

캘러스 유도에 의한 수박 형질전환

권정희¹, 박상미¹, 임미영¹, 신윤섭¹, 한지학^{1*}
¹경기도 여주군 가남면 (주)농우바이오 생명공학연구소

Genetic Transformation of Watermelon (*Citrullus vulgaris* Schard.) by Callus Induction

Jung Hee Kwon¹, Sang Mi Park¹, Mi Young Lim¹, Yoon Sup Shin¹, and Chee Hark Harn^{1*}

¹Biotechnology Institute, Nong Woo Bio Co. Ltd., Ganam, Yeosu 469-885, Korea

ABSTRACT The genetic transformation of watermelon by *Agrobacterium* has been known very difficult and a few successful cases have been reported by obtaining the direct shoot formation. However, since this direct shoot formation is not guaranteed the stable transformation, the stable transformation with reproducibility is required by a different approach such as a callus induced manner. The best conditions for inducing the callus from cotyledon and root explants of watermelon were 2 mg/L zeatin + 0.1 mg/L IAA and 2 mg/L BA + 0.1 mg/L 2,4-D, respectively. The *GFP* expression in the callus was identified and monitored through fluorescent microscopy after transformation with pmGFP5-ER vector. Paromomycin rather than kanamycin was used for selecting the *nptII* gene expression because it was more effective to select the watermelon explants. Four different callus types were observed and the solid green callus showed stronger *GFP* expression. The highest frequency of *GFP* expression in the callus developed from cotyledon was 9.0% (WM8 inbred line), while the highest frequency from root was 8.3% (WM6 inbred line). The *WMV-CP* was transformed using the method of *GFP* transformation and the genetic transformation of *WMV-CP* was confirmed by PCR and Southern blot analysis. Here we present a system for callus induction of watermelon explant and the callus induced method would facilitate the establishment of stable watermelon transformation.

서론

수박은 세계적으로 수확 면적이 2번째로 넓고 매년 8천 1백만 톤 이상 생산되는 중요한 채소작물이다. 국내에서도 종자시장의 규모는 약 130억원으로 전체 시장의 9%를 차지하고 있다. 수박 육종은 그동안 체계적으로 잘 구축되어 있어서 거의 모든 수박의 sucrose 함량이 매우 높으며, 하우스 내 축성재배 등 재배방법이 개선되어 출하시기가 빠르고 생산량이 높아지는 품종 등을 개발하였다. 그러나 아직도 곰팡이, 박테리아 그리고 바이러스 병에 의해서 많은 양의 과실이 필드에서 소실되고 있어서 (Compton and Gray 1999, Compton et al. 2004) 내병계 품종 육성에 초점을 두고 있다.

수박의 병저항성 품종을 만들기 위한 육종 program이 매우 어려운 이유는 내병성 유전자원의 확보가 쉽지 않으며 또한 내병성 특성이 다형질에 의한 경우가 많기 때문이다.

내병성 기능이 분석된 유전자를 분리, 수박에 형질전환하여 새로운 품종을 개발하는 것이 상기 어려운 관행육종을 대신 할 수 있기 때문에 형질전환을 통한 연구가 절실히 필요하다. 그동안 수박의 형질전환 연구는 많은 연구자들이 수행했지만 실험 자체가 어려워 성공한 경우가 드물다. 수박 형질전환은 Choi (1994) 등에 의해 처음 보고된 이후 자엽절편으로부터 직접 신초발생을 통한 식물체의 재분화를 유도하여 형질전환체를 얻은 몇몇 보고가 있지만 (Dong and Jia 1991, Compton and Gray 1993, Ellul et al. 2003, Gaba et al. 2004), 안정적인 형질전환 시스템이 구축되지 않아서

*Corresponding author Tel 031-883-7055 Fax 031-884-7065

E-mail: chharn@nongwoobio.co.kr

재현성이 없었다. 특히 형질전환이 이루어지지 않는 이유를 명쾌히 설명할 수 있는 연구가 진행되지 않아서 향후 수박 형질전환의 실험도 과거의 답습이 될 수 있다.

그동안 형질전환이 어려웠던 단자엽 식물인 벼, 잔디 그리고 쌍자엽식물인 고추 등이 캘러스 유도를 통해 신초를 재분화 시키는 방법을 이용하여 안정적으로 형질전환체를 얻은 예가 있었다 (Hiei et al. 1994, Rashid et al. 1996, Kusano et al. 2003, Lee et al. 2004). 반면 수박의 형질전환은 자엽에서 직접적으로 신초를 유도하여 형질전환체를 얻는 방법이 대부분이었으며 캘러스 유도를 거쳐 신초를 유도하여 형질전환체를 얻는 방법은 시도되지 않았다. 따라서 본 연구는 수박의 자엽과 뿌리 절편체에서 캘러스를 유도하여 신초를 재분화 시키는 방법을 통해 안정적인 형질전환 시스템 구축하고자 하였다. GFP 유전자를 형질전환한 뒤 그 발현을 관찰함으로써 유도된 캘러스가 형질전환 되었는지를 monitoring 한 뒤 같은 방법으로 WMV-CP 유전자를 형질전환하여 수박 캘러스에 도입됨을 확인하였다.

재료 및 방법

식물재료

연구에 이용된 식물체 재료는 수박 (*Citrullus vulgaris* Schard.) 계통인 WM1, WM2, WM3, WM6, WM7 및 WM8 [(주)농우바이오]을 이용하였다. 수박 종자의 종피를 인위적으로 제거하고, 70% (v/v) ethanol에서 40초간 침지한 후 멸균수로 세척하고 25% (v/v) 락스 용액 (Yuhan-Clorox, Korea)에서 20분간 침지 하면서 표면 살균한 후 멸균수로 3회 세척하였다. 10 g/L sucrose, 8 g/L agar 를 첨가한 1/2 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)에 살균된 종자를 파종하여 25°C에서 암배양 하였으며 파종 후 5일째 된 유식물체의 자엽과 주근을 실험 재료로 사용하였다. 자엽 절편은 주맥을 포함하고 생장점이 포함되지 않게 scapel을 이용하여 절단하였다. 뿌리 절편은 생장점 0.5 cm 아래 부분부터 1 cm 정도로 절단하여 실험재료로 이용하였다.

