

Agrobacterium 농도가 사과 형질전환 효율에 미치는 영향

성은수, 차지은, 김정희, 박성환¹, 유창연², 송관정^{3*}

농촌진흥청 원예연구소, ¹동아대학교 생명자원과학부, ²강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부, ³제주대학교 원예생명과학부

The Effect of *Agrobacterium* Density on Transformation Efficiency in Apple

Eun-Soo Seong, Ji-Eun Cha, Seong-Whan Park¹, Chang-Yeon Yu², Kwan-Jeong Song^{3*}

National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon 440-706, Korea

¹Faculty of National Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

²College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

³Faculty of Horticultural Life Sciences, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

ABSTRACT This study was conducted to find optimum bacterial density for improving the efficiency of transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in apples. Regeneration (15%) and transformation frequency (10%) were increased in resuspension-culture density A_{600} 1.3 from preculture density A_{600} 0.7 of *Agrobacterium tumefaciens* in 'Fuji'. In 'Gala', 20% regeneration and 16% transformation frequency were observed at optimum bacterial density A_{600} 0.7 from preculture density A_{600} 1.3. 'McIntosh as well as "Gala" were 25% regeneration and 10% transformation frequency. Hence a frequency optimum condition of bacterial density for the efficient transformation of apple could be depend on apple genotypes .

Key words: Bacterial density, absorbance, regeneration frequency, transformation frequency

서 론

목본류는 특이한 특성을 지니고 있기 때문에 전통 육종법으로는 시간과 노동력이 많이 들어서 좋은 형질을 도입하기가 어렵다. 이런 이유 때문에 유전공학기법을 이용한 목본류의 형질전환 시스템은 육종에 있어서 좋은 도구로 여겨져 왔다. *Agrobacterium*을 이용한 사과 형질전환 기법은 1988년 James가 최초로 연구하면서 전세계적으로 수행되어져 왔다. 하지만 사과 형질전환의 성공 사례는 'Golden Delicious', 'Green sleeves', 'Royal Gala'의 품종에 대해서만 보고되었다 (James et al. 1993; Puite and Schaart 1996; Bolar et al. 1999).

이들 품종 외에도 사과의 *Agrobacterium*에 의한 형질전환에 영향을 미치는 요인들에 대한 다수의 연구사례가 있으나 (Bondt et al. 1994; Bolar et al. 1999), 낮은 형질전환율이 문제

점으로 지적되고 있다 (James and Dandekar 1991). Welander (1988)와 Defour (1990)는 한 절편체에서 평균적으로 10개의 재분화개체를 얻어도 실제로 형질전환체를 하나도 못 얻는 경우가 많다고 했다. 그러므로 사과의 형질전환율을 향상시키기 위해서는 유전자 전이의 초기 단계에서 영향을 미치는 요인들을 연구하여 최적화 하는 것이 급선무이다.

다양한 요인 중에서 식물체로의 유전자 도입에 매개가 되는 *Agrobacterium*의 농도가 중요한 하나의 요인으로, Pinus, 콩, 차나무, 벼 등에서 연구되었다 (Mondal et al. 2001; Kumria et al. 2001; Humara et al. 1999). 그러나 목본식물의 형질전환 실험에서는 적절한 박테리아 농도 구명에 관한 자세한 보고는 없다.

따라서 본 연구는 외래 유전자가 사과 품종으로 전이되는 과정에서 박테리아 농도의 최적화에 관한 연구로 균의 전처리 배양 농도와 균과 식물체의 최종 접종 농도 사이의 상관관계가 사과 품종별 형질전환에 미치는 영향을 조사하였다.

*Corresponding author Tel 033-250-6411 Fax 033-244-6410
E-mail cyyu@kangwon.ac.kr

재료 및 방법

식물재료 및 조직배양

사과 품종 ‘후지’와 ‘메킨토시’는 증식배지 (1/2 MS salts with vitamin +0.3 mg/L IBA +15 g/L sucrose +8 g/L plant agar, pH 5.8)에서 4주간 유지, 증식시킨 후 발근배지 (1/2 MS salts with vitamin +0.3 mg/L IBA +15 g/L sucrose +8 g/L plant agar, pH 5.8)로 계대배양한 후 발생한 유엽을 실험에 이용하였다. ‘갈라’는 잎신장배지 (1/2 MS salts with vitamin +0.1 mg/L NAA +8.3 mg/L 2ip +15 g/L sucrose +8 g/L plant agar, pH 5.8)에서 4주간 증식시킨 후 ‘후지’, ‘메킨토시’와 마찬가지로 유엽을 이용하였다. 실험에 이용한 모든 식물은 26±2°C의 배양실에서 16시간의 일장에서 광주조건으로 배양하였다.

