

pCAMBIA 1300 벡터를 이용한 일미벼의 형질전환 및 잎의 전자현미경적 관찰

곽 가, 성은수, 김영화¹, 조혜정, 조준형¹, 왕명현*

강원대학교 생명공학부, ¹동국대학교 식물생명공학과

Transformation of 'Ilmibyeo' using pCAMBIA 1300 and Microstructural Investigation of Leaves

Jia Guo[†], Eun Soo Seong[†], Young Hwa Kim¹, Hye Jeong Jo,
Joon-Hyeong Cho¹ and Myeong-Hyeon Wang*

School of Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Kangwon-do 200-701, Korea

¹Department of Plant Biotechnology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

[†]These authors are equally contributed to this work

Abstract - The *argE* gene of *E.coli* was introduced into 'Ilmibyeo' cultivar of rice by *Agrobacterium tumefaciens* and a large number of transgenic plants were produced. Embryogenic calli were co-cultivated with *A. tumefaciens* strain AGL1 carrying the plasmid pCAMBIA1300 containing hygromycin resistance (HygR). Transgenic plants showing *in vitro* resistance to 50 mg/L hygromycin were obtained using a selection procedure. Stable integration of *argE* and *HPT* genes into chromosomal DNA was proven by southern blot analysis and PCR analysis of genomic isolated from T₀ progenies. The fragments of 650 bp (*HPT*) were detected in transgenic rice lines. The 230 bp (*argE*) fragments were showed in agarose gel, and detected fragments were matched with size of *argE* specific primer. The microscopic feature of leaf on scanning electron microscope (SEM) revealed differences between clear and chalky in shape and arrangement of stoma but did not discriminate.

Key words - *argE*, Hygromycin, Ilmibyeo, SEM

서 언

농업상 유용형질의 유전자를 미생물 또는 식물로부터 탐색하여 분자생물학 수준에서 동정하려는 연구가 국내외로 활발히 진행되고 있다. 따라서, 목적하는 유전자가 클로닝되면 대상식물을 선정하여 형질전환 식물체를 만든후에 도입된 외부 유전자가 식물체에서 정상적으로 발현하는가를 조사하는 연구도 동시에 진행되고 있다. 지금까지 외부 유전자를 식물체에 도입하는데 있어서 비교적 재현성이 높고, 도입된 유전자의 유전형질이 안정적으로 다음세대에 전달되는 방법으로 *Agrobacterium* 감염법을 들 수 있다.

*Agrobacterium*을 매개로 한 형질전환법은 다른 형질전환 방법에 비해서 외부의 특정 유전자가 식물 염색체에 도입된 후 그 후대에도 안정되게 발현하는 특징을 가지고 있기 때문에 쌍자엽 식물 뿐만 아니라 단자엽 식물의 형질전환에도 널리 이용

되고 있다. 벼를 포함하여 단자엽 식물의 형질전환이 가능하게 된 것은 최근 10년 동안 세계 각지의 연구실에서 형질전환에 관련된 많은 연구가 이루어졌기 때문이다(Uchimiya and Toriyama 1991; Hiei *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998; Kwon *et al.*, 2000). 단자엽 식물인 벼는 *Agrobacterium* 균주에 대해서 비숙주 식물이기 때문에 기존의 담배 등과 같은 쌍자엽 식물과는 다른 형질전환방법이 여러 측면에서 검토되어야 한다. 또한 쌍자엽 식물과 비교해서 형질전환 효율이 낮은 것과 벼 품종간에 식물체 재분화 능력(Kwon *et al.*, 2000) 및 형질전환의 효율(Henry *et al.*, 1994; Hiei *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1998; Oh *et al.*, 2000)에 큰 차이점을 보이는 것도 앞으로 개선되어야 할 과제이다. 따라서 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법을 캘러스에 적용하여 형질전환 효율을 증가시키기 위해서는 *Agrobacterium*내의 T-DNA가 식물세포 안으로 잘 도입될 수 있는 조건을 확립하는 것과 유전자가 도입된 세포가 정상적으로 세포 분열하여 식물체의 재분화가 효율적으로 이루어지는 배양계의 확립이 중요하

*교신저자(E-mail) : mhwang@kangwon.ac.kr

다.

