

토마토 재분화 효율 향상 및 엽록체 형질전환 조건

노경희 · 이기종 · 박종석 · 김종범 · 이승범 · 서석철

Effect of cultivar and ascorbic acid on *in vitro* shoot regeneration and development of bombardment-mediated plastid transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum*)

Kyung Hee Roh · Ki Jong Lee · Jong-Sug Park · Jong-Bum Kim · Seung Bum Lee · Seok-Cheol Suh

Received: 10 March 2010 / Accepted: 18 March 2010

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Eighteen cultivars of tomato were tested for their regeneration response. *Lycopersicon esculentum* cv. 2001-58 showed a very high frequency of regeneration (93%). We evaluated the effect of two compounds with known antioxidant activity (ascorbic acid and cystein). The use of ascorbic acid (200 - 300 μ M/L) has a positive effect on shoot regeneration. To develop a system for plastid transformation in tomato *via* homologous recombination, we constructed the tomato plastid expression vector (pKRT22-AG) harboring 2.2 kb flanking sequences cloned from intact plastid genome and *gfp* gene. To investigate the factors affecting the delivery system of the pKRT22-AG into chloroplast using bombardment, We assessed the optimal DNA concentration, gold particle volume and target distance. Expression of the GFP protein was observed within chloroplast on protoplast of cotyledon explant by confocal laser scanning microscopy, which indicates that the protocol developed in this study be useful for the production of plastid transgenic plants in tomato.

서론

엽록체는 식물세포에서 독립적으로 자체 게놈을 가지고 있는 기관으로 모계유전을 한다. 이제까지 엽록체가

가지고 있는 두개의 막으로 인하여 식물세포기관으로의 유전자 형질전환은 불가능하게 여겨졌다. 하지만 많은 식물 생물학자들은 지난 1992년 Cerutti 등에 의해 처음으로 담배에서의 엽록체 형질전환체에 관한 연구가 보고된 이래 이 분야에 대해 많은 연구를 수행해 오고 있는 실정이다. 엽록체 형질전환은 외래 유전자의 대량 발현 (Kota et al. 1999), 한번에 여러 개의 유전자를 엽록체내로 삽입 (DeCosa et al. 2001), 모계유전 방식에 의한 유전자의 세대간 이동 (Daniell 2002) 및 유전자의 침묵현상이 일어나지 않는다는 (DeCosa et al. 2001; Lee et al. 2003) 등 많은 장점을 가지고 있다. 식물 분자유종 학자들은 특히 엽록체 형질전환이 자연생태계에 친화적이고, T1세대에서 고정 가능성이 있다는 부문에서 매우 흥미를 느끼고 있다. 이 분야는 현재 급속도로 발전하고 있으며, 이러한 결과로 농업형질관련 유전자 (McBride et al. 1995; Iamtham and Day 2000; Lee et al. 2003), 백신유전자 (Giddings et al. 2000), 산업용 및 의약품관련 유전자 (Staub et al. 2000; Fernandez-San Millan et al. 2003; Roh et al. 2006) 등이 엽록체 형질전환을 이용하여 식물에서 발현되어 지고 있다.

지금까지 엽록체 형질전환에 관한 연구는 담배에서 가장 많이 보고가 되고 있으며, 가지과에서는 감자 (Sidorov et al. 1999) 와 토마토 (Ruf et al. 2001)에서 엽록체 형질전환체 생산에 관한 연구가 보고된 바 있다. 또한 애기장대 (Sikdar et al. 1998), 유채 (Hou et al. 2003), 목화 (Kumar et al. 2004) 그리고 콩 (Dufourmantel et al. 2004)에서 엽록체 형질전환에 관한 연구가 보고되었다.

본 연구는 생식 및 가공식품으로 이용성이 높은 토마토에서의 엽록체 형질전환 기술 확립을 위하여 적정품종, 재분화조건 및 유전자총조건을 구명하고자 하였다.

Kyung Hee Roh · Ki Jong Lee · Jong-Sug Park · Jong-Bum Kim · Seung Bum Lee (✉) · Seok-Cheol Suh (✉)
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부
(Department of Agricultural Bio-resources, National Academy of Agricultural Science, RDA)
e-mail: seungblee@korea.kr, suhsc@korea.kr

재료 및 방법

식물재료

농촌진흥청 국립원예특작과학원에서 육성한 토마토 18계통을 공시하여 재분화능을 조사하였다. 재분화 시험을 위한 기내에서의 식물체 육성을 위해 토마토 18계통의 종자를 70% 에탄올로 1분간 침지한 후 1.2% NaOCl로 15분간 표면살균한 후 멸균수로 3회 수세하였다. 멸균된 토마토 종자를 30 g/L sucrose 와 3 g/L phytigel (Sigma) 가 첨가된 MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지에 치상하였다. 파종 후 7-9일 후 발아한 유식물체의 자엽과 하배측의 양쪽 끝을 잘라서 재분화배지 (T6; MS기본배지+ IAA 0.5 mg/L + BAP 1.0 mg/L + Sucrose 30 g/L + Phytigel 3 g/L)에 치상하였다. 2주 간격으로 계대배양을 하였으며, 치상 후 8주후에 재분화능을 조사하였다. 줄기 형성율은 전체 치상된 절편 중 줄기가 유도된 절편 수를 백분율로 계산하였다. 배양은 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 16 h 광주기하의 배양실에서 실시하였다.