*Agrobacterium*의 배양과 접종 농도의 결정

외부 유전자를 사과 게놈내로 도입하기 위하여 binary vector pSK114를 지닌 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404를 이 실험에 이용하였다 (Figure 1). 이 박테리의 T-DNA 내부에는 선발표지로서 항생제 저항성 유전자인 *nptII*와 ‘후지’로부터 클로닝한 안토시아닌 합성에 관련된 *MdANS* 유전자를 포함하고 있다. 박테리아는 항생제를 첨가한 YEB 액체 배지 (13.3 g/L Nutrient broth +1.0 g/L Yeast extract +5 g/L sucrose +0.24 g/L MgSO₄ +10 mg/L kanamycin +3 mg/L tetracycline)에 접종하여 28°C, 220 rpm 조건으로 A₆₀₀ 0.7~1.3이 될 때까지 약 21시간 동안 배양하였다. 배양된 박테리아는 4,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리하여 모은 박테리아는 병원성 유도배지 (5.88 g/L citric acid +20 g/L sucrose, pH 5.2)로 희석하여 결정한 최종 접종 농도를 측정하였다. 접종하기 위한 박테리아 현탁액에는 1 mM proline과 200 μM acetosyringone을 첨가하여 22°C, 150 rpm에서 최소 4시간 이상 배양하여 virulence induction을 강화한 후 접종에 이용하였다.

식물체 재분화와 형질전환

Agrobacterium 접종액에는 모든 사과 품종의 유엽이 사용되

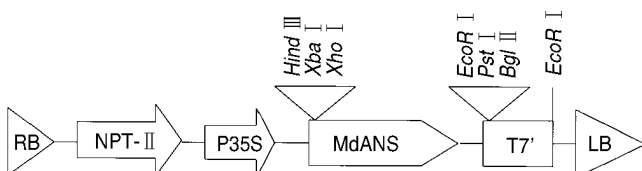


Figure 1. Schematic representation of the T-DNA of the binary vector pSK114. Abbreviations: RB and LB, right and left border sequences; NPT-II, coding region for the neomycin phosphotransferase; p35S, 35S promoter of CaMV; MdANS, coding region for the ANS gene of apple; T7', termination signal of gene7 pTiA6.

었다. 접종한 잎은 멸균된 킴와이프스에서 건조시키고 공동배양배지 (MS salts with vitamins +5 mg/L TDZ +0.3 mg/L IBA +30 g/L sucrose +200 μM acetosyringone)로 옮겼다. 25°C 압상 상태에서 3일간 공동배양한 후 잎절편체를 선발배지 (MS salts with vitamins +5 mg/L TDZ +0.3 mg/L IBA +30 g/L sucrose +350 mg/L cefotaxime +100 mg/L kanamycin, pH 5.8)로 계대배양한 후 25°C 압상 상태에서 4주간 배양하였다. 배양한 지 4주 후 IBA가 없는 새로운 2차 선발배지로 옮겨서 4주간 배양하였다. 재분화된 개체는 항생제가 없는 신초 증식배지에서 증식시킨 후 형질전환체의 1차 선발을 위해 30 mg/L kanamycin이 첨가된 발근배지로 옮겨 배양하였다. 1차 선발된 형질전환체는 포트에 이식하여 온실에 순화하였다.

PCR 검정 및 southern hybridization

1차 선발된 형질전환체의 *nptII*와 *MdANS*의 사과 형질전환체의 삽입확인을 위해 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACT-3'와 5'-AATCTCGTGATGGCAGGTTG-3'; 5'-AGTTGAAGAAGGCAGCTGTG-3'와 5'-AACTTGTGCTGAATGTGCTC-3'의 primer를 조합하여 PCR로 확인 후 Dig high prime DNA labeling and detection starter kit II (Roche)를 이용하여 southern blot으로 반복 확인하였다.