본 연구는 *Agrobacterium*내의 T-DNA가 식물세포의 염색체에 안정하게 도입되었는지를 PCR(Polymerase chain reaction)과 Southern blot을 통하여 조사하였다. 또한, 형질전환체로 확인된 식물을 이용하여 형질전환체와 대조구 식물간의 외래 유전자 도입으로 인한 형태학적 변화의 유무를 전자현미경(SEM)을 이용하여 관찰하였다.

재료 및 방법

캘러스내의 형질전환에 사용한 벡터는 pCAMBIA1300으로서 T-DNA내부에 hygromycin phosphotransferase(HygR)와 *argE*(NCBI accession no. X55417)를 포함하고 있다. pCAMBIA1300은 동결용해 방법(An, 1987)을 이용하여 *Agrobacterium* AGL1에 형질전환시켰다. 형질전환된 균주는 적정항생제가 포함된 YEP 액체배지에서 28°C에서 24시간 배양한 후 원심분리한 후 침전된 pellet을 acetosyringone 을 함유한 AAM(AA macro and micro salt, Amino acid stock, MS vitamins, 500mg/L casamino acid, 68.5g/L sucrose, 36g/L glucose) 액체배지에서 재현탁하였다.

준비된 *Agrobacterium*과 벼 캘러스를 공동으로 2일간 배양하였다. 공동배양된 캘러스로부터 *Agrobacterium*을 제거하기 위하여 캘러스를 cefotaxime(250mg/L)이 첨가된 멸균수로 3회 이상 세척하고 캘러스 증식 배지 2N6-CH(2N6 medium supplemented with 250mg/L cefotaxime, 50mg/L hygromycin B)에 이식한 후 3주간 27°C, 암조건에서 배양하였다. 그 후 재분화 배지 MSR-CH[MS(Murashige & Skoog 1962) salts and vitamins, NAA 0.5mg/L, kinetin 2mg/L, sucrose 30g/L, phytagel 4g/L, cefotaxime 250mg/L, hygromycin B 50mg/L, pH 5.8]에 이식한 후 녹색의 싹초 분화가 관찰되었을때 성장조절물질이 첨가되지 않은 뿌리유도 배지 MSO(MS salts and vitamins, sucrose 30g/L, phytagel 2g/L, pH 5.8)에 이식하여 외형적으로 정상적인 식물체만을 선발하였다. 배양기에서 순화가 끝난 식물체는 화분에 옮겨서 온실의 자연광 조건에서 재배하였다.

PCR 분석을 위하여 앞에서 genomic DNA는 Shure 등(1983)의 방법에 따라 추출하였고, *argE*의 특이 primer (Forward 5' -ATGAAAACAAATTACCGCCATT-3', Reverse 5' -TTAATGCCAGCAAAAATGGTGA)를 사용하였다. PCR 증폭 조건은 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분간 30회 반복한 다음 72°C에서 7분간 반응시켰다. 증폭된 산물은 0.5 xTAE용액에 ethidium bromide (EtBr)를 함유한 1% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

형질전환 식물체에서 genomic DNA를 추출한 후 *Eco* RI로 절단하여 20μg의 genomic DNA를 0.8% agarose gel에서 전기영동한 후, capillary transfer 방법을 이용하여 nylon membrane에 전이시켰다. 선발마커인 HPT(hygromycin phosphotransferase)에 ³²P 방사선 동위원소를 이용하여 유전자를 탐침한 후 Southern 분석을 수행하였다.

형질전환체의 형태학적인 특성을 조사하기 위하여 잎의 표면 및 두께를 SEM을 이용하여 관찰하였다. 본래의 유전적 특성이 아닌 외래 유전자 도입을 통한 가변적 형질은 형태학적 관찰을 위한 근거로 설정하지 않은 것이 바람직하므로 (Martin et al., 1991; Sneath and Sokal, 1973) 엽면적과 두께 등을 조사하고 측정하였다. SEM 분석은 LV-SEM S-3500N(Hitachi, Korea Basic Science Institute)를 이용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