생장조절제 농도의 영향

자엽절편으로부터 캘러스 유도에 대한 생장조절제의 영향을 알아보기 위하여 30 g/L sucrose, 0.5 g/L MES 그리고 8 g/L agar가 첨가된 MS 기본배지에 zeatin 1, 2, 3 mg/L와 IAA 0, 0.1, 0.2, 0.3 mg/L로 12개 조합 처리하여 페트리디쉬 당 7 절편체를 치상하였다. 각 처리구당 3개 페트리디쉬로 3반복 하였으며 25°C에서 일주일간 암배양한 후 약 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$

$\cdot \text{sec}^{-1}$ 의 16시간 광주기 조건에서 3주간 배양하였다. 뿌리 절편의 캘러스 유도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 30 g/L sucrose, 0.5 g/L MES 그리고 8 g/L agar가 첨가된 MS 기본배지에 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L BA와 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L 2,4-D를 조합 처리하여 15 절편체/plate 치상하였으며 각 처리구당 3개 페트리디쉬로 3반복하여 25°C에서 4주간 암배양하였다.

Paromomycin 저항성 검정

형질전환에 사용할 식물체의 적정 paromomycin 선발농도를 조사하고자 캘러스 유도배지 (MS + 30 g/L sucrose + 2.0 mg/L zeatin + 0.1 mg/L IAA + 0.5 g/L MES, pH 5.8)에 paromomycin을 0, 25, 75, 125, 225, 375, 625 mg/L로 처리하여 7 자엽 절편체/plate를 치상하였다. 각 처리구당 plate 3개로 3반복하였으며 25°C에서 일주일간 암배양한 후 약 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ 의 16시간 광주기 조건에서 3주간 배양하였다.

Agrobacterium Strain과 벡터

Green fluorescence protein (GFP) 유전자는 CaMV 35S promoter, kanamycin 저항성 *neomycin phosphotransferase (nptII)* 유전자와 함께 pmGFP5-ER 벡터 안에 subcloning 되었고 EHA105에 도입하였다. WMV-CP 유전자는 CaMV 35S promoter, kanamycin 저항성 *neomycin phosphotransferase (nptII)* 유전자와 함께 pCAMBIA2300 벡터 안에 subcloning 되었고 (pWMV-CP2300 vector) EHA105에 도입되었다 (Figure 1). 50 mg/L kanamycin과 50 mg/L rifampicin가 첨가된 YEP 액체 배지에 접종한 후 28°C에서 약 18시간 동안 180 rpm으로 진탕배양한 후 대수기 증식기 ($\text{OD}_{660} = 0.5-1.0$)의 균을 사용하였다.

형질전환

수박 형질전환체를 얻기 위하여 *Agrobacterium* 배양액을 3000 rpm으로 10분 원심분리한 후, 상등액을 버리고 집중 액체배지 (MS + 30 g/L sucrose + 0.5 g/L MES + 100 μM acetosyringone, pH 5.4) 용액에 20분간 침지한 후 자엽 절편체를 공동배양배지 (co-cultivation medium, MS + 30 g/L sucrose + 2.0 mg/L zeatin + 0.1 mg/L IAA + 0.5 g/L MES + 100 μM acetosyringone + 8 g/L phyto agar, pH 5.4)에 치상하고 25°C, 암상태에서 3일간 공동배양 하였다. 공동배양 후 절편체를 균 세척액 (1/2MS + 20 g/L sucrose + 500 mg/L lilacillin, pH 5.8)으로 세척한 후 멸균된 filter paper에서 자엽 절편체를 건

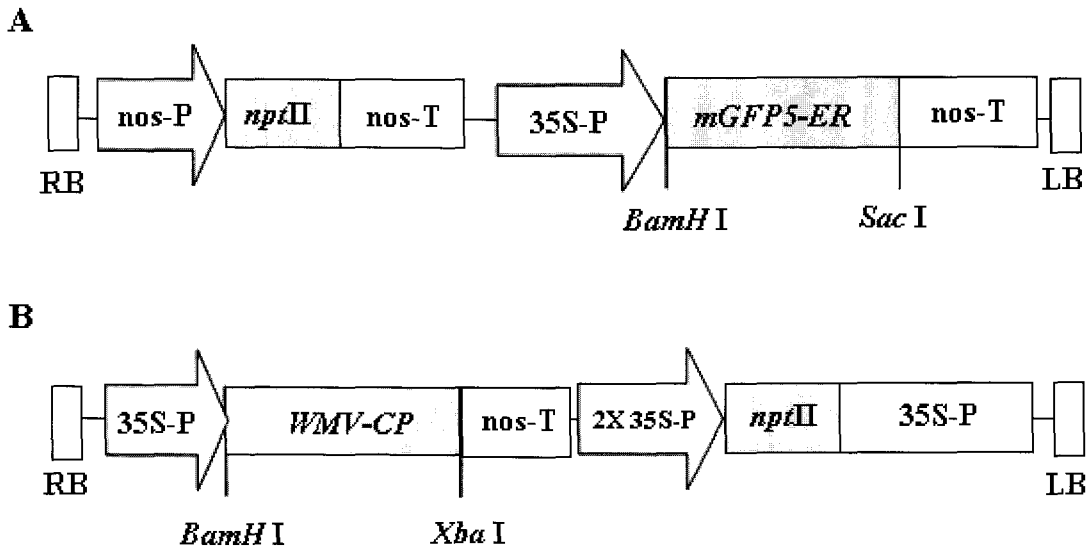


Figure 1. A, pmGFP5-ER vector. RB: right border, nos-P: nopaline synthase promoter, nos-T: nopaline synthase terminator, *nptII* : neomycin phosphotransferase gene, 35S-P: 35S promoter, mGFP5-ER: modified green fluorescent protein with ER targeting signal, LB: left border; B, pWMV-CP2300 vector. *WMV-CP*: watermelon mosaic virus-coat protein gene, 2×35S-P: 2×35S promoter.