결과 및 고찰

*Agrobacterium*을 이용한 사과의 형질전환 효율에 영향을 미치는 요인 중 박테리아 농도를 조사한 바 (Figure 2), 사과 품종별로 다음과 같은 차이를 나타냈다. ‘후지’의 경우, 균의 전처리 배양 농도 A₆₀₀ 0.7에서 1.3으로 희석하여 최종 접종 농도를 A₆₀₀ 1.3으로 맞춘 조건에서 재분화율이 15%로 가장 높게 나타났다. 균의 전처리 배양 농도 A₆₀₀ 0.7, 1.0, 1.3의 상호 처리간 재분화율 차이는 A₆₀₀ 0.7 조건에서 재분화율은 5~15%로 나타났기 때문에, 전처리 배양 농도 A₆₀₀ 1.0과 A₆₀₀ 1.3 조건에서 3~7%로 보여진 것과 비교해 볼 때 훨씬 양호한 결과이다. 이를 근거로 ‘후지’의 효율적인 재분화 처리를 위한 최적의 *Agrobacterium* 전처리 배양 농도는 A₆₀₀ 0.7이라 할 수 있다. 또한 형질전환율은 균의 전처리 배양 농도 A₆₀₀ 0.7을 최종 접종 농도 A₆₀₀ 1.3으로 맞춰 실험한 조건에서 10%로 나타나 ‘후지’ 품종에서 최적의 형질전환율을 나타내었다. 균의 전처리 배양 농도 A₆₀₀ 0.7과 OD_{600nm} 1.0을 최종 접종 농도 A₆₀₀ 1.0과 A₆₀₀ 0.7로 맞춘 조건에서 3% 정도의 형질전환율을 나타냈으나 형질전환체를 얻지 못한 다른 박테리아 농도의 조건들과 통계상 유의차가 없는 수치이므로 ‘후지’ 형질전환을 위한 최적의 적정 농도는 전처리 배양 농도 A₆₀₀ 0.7, 최종 접종 농도 A₆₀₀ 1.3으로 보여졌다.

‘갈라’의 경우, 균의 전처리 배양 농도 A₆₀₀ 1.3을 희석하여

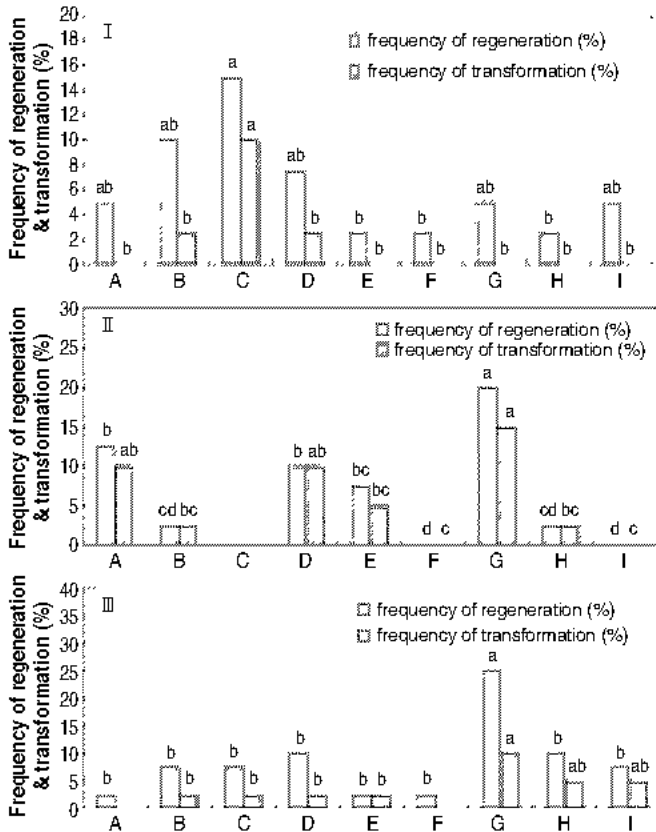


Figure 2. Effect of *Agrobacterium* LBA 4404 density on regeneration and transformation in 'Fuji' (I), 'Gala' (II), 'McIntosh Wijkik' (III). A-C: When culture density of bacterial cell was A_{600} of 0.7, pellets by centrifuge were diluted. And then inoculation density of *Agrobacterium* was adjusted to A_{600} of 0.7, 1.0, 1.3. D-F: When culture density of bacterial cell was A_{600} of 1.0, pellets by centrifuge were diluted. And then inoculation density of *Agrobacterium* was adjusted to A_{600} of 0.7, 1.0, 1.3. G-I: When culture density of bacterial cell was A_{600} of 1.3, pellets by centrifuge were diluted. And then inoculation density of *Agrobacterium* was adjusted to A_{600} of 0.7, 1.0, 1.3. Mean values of 3 replicates of 20 explants each. Means followed by different letters (a, b, c, d) are significantly different by Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$).