PCR 과 southern blot 분석

재분화된 유식물체 내로의 *argE* 유전자 삽입 여부를 확인하기 위해 genomic DNA를 추출하고 *argE* 유전자 특이적인 primer 을 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 모든 형질전환 식물체에서 예상되는 크기의 0.23kb 단편의 PCR산물이 증폭되었다(Fig. 1A). Lane P은 *argE*가 재조합된 binary 벡터에서 증폭된 단편이며, lane 1, 2, 3, 4, 5은 형질전환한 벼로부터 증폭된 DNA 단편이다. 형질전환된 식물체에서는 예상된 크기인 0.23kb 의 DNA 증폭 단편을 볼 수 있어서 *argE* 유전자가 벼 게놈상에 삽입된 것으로 추정되었다.

argE 유전자를 탐침으로 사용하여 PCR증폭 DNA단편에 대한 Southern blot 분석을 실시한 결과 형질전환 식물체 모두에서 4kb 이상의 밴드가 검출되었다 (Fig. 1B). 이것은 추출한 DNA를 *Eco* RI으로 자른 후 검출된 것이어서 선발된 식물체에 *argE* 유전자가 안정적으로 도입되었음을 나타내는 결과이다.

Agrobacterium 기법을 이용한 벼의 형질전환에는 배양에 이용되는 조직이나 모식물의 genotype, 공동배양 배지 내에 첨가되는 acetosyringone 농도와 배지조성, *Agrobacterium strain* 등 여러가지 요인이 관여하는 것으로 알려져 있다(Hiei et al., 1997). 이들 요인중에서 모식물의 genotype에 따라 형질전환 효율이 상당한 차이를 보인다는 것이 대부분 연구자의 공통된 견해이다. 벼의 경우 일반적으로 자포니카형 품종이 인디카형 품종보다 형질전환 효율이 높은 것으로 알려져 있다(Hiei et al., 1997). '일미벼'의 경우도 형질전환 기법을 이용한 품종 육종에 매우 유용하게 이용되어질 수 있을 것으로 사

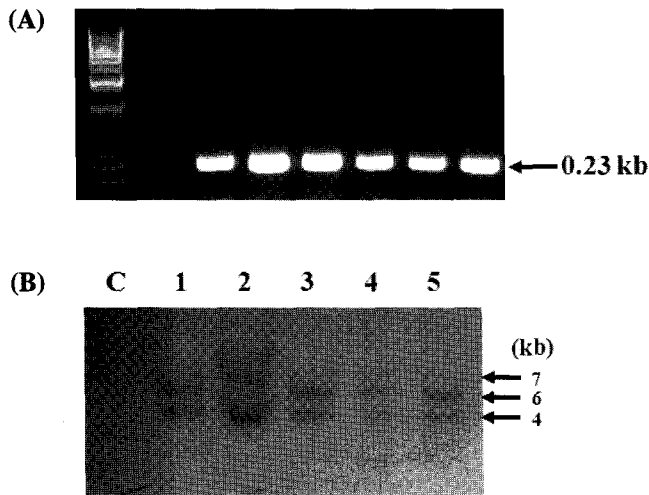


Fig. 1. Electrophoresis pattern of the 230 bp from *argE* gene amplified by PCR using DNA isolated from Ilmibeo transgenic plants and southern blot analysis. (A) PCR products of *argE* gene from T0 plants. M; 1 kb DNA ladder, C; Non-transformant, 1-5; Transgenic rice plants, P; *argE* DNA fragment amplified from plasmid. (B) Southern blot analysis of transgenic rice plants. Genomic DNAs from the leaf tissues of ten (1-5) independent lines were digested with *EcoRI* and hybridized with DNA fragment of HPT gene.

료된다.