조한 후 캘러스 유도배지 (callus induction medium, MS + 30 g/L sucrose + 0.5 g/L MES + 2.0 mg/L zeatin + 500 mg/L lilacillin + 125 mg/L paromomycin + 8 g/L phyto agar, pH 5.8) 에 7개씩 치상하여 25°C, 약 40 μmol · m⁻² · sec⁻¹의 16시간 광주기 조건에서 3주간 배양한 후 자엽에서 캘러스만을 분리하여 신초유도배지 (shoot induction medium, MS + 30 g/L sucrose + 0.5 g/L MES + 2.2 mg/L zeatin + 1 mg/L GA₃ + 500 mg/L lilacillin + 125 mg/L paromomycin + 8 g/L phyto agar, pH 5.8)로 옮겨 3주마다 계대 배양하였다. 선발배지에서 재분화 된 신초는 절편체에서 분리하여 신초 발근 배지 (root induction medium, 1/2MS + 30 g/L sucrose + 0.1 mg/L IAA + 50 mg/L paromomycin + 500 mg/L cefotaxime + 8 g/L phyto agar, pH 5.8)로 이식하였다. 이식 4주 후 발근된 개체는 Jippy pot으로 이식하여 순화하였다.

뿌리 절편체의 형질전환 방법은 자엽 절편체의 조건과 동일하였고 공동배양배지(MS + 30 g/L sucrose + 0.5 g/L MES + 2.0 mg/L BA + 0.1 mg/L 2,4-D + 8 g/L phyto agar, pH 5.8) 에 치상하여 25°C, 암상태에서 3일간 배양한 후, 캘러스 유도 배지 (MS + 30 g/L sucrose + 0.5 g/L MES + 2.0 mg/L BA + 0.1 mg/L 2,4-D + 8g/L phyto agar, pH 5.8)에서 25°C, 2주간 암배양하였으며, 신초유도배지 (MS + 30 g/L sucrose + 0.5 g/L MES + 2.0 mg/L BA + 0.01 mg/L 2,4-D + 500 mg/L lilacillin + 125 mg/L paromomycin + 8 g/L phyto agar, pH 5.8) 로 계대하여 약 40 μmol · m⁻² · sec⁻¹의 16시간 광주기 조건에서 배양한 후 3주마다 동일한 신초유도배지에 계대하였다.

Green Fluorescence Protein (GFP) 발현, PCR 조사 및 Southern Blot 분석

선발된 식물체에서 GFP 유전자 삽입여부를 확인하기 위하여 GFP 분석은 형광 현미경 (BX51 OLYMPUS, Japan)을 이용하였다. WU는 330-385/420 excitation/emission을, U-MNIBA는 470-490/515-550 excitation/emission filter set을 사용하여 기내에서 배양 중인 캘러스를 직접 관찰하였다. GFP 유전자가 도입된 식물체는 형광현미경 하에서 UV (360-400 nm)나 청색광 (440-480 nm)을 조사하면 녹색 형광을 발현한다. *WMV-CP* 유전자로 형질전환 된 캘러스에 대한 PCR 분석을 실시하였다. Genomic DNA isolation은 Dellaporta 등 (1983)의 방법에서 약간 변형된 방법으로 수행하였다. Primer는 35'S primer (5'-ATGACGCACAATCCCACTAT-3')와 *WMV-CP* reverse primer (5'-TTACTGCGGGGACCCAT ACC-3')를 이용하였다. PCR 조건은 pre-mix (Accupower®, Bioneer)를 이용하였으며 pre-denaturation은 94°C에서 5분간, denaturation은 94°C에서 1분, annealing은 60°C에서 1분, extension은 72°C에서 1분간으로 35 cycle을 하였으며 last extension은 72°C에서 5분간 반응하였다 (CORBETT RESEARCH, Australia). 합성된 DNA는 0.8% agarose gel로 전기영동 후 band 유무를 관찰하였다. PCR 분석 시 *WMV-CP* 유전자 도입이 확인된 캘러스를 대상으로 Southern 분석을 실시하였다. 기내에서 증식 중인 캘러스 조직을 이용하여 genomic DNA를 분리하였으며 분리한 DNA (60 μg)를 *BamH* I 제한효소로 각각 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동 하였다. Agarose gel 상의 DNA 밴드를 Zeta^R-Probe nylon membrane (Bio-Rad)에 전이시켜 ³²P-dCTP로 표지된 약 850 bp *WMV-CP* probe를 이용하여

Table 1. Effect of zeatin and IAA on callus induction, plant regeneration from watermelon cotyledon explant.

Zeatin (mg/L)	IAA (mg/L)	No. of explants	Shoot regeneration (%)	Callus formation (%)	Growth potency of callus
1.0	0	14	28.6	28.6	++
1.0	0.1	7	57.1	14.3	+
1.0	0.2	14	14.3	0.5	++
1.0	0.3	14	21.4	42.9	++
2.0	0	14	50.0	14.3	++
2.0	0.1	14	42.9	28.6	+++
2.0	0.2	14	42.9	28.6	++
2.0	0.3	14	21.4	28.6	++
3.0	0	14	0.5	14.3	+++
3.0	0.1	14	64.3	35.7	++
3.0	0.2	14	57.1	21.4	++
3.0	0.3	14	71.4	14.3	++

Levels of relative growth potency of callus are expressed as +: low; ++: medium; +++: high.

Southern 분석하였다 (Southern 1975).

결과 및 고찰

캘러스 유도 및 재분화

지금까지의 수박 형질전환 실험들은 자엽 절편체에서 직접적으로 신초를 유도하여 식물체를 얻는 방법이 주로 이루어졌으며, 캘러스를 유도하여 형질전환하는 연구가 없었다. 따라서 캘러스를 통한 형질전환방법을 구축하고자 하였으며, 먼저 캘러스 유도에 효과적인 성장조절제 농도를 구명하기 위해 선행된 연구들의 모든 호르몬조합을 재검증하였다. 먼저 발표된 수박 재분화 조건을 위하여 호르몬 조합을 다음과 같이 답습하였다: 0.5 μ M BA, 0.3 mg/L BA (Lee et al. 1994), 0.5 mg/L BA + 0.3 mg/L IAA, 1.0 mg/L BA (Choi et al. 1994), 1 mg/L BA + 0.01 mg/L IAA (Choi et al. 2003), 3.0 μ M BA + 3.0 μ M IAA (Chaturvedi and Bhatnagar 2001), 3.0 μ M BA + 3.0 μ M zeatin, 5.0 μ M BA (Compton 1999), 2.0 mg/L BA, 25 μ M BA (Dabauza et al. 1997), 5.0 mg/L BA + 0.5 mg/L IAA (Dong and Jia 1991) 그리고 2.0 mg/L zeatin (Kim and Lee 1997). 결론적으로 BA 단독처리가 신초 형성에는 효과적이었으나 비정상적인 캘러스를 형성하여 전혀 증식이 되지 않거나, multi-shoot이 발생했고 또는 nodule의 형태로 뭉쳐져서 정상적 신초로 전환하는데 어려움이 있었다 (자료 미제시). 또한 Compton 등 (2004)은 BA를 4.4-10 μ M의 농도로 단독 처리하는 것이 신초 재분화에 효과적임을 제시하였으며 Dong과 Jia (1991)는 일부 genotype의 경우 2.85 μ M의 IAA를 첨가하여 주는 것이 다수의 신초를 얻는데 효과적이고 BA를

