformed plants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 36:59-71
- James DJ, Passey AJ, Barbara DJ, Bevan M (1989) Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti binary vector. *Plant Cell Rep* 7:658-661
- James DJ, Uratsu S, Cheng J, Negri P, Viss P, Dandekar AM (1993) Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. *Plant Cell Rep* 12:559-563
- Jefferson RA, Kavanagh A, Bevan MW (1987) GUS fusions :  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901-3907
- Kim YW, Noh EW, Youn Y, Noh ER (1995) Genetic Transformation of *Populus nigra* using *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404/pBKS-1. *Res Rep For Gen Res Inst* 31:160-166
- Klopfenstein NB, Shi NQ, Keman AR, McNabb HS, Hall RB, Hart ER, Thornburg RW (1991) A transgenic *Populus* hybrid expresses a wound-inducible potato proteinase inhibitor II-CAT gene fusion. *Can J For Res* 21:1321-1328
- Kondo T, Shomura T, Ogawa Y, Watanabe H, Totsukawa K,

- Suzuki T, Moriyama C, Toshida J, Inouye S, Niidat** (1973) Studies on a new antibiotic SF-1293. Isolation and physico-chemical and biological characterization of SF-1293 substance. *Sci Rep Meiji Seika Kaisha* **13**:34-41
- Lipp Joao KH, Brown TA** (1993) Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif<sup>r</sup>::pGSFR1161 in the presence of acetosyringone. *Plant Cell Rep* **12**:422-425
- Lloyd G, McCown B** (1981) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Proc Intl Plant Prop Soc* **30**:421-427
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Nishibayashi S, Kaneko H, Hayakawa T** (1996) Transformation of cucumber plants using *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration from hypocotyl explants. *Plant Cell Rep* **15**: 809-814
- Tachibana K, Watanabe T, Sekizawa Y, Takematsu T** (1986) Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. *J Pesticide Sci* **11**:33-37
- Tsai CJ, Podila GK, Chiang VL** (1994) *Agrobacterium*-mediated transformation of quaking aspen and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep* **14**:94-97
- Walter C, Grace LJ, Wagner A, White DWR, Walden AR, Donaldson SS, Hinton H, Gardner RC, Smith DR** (1998) Stable transformation and regeneration of transgenic plants of *Pinus radiata* D. Don. *Plant Cell Rep* **17**:460-468
- White J, Chang SY, Biv MJ** (1990) A cassette containing the *bar* gene of *Streptomyces hygroscopicus*: a selectable marker for plant transformation. *Nucleic Acids Res* **18**:1062-1065
- Yang DC, Park JC, Choi KT, Lee JM** (1995) Expression of Mouse Adenosine Deaminase Gene in Transgenic Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Kor J Plant Tiss Cult* **22**:195-200

(접수일자 1999년 3월 18일)