벼의 형태학적 분석

벼의 품종간 분류를 위해 형태학적, 생리학적 특성을 현미경을 이용하여 밝힌바 있다(Kim *et al.*, 2002). Maeda 와

Miyake(1973)은 SEM을 이용하여 녹색과 albino식물간에 잎 표면의 구조적 차이를 밝혀냈다. 엽록체 수를 포함한 식물은 기공 세포 주변 배열에서 차이를 보여주었다(Zhang, 1995). 형질 전환체 선발 라인 별로 잎 표면의 기공 분포나 배열상의 특징을 관찰한 결과 모든 형질전환체에서 기공형태는 불규칙형이었다 (Fig. 3). 반면에 대조구 식물은 형질전환에 비해서 나란히 배열되어 있는 것으로 보여진다. 최근에 벼로 형질전환체를 만드는 연구는 많이 되고 있으나, 형질전환체를 이용한 형태학적인 변화에 연구는 거의 전무하다. 1997년 Kang 등에 의해 동결주사현미경 Cryo-SEM을 이용하여 다수성인 밀양 23호와 일본형인 고시히카리의 유수 및 영화를 관찰을 통해 분화 발달에 있어서 품종간 특이성에 대해 보고된바 있다.

또한 형질전환체의 잎의 두께에 있어서도 대조 식물과 형질 전환체 사이에 뚜렷한 변화는 볼수 없었다(Fig. 2). 잎 두께 측정 부위의 6가지 수치에 대한 평균값을 낸 결과, 대조 식물과 형질 전환체 사이에 변화가 없었으며, 형질전환된 벼에 있어서도 차이가 별로 없는 것으로 나타났다(Fig. 4) 화청벼에서의 뚜렷한 전분립의 형태는 부정형의 물질에 둘러싸여진 듯하여 화청과 화청su-1의 중간적인 형상을 보였다(Koh *et al.*, 1994). 또 SEM을 이용한 전분조성의 관찰은 높거나 낮은 밀도사이에 뚜렷한 구별은 없는 것으로 보였다(Koh *et al.*, 1992). 본 연구에서는 전분립이나 밀도 차이에 의한 형태학적 변화를 보지 못했다. SEM을 이용하여 형질전환체의 자세한 구조적 차이를 구명하는 것은 형질전환을 연구하는 분야에 꼭 필요한 필수적 요건으로 사료된다.

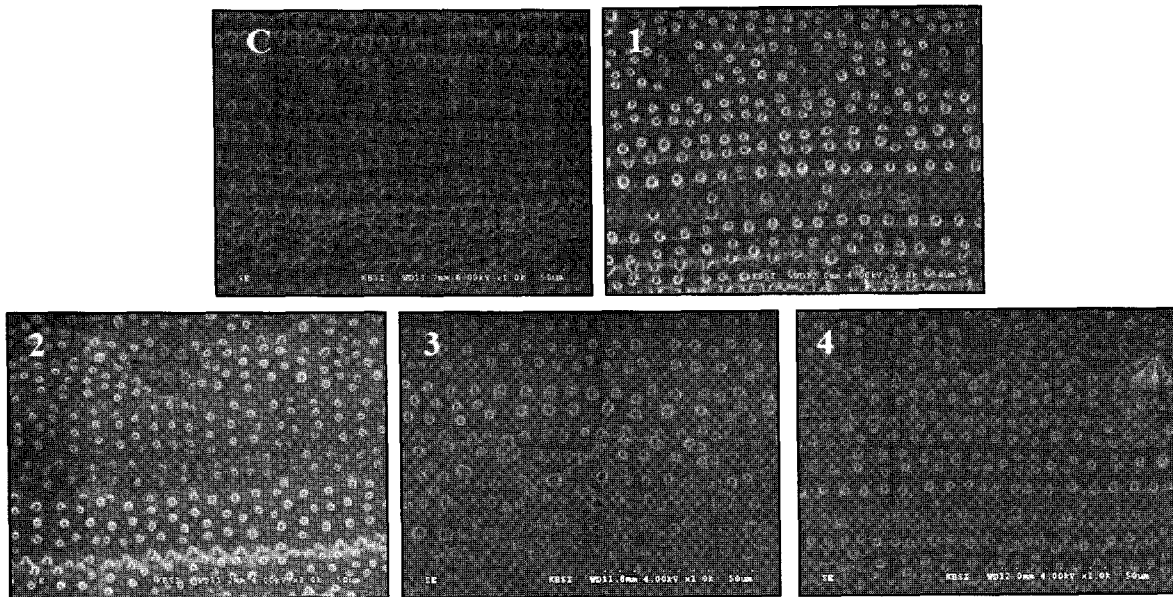


Fig. 2. SEM analysis of stomata positions and arrangement of surface blades from transgenic plant leaves in 4-week-old plants after transfer to soil. C, Control. 1-4, transgenic plants. x1.0K. Scale bar = 50 μ m.