대신하여 5-40 μ M kinetin, zeatin, 2-ip 또는 0.1-10 μ M TDZ를 처리하는 것이 기관 분화능을 감소하게 함을 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 zeatin이 BA를 처리할 때보다 다수의 신초는 얻지는 못하지만, 정상적인 캘러스와 신초 유도에 효과적이었음을 확인하고 zeatin과 IAA를 사용하여 재분화 실험을 수행하기로 결정하였다.

내생 cytokinin인 zeatin을 1.0, 2.0, 3.0 mg/L의 농도로, 내생 auxin인 IAA를 0, 0.1, 0.2, 0.3 mg/L 농도로 조합 처리하여 캘러스 유도조건을 조사하였던 바, zeatin 3.0 mg/L와 IAA 0.3 mg/L 조합이 71.4 %로 신초 재분화에 가장 효과적이었으며 캘러스 유도에는 zeatin 1.0 mg/L와 IAA 0.3 mg/L 조합이 42.9%로 가장 효과적이었다. 형성된 캘러스가 잘 자라는 growth potency는 zeatin 2.0 mg/L과 IAA 0.1 mg/L의 조합에서 가장 효과적이었으며 이 조건에서 신초 재분화도 비교적 우수하였다 (Table 1). Zeatin 3.0 mg/L만 처리할 경우도 growth potency가 높게 나타났지만 신초를 형성하는데 어려움이 있었다. 분열이 왕성한 캘러스는 이후의 재분화에도 적합할 것으로 예상되어 이후의 캘러스 유도조건으로 zeatin 2.0 mg/L과 IAA 0.1 mg/L으로 정하고 공동배양배지에 첨가하였으며 캘러스가 유도되면 IAA를 제외한 zeatin 2.0 mg/L만이 첨가된 선발배지에 절편체를 계대 배양하여 신초를 유도하였다.

대부분의 수박 형질전환의 연구는 자엽 절편체를 대상으로 제한적으로 이루어졌으며 낮은 효율을 나타내었기 때문에 이를 극복하고자 뿌리를 절편체로 사용하고자 하였다. 뿌리 절편체로부터 캘러스를 유도하기 위한 최적조건을 확립하고자 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L BA와 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L 2,4-D를 조합 처리하여 4주간 암배양한 결과, 0.1 mg/L 2,4-D와 BA 조합 처리구에서 전반적으로 캘러스 형성이 우수하였

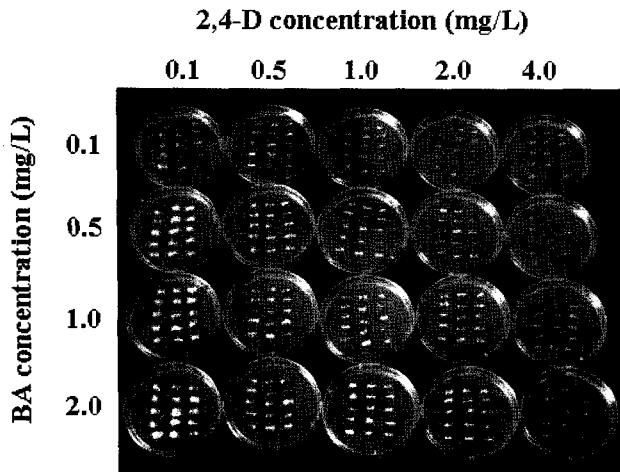


Figure 2. Effect of BA and 2,4-D on the callus induction from watermelon root explant.

고 특히 0.1 mg/L 2,4-D와 2.0 mg/L BA 처리구에서 노란색의 단단한 캘러스 유도가 가장 우수하였다 (Figure 2). 따라서 수박 뿌리 절편체의 배양 시 0.1 mg/L 2,4-D와 2.0 mg/L BA가 첨가된 공동배양배지에서 캘러스를 유도하였고, 이후 0.01 mg/L 2,4-D와 2.0 mg/L BA가 첨가된 선발배지에서 신태를 유도하였다. Franklin과 Sita (2003)는 가지의 형질전환 시 하배축, 자엽, 분엽을 절편체를 사용했을 때 낮은 효율을 보이는 반면 뿌리를 절편체로 사용하였을 때 *Agrobacterium*에 높은 susceptibility를 보이고 선발배지에서 빠른 재분화능을 나타내며 genotype-independent하여 형질전환에 효율적임을 보고하였다.

Paromomycin 저항성 검증

Paromomycin은 kanamycin과 같이 neomycin phosphotransferase II 효소에 의해 불활성화 됨으로서 형질전환이 일어나지 않은 세포는 괴사시키고 형질전환 된 세포는 항생제 저항성을 갖게 한다. 또한 paromomycin은 주로 단자엽 식물인 옥수수의 체세포배발생을 이용한 형질전환과정에서 효과적이었으며 (Roa-Rodriguez and Nottenburg 1999), 멜론과 오이의 형질전환에도 이용되었다 (Cho et al. 2005a, Cho et al. 2005b). 따라서 kanamycin을 대신하여 여러 작물에서도 효율적인 선발 마커로 확인된 paromomycin을 선발을 위한 항생제로 사용하였다.