최종 농도를 A_{600} 0.7로 맞춰 실험한 결과 재분화율이 20%, 형질전환율이 16%로 나타났다. 그리고 균의 전처리 배양 농도 A_{600} 0.7과 A_{600} 1.0에서 최종 농도 A_{600} 0.7로 각각 맞춰 실험한 조건에서는 재분화율이 각각 12.5%와 10%를 보였고, 형질전환율은 10%로 같게 나타났다. 하지만, 균의 전처리 배양 농도 A_{600} 0.7, 1.0, 1.3 각각에서 최종 농도를 A_{600} 1.3으로 맞춰 접종한 조건에서는 재분화 개체를 획득할 수가 없었다. 따라서 '갈라' 품종의 경우 박테리아 최종 농도를 A_{600} 1.3 이상으로 맞추는 것은 재분화율과 형질전환율에 악영향을 미치는 것으로 판단된다.

'메킨토시'의 경우, '갈라'와 마찬가지로 균의 전처리 배양 농도 A_{600} 1.3을 희석하여 최종 농도를 A_{600} 0.7로 맞춰 실험한 결과 재분화율이 25%로 나타났다. 하지만 최종 접종 농도는 A_{600} 1.0 이상으로 갈수록 재분화율은 10% 이하로 급격하게 감소되었다. 형질전환율은 재분화율이 가장 높게 나타났던 조

건에서 10%로 역시 높은 형질전환율을 보여 주었으나, 최종 접종 농도 A_{600} 1.0과 A_{600} 1.3에서 5%의 형질전환율을 나타내어 수치상 유의차는 없는 것으로 보인다. 따라서 '메킨토시'의 형질전환에서는 박테리아 농도는 적정 조건이 균의 전처리 배양 농도가 A_{600} 1.3 이상이 적합한 것으로 사료된다.

A_{600} 값의 증가와 감소는 형질전환효율에 많은 영향을 미친다 (Mondal et al. 2001). 차나무의 형질전환에서는 0.8보다 A_{600} 값이 높으면 형질전환에 적당하지 않고 A_{600} 값이 1.0 이상되면 박테리아의 지나친 생장으로 인해 식물조직에 피해를 입힐 수 있다고 보고하였다. *Citrus*의 형질전환에서는 박테리아의 지나친 생장으로 인해 재분화율이 저하될 수 있고, 공동 배양 시 박테리아의 과다 생장을 억제하기 어렵다고 한다 (Pena et al. 1995). Almond의 형질전환에서 효율을 높이기 위해서는 A_{600} 값을 0.6으로 맞춰야 가장 효과적이라고 알려져 있다 (Archilletti et al. 1995). 그러나 사과의 경우에는 이러한 박테리아 농도에 따른 형질전환 효율에 관한 보고가 없다. 본 연구의 나온 결과로 볼 때 '갈라'와 '메킨토시'의 경우 식물체와의 최종 접종 농도를 A_{600} 0.7로 맞춰 실험했을 때, 재분화율과 형질전환율이 가장 높게 나타났다. 같은 식물 종간 박테리아 농도가 미치는 영향이 현저히 다른 것을 알 수 있다. 형질전환 효율에 관한 연구로, *Citrus*의 최대한으로 높은 효율로 형질전환되는 박테리아 농도는 4×10^7 cells/ml인 반면에 hybrid poplars는 10^7 cfu/ml이다 (Howe et al. 1994). 이렇듯 식물종간 형질전환을 위한 이상적인 박테리아 농도는 아주 다양하다. Poplar의 경우 형질전환율은 *Agrobacterium* strain과 genotype에 따라 크게 달라진다. 본 실험에서도 '후지'는 '메킨토시', '갈라'와는 다르게 균의 전처리 배양 농도 A_{600} 0.7을 희석하여 최종 농도를 A_{600} 1.3으로 맞춘 조건에서 재분화율 (15%)과 형질전환율 (10%)이 가장 최고치를 나타내었다. 이는 박테리아 농도만이라도 적정하게 맞추면 박테리아와 식물절편체의 상호작용으로 인하여 '후지'의 형질전환율이 높아질 수 있다는 예로 보여진다. '갈라'와 '메킨토시'는 형질전환율이 낮아서 적은 수의 형질전환체만을 얻을 수 있었다. 하지만 '후지'는 전세계적으로 얻어진 형질전환체가 보고된 바 없는 것으로 보아 박테리아 농도 등에 민감하게 반응하여 형질전환체의 획득에 실패한 것으로 판단된다. Mireille 등 (1988)이 식물체의 형질전환율을 높이기 위해서는 한가지 요인이 아닌 *A. tumefaciens*의 침투시간, 침투량, 노출시간 및 침투범위 등이 조화를 이룰 수 있는 적절한 조건이 주어져야 한다고 보고했다. 본 연구 결과로 볼 때에도 *A. tumefaciens*의 농도도 최적의 농도를 구명해야 형질전환율을 높일 수 있다고 보여진다. 따라서 본 실험에서 밝힌 박테리아 농도는 앞으로 사과의 형질전환 실험 시 활용될 수 있을 것으로 생각되며 더 나아가 사과 형질전환에 영향을 미치는 다른 조건들과의 병행 실험이 더 필요한 것으로 판단된다.