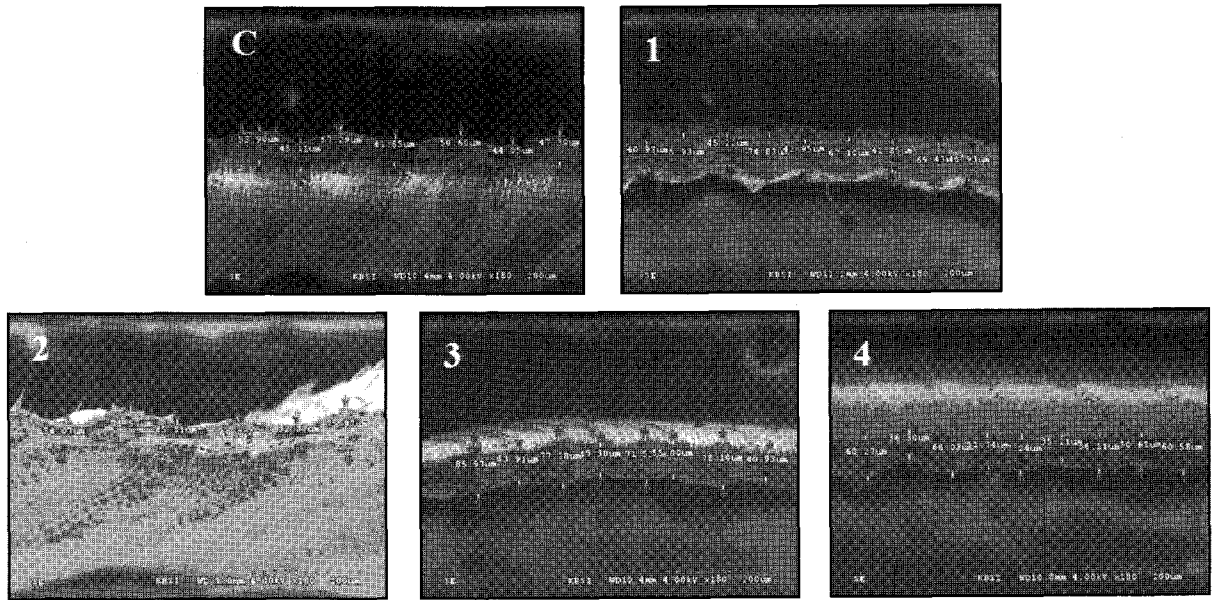


Fig. 3. Measurement of thickness of surface blades from transgenic plant leaves in 4-week-old plants after transfer to soil. C, Control. 1-4, transgenic plants. x180. Scale bar = 200 μ m.

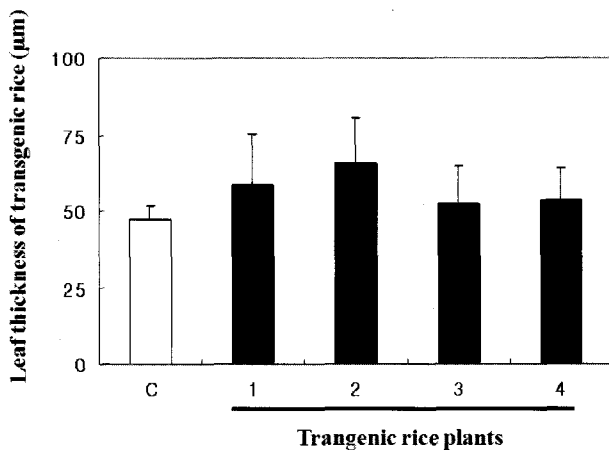


Fig. 4. Variation of leaf thickness in transgenic plant leaves in 4-week-old plants. C, Control. 1-4, transgenic plants.