수박의 형질전환에 있어서 선발 마커 유전자로 *nptII*를 사용하여 kanamycin이 포함된 배지에서 선발하는 방법이 일반적으로 이용되었다 (Choi et al. 1994, Tricoli et al 2002). 본 연구의 초기에는 100 mg/L kanamycin에서 선발을 해왔으나 비형질전환된 세포를 느리게 괴사시키고 캘러스로부터 비형질전환체가 재분화 되었으며 심지어 300 mg/L 이상 고농

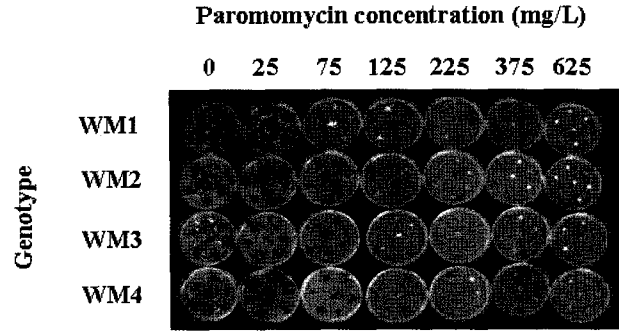


Figure 3. Paromomycin resistance of cotyledon explant on the medium with 2.0 mg/L zeatin + 0.1 mg/L IAA after 4 weeks in culture.

도의 kanamycin을 배지에 첨가하여도 배양 초기에 생성된 신태는 비형질전환체임에도 불구하고 잘 자라는 등 형질전환체 자체가 선발되지 않았다. 또한 kanamycin을 선발배지에 첨가하였을 때 세포를 완전히 괴사시키는데 약 6주가 소요되는 반면 동일한 농도의 paromomycin은 4주정도 소요되어 보다 빠른 선발효과를 보였다.

따라서 수박의 형질전환 시 kanamycin 대신 paromomycin을 사용하기로 하고 선발배지 내 paromomycin의 효과적인 처리 조건을 확립하고자 0, 25, 75, 125, 225, 375, 625 mg/L의 농도로 paromomycin이 첨가된 배지에 4개의 genotype 별로 4주간 배양한 결과, paromomycin 무처리구에서는 절편체가 팽창하면서 연두색 캘러스를 형성하는 반면 4개의 genotype 모두 125 mg/L이상의 처리구에서 절편체가 갈색 또는 흰색으로 고사되면서 절단면에서 캘러스가 유도되지 않았다 (Figure 3).

GFP 유전자를 이용한 형질전환

*Agrobacterium*과 3일간 공동배양한 후 캘러스 유도배지에 자엽을 치상하고 2주 경과 후부터 절단면에서 캘러스가 형성되기 시작하였고 (Figure 4A), 3주 후에는 paromomycin 저항성을 지니지 않은 절편체는 노란색으로 변하거나 갈색으로 고사되었으며 유도된 캘러스 주변부를 제외하고 갈색을 띄며 고사하는 것을 관찰하였다. 자엽 절편체로부터 유도된 캘러스는 신태유도배지에 옮겨 배양하였고 3주마다 계대하였다 (Figure 4B). 선발배지에 배양한 10주 후에는 캘러스로부터 신태가 재분화되어 호르몬 무첨가 배지에 신태만을 분리하고 신태를 유도하였다 (Figure 4C). 이후 이 신태는 조금 더 성장하다가 뿌리 발달이 되지 않으면서 더 이상 성장하지 않았다 (자료 미제시).

뿌리를 절편체로 이용하는 경우 공동배양 후 뿌리 캘러스 유도 배지에 치상하고 2주간 암배양하였으며, 암배양이 광배양에 비해 캘러스 형성에 효과적이었다 (Figure 4D). 뿌리 유래 캘러스는 2.0 mg/L BA와 0.01 mg/L 2,4-D + 500 mg/L

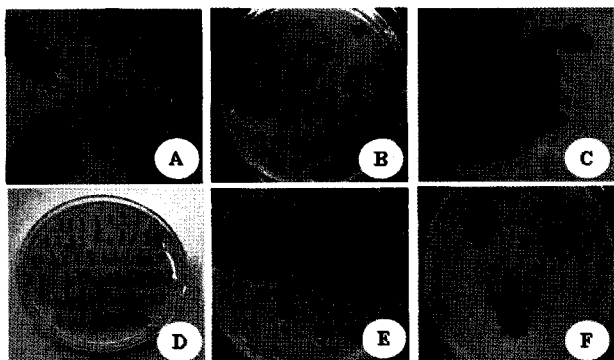


Figure 4. Callus induction and plant regeneration from cotyledon & root explants of watermelon (*Citrullus vulgaris* Shard.) transformed with *Agrobacterium* harboring pmGFP5-ER vector. A, Callus induction from the cotyledon explant cultured on the callus induction medium; B, Induced calli were transferred to shoot induction medium; C, Development of a shoot from the callus cultured in the root induction medium; D, Callus induction from the root explant cultured on callus induction media for 2weeks in dark. E, Induced calli were transferred to shoot induction medium; F, Propagation of callus.

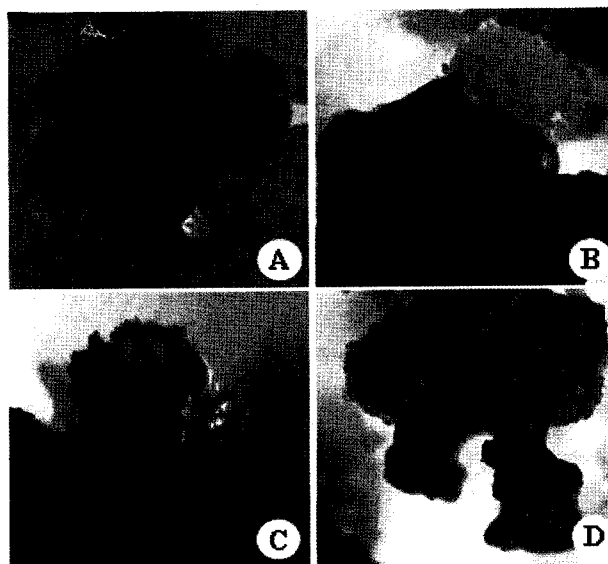


Figure 5. Four different callus types showing after induction. A, compact green callus; B, friable yellow callus; C, white compact callus; F, friable pale-green callus.

Table 2. Frequency of callus development and GFP expression in callus.