항생제가 첨가된 발근배지에서 재선발 과정을 거친 식물체 내로의 목적유전자의 삽입 여부를 확인하기 위하여 순화

식물체의 유염에서 genomic DNA를 추출하여 PCR 분석을 실시한 결과, 형질전환체에서는 *nptII* (800 bp)와 *MdANS* (800 bp) 유전자가 삽입됨을 확인할 수 있었으며 (Figure 3), 이는 southern 분석을 통하여 재확인하였다. 사과에서 분리한 유전자를 같은 사과 품종에 형질전환하였으므로 1 kb 정도의 밴드가 (Figure 3) 나타난 것은 사과 식물체 자체 genomic DNA가 증폭된 것으로 생각된다.

PCR로 확인된 형질전환체를 6개월간 온실에서 키운 후 대량으로 DNA를 분리해 southern을 실시하였다. Genomic DNA를 *EcoRI*으로 절단하여 실험한 결과 2 copy 이상의 밴드가 형질전환체에서 확인되었다.

적 요

*Agrobacterium*을 이용한 사과의 형질전환 효율 증진을 위한 요인중 적정 박테리아 농도의 구명을 위해 수행되었던 실험 결과를 요약하면 다음과 같다. '후지'에서는 균의 전처리

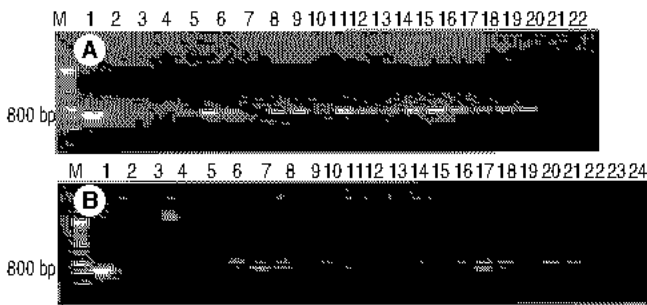


Figure 3. PCR analysis to detect the presence of the *nptII* and *MdANS* genes in transgenic apple tree. (A) PCR amplification of the 800bp fragment of the *nptII* gene. Lanes: M (1 kb ladder marker), 1 (pSK114 plasmid DNA, positive control), 2 (DNA from untransformed apple plants, negative control), 3-22 (DNA from transformed plants) (B) PCR amplification of the 800 bp fragment of the *MdANS* gene. Lanes: M (1 kb ladder marker), 1 (DNA from plasmid , positive control), 2 (DNA from untransformed apple tree, negative control), 3-24 (DNA from transformed plants).