적 요

*Agrobacterium tumefaciens*에 의해 일미벼 품종에 도입하여 많은 형질전환체를 생산했다. 배발생 캘러스는 hygromycin 저항성 선발마커를 포함한 pCAMBIA1300 벡터를 이용하여 *Agrobacterium* strain AGL1으로 공동배양하였다. 공동배양 후 50mg/L hygromycin에 저항성을 보이는 형질전환체가 선발되었다. T₀ 세대 형질전환체로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR과 Southern blot을 통한 외래 유전자의 안정한 삽입을 검정하였다. 형질전환된 벼라인에서 650bp의 *HPT* 유전자 단

편이 나타났다. 그리고 *argE*의 특이적 primer를 이용하여 검정한 결과 230bp 단편이 검출되었다. SEM을 이용하여 형태학적 분석을 한 결과 기공 분포와 배열상의 특징에 있어서 형질전환체는 대조구와 비교하여 기공형태가 불규칙적인 차이를 보여주었다.

사 사

This work was supported by a grant from 'Biogreen 2I' program of the Rural Development Administration.

인용문헌

- An G. 1987. Binary Ti Vector for plant transformation and promoter analysis. *Methods in Enzymology*. 153: 292-305.
- Henry Y., P. Vain and De Buyser. 1994. Genetic analysis of in vitro plant tissue culture response and regeneration capacities. *Eutiphyea* 79: 45-58.
- Hiei Y., S. Ohta, T. Komari and T. Kumashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6: 271-282.
- Hiei Y., T. Komari and T. Kubo. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Mol. Biol.* 35: 205-218.
- Kang S.Y., T. Wada and Y. Takeoka. 1997. Comparison of panicle and

- spikelet development in rice cultivars Milyang 23 and Koshihikari. Kor. J. Crop Sci. 42: 503-514.
- Kim H.S., H.J. Kang, Y.T. Lee, S.Y. Lee, J.K. Nam, T.S. Kim, E.S. Rha and I.D. Jin. 2002. Microspore division and plant regeneration from shed pollen culture in rice. Kor. J. Crop Sci. 47: 62-67.
- Koh H.J., M.H. Heu and C.M. Jiang. 1992. Varietal variations in absolute density of rice grain and its relations with other grain characters. Kor. J. Crop Sci. 37: 244-248.
- Koh H.J. and M.H. Heu. 1994. Physicochemical properties of sugary-endosperm mutants in rice. Kor. J. Crop Sci. 39: 1-6.
- Kwon Y.S., H.S. Lee, K.M. Kim, B.H. Lee, J.K. Jo and J.K. Shon. 2000. Effects of variety and acetosyringone influencing transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Korean J. Plant tissue cult. 27: 95-100.
- Lee H.Y., C.H. Le, H.I. Kim, W.D. Han, J.E. Choi, J.H. Kim and Y.P. Lim. 1998. Development of bialaphos-resistant transgenic rice using *Agrobacterium tumefaciens*. Korean J. Plant Biol. 42: 310-316.
- Maeda E. and H. Miyake. 1973. Surface structure of rice leaf blades observed through a scanning electron microscope. Proc. Crop Sci. Japan 42: 327-333.
- Martin J.M., T.K. Blake and G. Hockett. 1991. Diversity among north American spring barley cultivars based on coefficients of percentage. Crop Sci. 31: 1131-1137.
- Oh M.J., Y.S. Kwon and J.K. Sohn. 2000. Genetic analysis of the ability of callus formation and plant regeneration in seed culture of rice. Kor. J. Plant tiss. Cult. 27: 77-82.
- Shure M., S. Wessler and N. Fedoroff. 1983. Molecular identification and isolation of the waxy locus in Maize. Cell 35: 225-233.
- Sneath P.H.A. and P.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy W. H. Freeman & Co., San Francisco, USA pp. 216.
- Uchimiya H. and K. Toriyama. 1991. Transformation in rice. In : Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, vol 14, Rice. Springer, Berlin Heidelberg New York pp. 415-421.
- Zhang J., R.J. Xu, M.C. Elliott and D.F. Chen. 1997. *Agrobacterium*-mediated transformation of elite indica and japonica rice cultivars. Mol. Biotech. 8: 2232-2231.
- Zhang W. 1995. The observation of submicrostructure on leaves-back in *Oryza*. Chinese J. Rice Sci. 9: 71-76.

(접수일 2007. 5. 15 ; 수락일 2007. 8. 5)