Explant	Genotype	Number of explants	Number of calli formed (%)	Number of calli with GFP expression (%)
Cotyledon	WM1	678	472(69.6)	35(5.2)
	WM2	1489	1339(89.9)	33(2.2)
	WM6	615	370(60.2)	10(1.6)
	WM7	605	312(51.6)	8(1.3)
	WM8	1179	891(75.6)	106(9.0)
Root	WM1	120	117(97.5)	5(4.2)
	WM6	36	35(97.2)	3(8.3)
	WM7	57	55(96.5)	4(7.0)
	WM8	210	204(97.1)	5(3.6)

lilacillin+50 mg/L paromomycin에서 광 상태로 계대 배양하여 캘러스를 증식하였으나 단단한 캘러스로 증식할 뿐 신초로 재분화 되지는 못하였다 (Figure 4E, F). 선발배지 치상 후 캘러스를 유도하기 위해 2주간 암배양 하였는데 오랜 암기가 캘러스에서 신초로의 재분화를 억제했던 것으로 사료된다.

자엽 절편체에서 유도된 캘러스는 단단한 연두색 캘러스 (Figure 5A), friable한 노란색 캘러스 (Figure 5B), 흰색의 단단한 캘러스 (Figure 5C), friable한 연두색 캘러스 (Figure 5D) 등의 형태로 증식되었다. 자엽 절편체의 캘러스 유도 효율은 WM1 69.6%, WM2 89.9%, WM6 60.2%, WM7 51.6% 그리고 WM8 75.6%로 WM2과 WM8이 캘러스 유도에 더 효과적인 line임을 확인하였다 (Table 2). 뿌리 절편체를 4주 동안 선발 배지에서 배양한 결과 캘러스 유도 효율은 WM1이 97.5%, WM6 97.2%, WM7 96.5% 그리고 WM8 97.1%로 4개의 inbred line이 거의 유사하였다 (Table 2).

형질전환 유무를 분석하기 위하여 형광현미경을 이용하여 GFP의 발현을 관찰하였던 바, 형질전환 된 자엽과 뿌리 유래 캘러스는 형질전환 되지 않은 세포내에 존재하는 연두색의 형광과 확연히 구분되면서 (Figure 6-I) 초록색의 형광을 강하게 발현하였다 (Figure 6-II, III). 강하게 형광을 보이는 캘러스는 단단한 연두색 캘러스가 대부분이었고 (Figure 5A) friable한 노란색캘러스, 단단한 흰색캘러스 그리고 friable한 연두색 캘러스 (Figure 5B, C, D)는 약하게 형광을 보였으며, 육안으로는 연두색캘러스로 관찰되었지만 형광을 발현하지 않는 캘러스도 관찰할 수 있었다.

선발배지에서 4주 배양 후 genotype에 따른 GFP의 발현 효율을 조사해본 바, 자엽절편체에서 유도된 캘러스의 경우 WM8이 9.0%, WM1이 5.2%, WM2이 2.2%, WM6이 1.6% 그리고 WM7이 1.3%로 WM8에서 유도된 캘러스에서 가장 높은 GFP발현을 나타내었고 뿌리 절편체에서 유도된 캘러스의

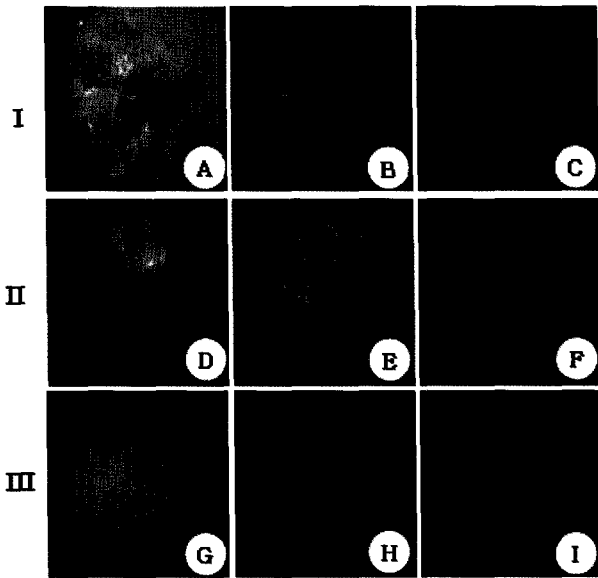


Figure 6. GFP expression in the callus of watermelon after transformation with pmGFP5-ER vector under stereo (A, D, G), UV (B, E, H) and U-MNIBA (C, F, I) microscope. I: non-transformed callus; II, III: transformed callus.

경우 WM1이 4.2%, WM6이 8.3%, WM7이 7.0% 그리고 WM8이 3.6%로 WM6에서 가장 높은 GFP 발현을 나타내었다 (Table 2). 이는 수박의 genotype과 절편체 부위에 따라 *Agrobacterium*의 감수성이 다름을 보여주는 결과로 자엽 절편체의 경우는 WM8이, 뿌리를 절편체로 이용할 경우 WM6이 형질전환 효율을 높이는데 효과적임을 확인하였다. Simmonds와 Donaldson (2000)은 *Agrobacterium* 균주 (A281, C58, ACH5)의 감염성이 작물의 품종과 *Agrobacterium*의 종류에 따라 다르게 나타날 수 있다고 하였으며 Lee 등 (1999)은 벼의 형질전환 시 품종 간 LBA4404 균주의 감염성이 달라짐을 보고하였다. 마찬가지로 수박 또한 계통에 따라 *Agrobacterium* EHA105 strain의 감수성이 달라 형질전환 효율에 영향을 미치고 있음을 확인하였다.