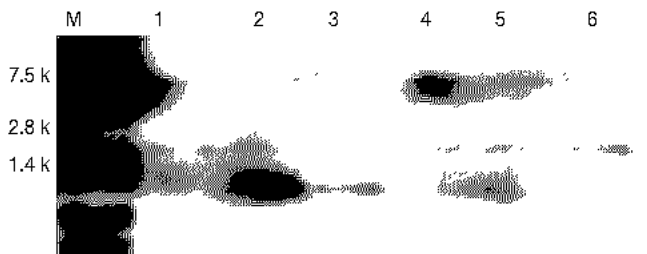


Figure 4. Southern blot analysis of transgenic lines following the hybridization *EcoRI*-digested genomic DNA with the *MdANS* probe. Lanes: M (DNA molecular weight marker, Dig-labelled), 1-5 (DNA from independently transformed plants), 6 (DNA from untransformed apple plant).

배양 농도 A_{600} 에서 0.7일 때 원심분리한 후 얻어진 균을 희석한 후의 최종 농도를 A_{600} 1.3으로 맞춘 실험 처리구에서 재분화율이 15%, 형질전환율이 10%로 가장 높게 나타났다. '갈라'에서는 전처리 배양 농도가 A_{600} 1.3일 때 최종 농도를 A_{600} 0.7로 맞춘 조건에서 20%의 재분화율과 16% 형질전환율을 나타내어 최적의 박테리아 농도를 구명하였다. '메킨토시'에서는 '갈라'와 마찬가지로 전처리 배양 농도 A_{600} 1.3인 것을 최종 농도 A_{600} 0.7로 맞춰 실험한 결과 재분화율 25%와 형질전환율 10%로 나타났다. 이 같은 결과로 볼 때 형질전환율을 높일 수 있는 박테리아 농도의 조건은 같은 종 내에서도 품종별로 다소 차이가 나는 것으로 생각된다.

인용문헌

Archilletti T, Lauri P, Damian C (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation of almond leaf pieces. *Plant Cell Rep* 14: 267-272

Bolar JP, Brown SK, Norelli JL, Aldwinckle HS (1999) Factors affecting the transformation of 'Marshall McIntosh' apple by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 55: 31-38

De Bondt A, Eggemont K, Druart P, De Vil M, Goderis I, Vanderleyden J, Broekaert WF (1994) *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. *Plant Cell Rep* 13: 587-593

Dufour M (1990) Improving yield of adventitious shoot in apple. *Acta Horticulturae* 280: 51-60

Howe GT, Goldfarb B, Strass F (1994) *Agrobacterium*-mediated transformation of hybrid poplar suspension cultures and regeneration of transformed plants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 36: 59-71

Humara JM, Lopez M, Ordas RJ (1999) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pinus pinea* L. cotyledons: an assessment of factors influencing the efficiency of *uidA* gene transfer. *Plant Cell Rep* 19: 51-58

James DJ, Dandekar AM (1991) Regeneration and transformation of apple (*Malus pumila* Mill.). *Plant Tissue Culture Manual B8* (1-18). Kluwer Academic Publishers, the Netherlands

James DJ, Passey AJ, Rugini E (1988) Factors affecting high frequency plant regeneration from apple tissues cultured *in vitro*. *J Plant Physiol* 132: 149-154

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

Kumria R, Waiw B, Rajam MV (2001) Plant regeneration from transformed embryogenic callus of an elite indica rice via *Agrobacterium*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 67: 63-71

Mireille C, Joan EP, Frank C, Vicky BW (1988) Parameters affecting the frequency of kanamycin resistant alfalfa obtained by

- Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Cell Rep 7: 512-516
- Mondal TK, Bhattacharya A, Ahuja PS, Chard PK (2001) Transgenic tea [*Camellia sinensis* (L.) O. kuntze cv. Kangra Jat] plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. Plant Cell Rep 20: 712-720
- Pena L, Cervera M, Juarez J, Ortega C, Pina JA, Duran-Vila N, Navarro L (1995) High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Citrus*. Plant Sci 104: 183-191
- Puite L, Schaart JG (1996) Genetic modification of the commercial apple cultivars Gala, Golden Delicious and Elstar via an *Agrobacterium*-mediated transformation method. Plant Sci 119: 125-133
- Welander M (1988) Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised *in vitro* from mature apple trees. J Plant Physiol 132: 738-744

(접수일자 2003년 7월 7일, 수리일자 2003년 8월 13일)