WMV-CP 유전자를 이용한 형질전환

캘러스 유도와 캘러스에 발현된 GFP의 관찰을 통하여 캘러스 유도 형질전환 조건이 구축됨으로서 WMV-CP 유전자를 수박자엽 절편체에 동일한 방법으로 형질전환하였다. 약 81.5%의 자엽 절편체에서 캘러스가 생성되었고 3주 후 캘러스만을 떼어내어 신허유도배지에서 배양하였으며 *Agrobacterium*과 공동배양 10주 후 캘러스로부터 신허를 유도하였다 (Figure 7). 그러나 유도된 신허는 조금 성장하다가 신허가 매우 느려지면서 root 발달이 잘 되지 않아서 더 이상 성장하지 않았다 (자료 미제시). 따라서 신허를 genomic Southern 분석에 이용하기에는 어려움이 있었다. 따라서 신허 대신에 단단한 연두색의 증식이 우수하였던 독립적인 두개의 캘러스에

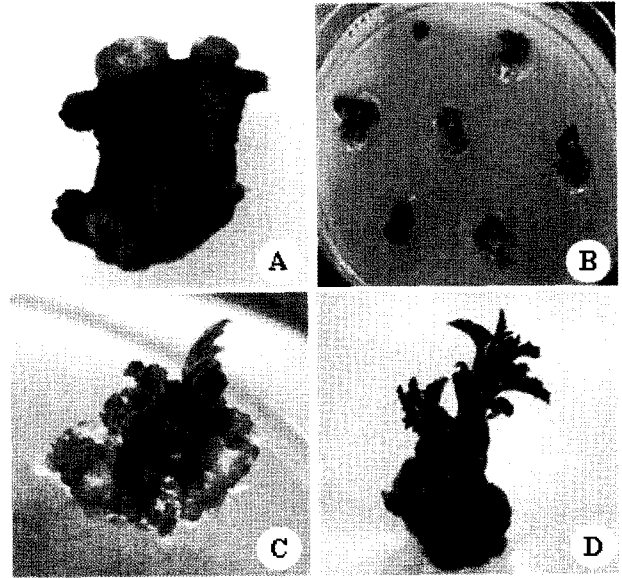


Figure 7. Callus induction and plant regeneration from cotyledon explants of watermelon (*Citrullus vulgaris* Shard.) transformed with *Agrobacterium* harboring pWMV-CP2300 vector. A, Callus induction from the cotyledon explant cultured on the callus induction medium; B, Induced calli were transferred to shoot induction medium; C and D, Development of a shoot from the callus cultured in the root induction medium.

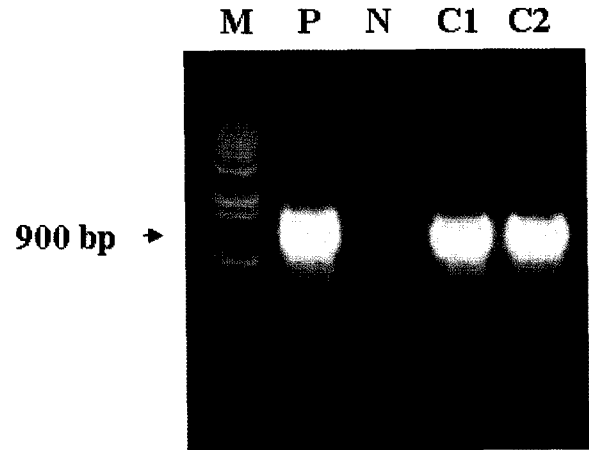


Figure 8. Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products of WMV-CP gene. Lane M: 1kb ladder; P: positive control (*Agrobacterium* with pWMV-CP2300); N: non-transformed watermelon; C1 and C2: transformed calli.

서 DNA를 분리하여 PCR 분석을 수행하였던 바, 두 점 모두 WMV-CP 유전자를 함유하고 있음을 확인하였다 (Figure 8). 이는 선행된 GFP 발현 실험을 통해 분류된 캘러스 타입에 근거하여 유전자 삽입여부를 육안으로 어느 정도 식별할 수 있음을 확인한 결과라 할 수 있다. 두 점의 캘러스 내 WMV-CP 유전자가 유전체내 안정적으로 삽입되었는지를 확인하기 위해 Southern 분석 결과, 형질전환하지 않은 대조구에서는 band를 확인할 수 없었던 반면 형질전환체 C1에서는 11, 8 kb의 밴드와 0.9 kb의 약한 band를 관찰하였고 C2에서는 11, 9 kb의 band를 확인하였다 (Figure 9). 따라서 본 연구를 통하

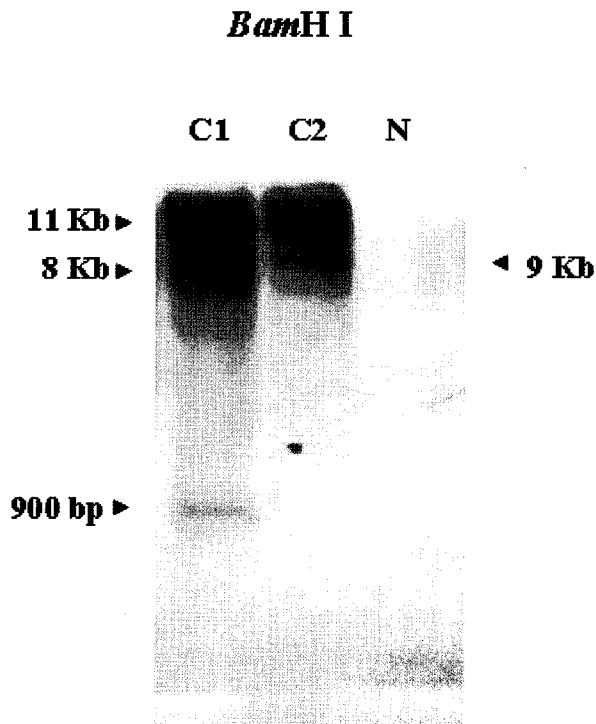


Figure 9. Southern analysis of genomic DNA prepared from transformed and non-transformed watermelon (*Citrullus vulgaris* Shard.) callus. Equal amounts (60 µg) of genomic DNA were digested with the *Bam*HI, electrophoresed in 0.8% agarose gel, and blotted onto a membrane. The blot was hybridized with ³²P-dCTP labelled 850 bp fragment of *WMV-CP* as a probe. N: non-transformed; C1 and C2: transformed.

여 수박의 뿌리와 자엽에서 캘러스를 유도하면서 형질전환하는 시스템을 확보하였다고 사려 된다. 현재 신초를 신장, 순화할 수 있는 조건을 완성하고자 연구 중이며 이를 통하여 수박 형질전환 시스템이 완벽하게 구축될 것으로 기대한다.

적 요

수박은 형질전환이 매우 어렵고 직접적인 신초 유도방법으로는 안정된 형질전환을 기대할 수 없어서, 다른 여러 작물에서 높은 효율을 보였던 캘러스 유래 신초 유도 방법을 도입하고자 하였다. 수박의 최적 캘러스 유도조건은 자엽 절편체의 경우 2.0 mg/L zeatin과 0.1 mg/L IAA이었으며 뿌리 절편체의 경우 2.0 mg/L BA와 0.1 mg/L 2,4-D이었다. *NptII* 유전자의 선발 항생제는 kanamycin보다는 paromomycin 빠르고 효과적이었으며, 수박의 절편체에 *Agrobacterium*을 접종 한 후 paromomycin을 125 mg/L 첨가한 배지에서 선발하였다. pmGFP5-ER vector로 형질전환한 후 캘러스 상태에서 형광현미경을 통해 *GFP* 유전자의 도입을 확인하였으며, 딱딱한 초록색의 캘러스에서 강한 *GFP* 발현을 관찰하였고, 자엽유래 캘러스의 경우 WM8에서 9.0%, 뿌리유래 캘러스의 경우 WM6에서 8.3%의 가장 높은 *GFP* 발현 효율을 보였다.

GFP 유전자 도입과 같은 방법으로 *WMV-CP* 유전자가 있는 pWMV2300 vector로 형질전환한 후 캘러스 상태에서 PCR 및 Southern blot 분석을 한 결과, 두 점의 캘러스에서 *WMV-CP* 유전자가 도입되었음을 확인하였다. 본 연구를 통하여 확립된 수박의 캘러스 유도 시스템은 안정된 수박 형질전환 방법에 기초 자료로서 이용될 것이다.

사 사

본 연구는 농진청 바이오그린 21 연구사업단 (과제번호: 20050301034379)과 과기부 프론티어 작물유전체기능연구사업단 (과제번호: CG2242) 지원에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Chaturvedi R, Bhatnagar SP (2001) High-frequency shoot regeneration from cotyledon explants of watermelon cv. sugar baby. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37: 255-258
- Cho MA, Song YM, Park YO, Ko SM, Min SR, Liu JR, Lee JH, Choi PS (2005a) Production of transgenic melon from the cultures of cotyledonary-node explant using *Agrobacterium*-mediated transformation. *Kor J Plant Biotechnol* 32: 257-262
- Cho MA, Song YM, Park YO, Ko SM, Min SR, Liu JR, Choi PS (2005b) The use of glufosinate as a selective marker for the transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Kor J Plant Biotechnol* 32: 161-165
- Choi PS, Soh WY, Kim YS, Yoo OJ, Liu JR (1994) Genetic transformation and plant regeneration of watermelon using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 13: 344-348
- Choi JY, Kim SH, Hyung NI (2003) Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation protocol in watermelon. *J Kor Soc Hort Sci Technol Suppl* 21: 59
- Compton ME (1999) Dark pretreatment improves adventitious shoot organogenesis from cotyledons of diploid watermelon. *Plant Cell Tiss Org Cult* 58: 185-188
- Compton ME, Gray DJ (1993) Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, triploid and tetraploid watermelon. *J Am Soc Hort Sci* 118: 151-157
- Compton ME, Gray DJ (1999) Shoot organogenesis from cotyledon explants of watermelon. In: Trigiano RN.; Gray DJ (eds) *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises*. Ed 2, CRC Press, Boca Raton, FL, pp 149-158
- Compton ME, Gray DJ, Gaba VP (2004) Use of tissue culture and biotechnology for the genetic improvement of watermelon. *Plant Cell Tiss Org Cult* 77: 231-243
- Dabauza M, Bordas M, Salvador A, Roig LA, Moreno V (1997) Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledon explant of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. *Plant Cell Rep* 16: 888-892
- Dellaporta, SL, Wood J, Hicks J.B. (1983) A simple and rapid method for plant DNA preparation. Version II. *Plant*

- Mol Biol Rep 1: 19-21
- Dong JZ, Jia SR (1991) High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.) Plant Cell Rep 9: 559-562
- Ellul P, Rios G, Atares A, Roig LA, Serrano R (2003) The expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HAL1 gene increases salt tolerance in transgenic watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) Matsum. & Nakai. Theor Appl Genet 107: 462-469
- Franklin G, Lakshmi Sita G (2003) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of eggplant (*Solanum melongena* L.) using root explants. Plant Cell Rep 21: 549-554
- Gaba V, Zelcer A, Gal-On A (2004) *Cucurbit* biotechnology- the importance of virus resistance. In Vitro Cell Dev Biol Plant 40: 346-358
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (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
- Kim DH, Lee JM (1997) Shoot regeneration from watermelon explants as affected by cultivars, explant parts and cytokinins. J Kor Soc Hort Sci Suppl 15(1): 72-73
- Kusano M, Tohyama K, Bae CH, Riu KZ, Lee HY (2003) Plant regeneration and transformation of Kentucky Bluegrass (*Poa pratensis* L.) via the plant tissue culture. Kor J Plant Biotechnol 30: 115-121
- Lee YH, Kim HS, Kim JY, Jung M, Park YS, Lee JS, Choi SH, Her NH, Lee JH, Hyung NI, Lee CH, Yang SG and Harn CH (2004) A new selection method for pepper transformation: callus-mediated shoot formation. Plant Cell Rep 23: 50-58
- Lee HK, Paek KY, Seo YK, Rhee WY (1994) Genotypic effect of watermelon (*Citrullus lanatus* Thunb.) on organogenesis from shoot tip culture of seedlings. Kor J Plant Tiss Cult 21: 239-246
- Lee SH, Shon YG, Lee SI, Kim CY, Koo JC, Lim CO, Choi YJ, Han CD, Chung CH, Choe ZR, Cho MJ (1999) Cultivar variability in the *Agrobacterium*-rice cell interaction and plant regeneration. Physiol Plant 107: 338-340
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-479
- Rashid H, Yokoi K, Toriyama K, Hinata K (1996) Transgenic Plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. Plant Cell Rep 15: 727-730
- Roa-Rodriuez and Nottenburg (1999) *NptII* gene in combination with paromomycin as a selective agent. Patent EP927765A1
- Simmonds DH, Donaldson PA (2000) Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotype. Plant Cell Rep 19: 485-490
- Southern, E (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98: 503-512
- Tricoli DM, Carney KJ, Russell PF, Quemada HD, McMaster RJ, Reynold JF & Deng RZ (2002) Transgenic plants expressing DNA constructs containing a plurality of genes to impart virus resistance. United States Patent No. 6,337,431

(접수일자 2007년 1월 14일, 수리일자 2007년 2월 5일)