식물체 재분화 및 선발마커 농도

재분화 효율을 높이기 위하여 항산화제를 첨가하여 재분화능에 미치는 영향을 조사하였다. 국립원예특작과학원 육성 원홍1호 (계통번호 2001-58)를 공시품종으로 하였다. 재분화 배지에 항산화제인 ascorbic acid 100~400 $\mu\text{M/L}$ 과 cystein 300~900 $\mu\text{M/L}$ 을 단용 또는 혼용으로 첨가하여 실험을 실시하였다. 항산화제는 멸균수에 녹인 후 filtering을 하여 사용하였으며, 멸균한 배지를 50°C 정도가 되게 식힌 후 첨가하였다. 엽록체 형질전환을 위한 선발 항생제 적정 농도를 알아보기 위해 재분화 배지에 spectinomycin 5~25 mg/L을 각 각 첨가한 후 배양 4주후에 재분화능을 조사하였다.

토마토 엽록체 형질전환 벡터 제작

토마토 엽록체 형질전환용 벡터 pKRT22-A는 토마토 엽록체 계놈의 *rrn16~trnA* (103,993 nucleotide [n.t.]~106,182 n.t., GenBank accession no. Z00044, EMBL Nucleotide Sequence Database) 부위를 PCR 반응을 통하여 증폭 한 후 pCR2.1-topo cloning kit (Invitrogen)을 이용하여 pCR2.1-topo vector로 도입되었다. Daniell 등 (1998)의 방법을 이용하여 pUC18에 삽입한 후, 16S rRNA promoter와 *psbA* 3' terminator 사이에 *aadA* (aminoglycoside 3"-adenylyltransferase) 유전자가 들어있는 cassette를 *Sma* I으로 절단한 후 토마토 엽록체 flanking region내 존재하는 *Pvu* II (105,331 n.t.)를 이용하여 벡터를 구축하였다. PCR primer는 forward

primer (5'-AAA ACC CGT CCT CAG TTC GGA TTG CC-3')와 reverse primer (5'-CAC GAG TTG GAG ATA AGC GG-3')를 사용하였다. PCR 반응은 94°C 에서 5분간 반응 후, 94°C 30초, 58.5°C 30초, 72°C 1분 30초간 30회 반복 실시하였다. 얻어진 PCR 산물은 0.5X TAE agarose gel을 이용하여 전기영동하였다. pKRT22-A의 토마토 엽록체내 발현여부를 조사하기 위해 wild type pEGFP vector (clontech)를 *Xba* I으로 *gfp* 유전자를 분리한 후 토마토 엽록체 형질전환 벡터 pKRT22-A에 cloning 하여 pKRT22-AG를 작성하였다.

토마토 엽록체 flanking region 염기서열 분석

토마토 엽록체 flanking region이 삽입된 pCR2.1-topo vector를 정제한 후, dideoxynucleotide chain termination 방법 (ABI prism dye terminator) 으로 PCR 반응을 실시하였다. PCR primer는 M13 forward primer와 M13 reverse primer를 사용하였다. 염기서열은 automatic DNA sequencer (ABI9700)를 이용하였다. 결정된 염기서열은 DNASTar 소프트웨어 프로그램을 이용하여 담배 (*Nicotiana tabacum*) 엽록체 계놈과 비교분석하였다.

엽록체 형질전환을 위한 유전자총 조건

GFP가 들어있는 토마토 엽록체 형질전환 벡터인 pKRT22-AG를 이용하여 DNA 농도 (0.5, 1, 1.5 $\mu\text{g/bombardment}$), 0.6 μm gold particle (0.5, 1, 1.5, 2 mg/bombardment) 및 target distance (6, 9, 12 cm)를 달리하여 엽록체 형질전환을 위한 적정 유전자총 조건을 구명하고자 하였다. Bombardment를 실시한 후 자엽을 재분화배지에 치상하여 암 상태에서 배양한 후 이틀 후에 원형질체를 추출하여 공초점현미경을 이용하여 GFP 발현 여부를 관찰하였다.

결과 및 고찰

공시품종 선정 및 식물체 재분화

국립원예특작과학원에서 분양받은 18계통을 공시하여 자엽과 하배측에서의 재분화능을 조사한 결과 하배측에 비해 자엽에서의 재분화능이 좋았고, 특히 계통번호 2001-58과 2001-159의 자엽에서 재분화율이 각 각 93%와 69%로 양호하였다 (Table 1). 자엽에서 식물체로의 재분화 과정에서 보여 지는 갈변현상과 phenolic compound에 의한 식물조직의 괴사현상을 막기 위하여 항산화제인 ascorbic acid와 cystein을 단용 또는 혼용으로 첨가한 후 식물체 재분화에 미치는 영향을 살펴보았다 (Fig. 1). 줄기 형성율에 있어서 항산화제 첨가 시 줄기 형성율이 높아지는 것

Table 1 Shoot regeneration from cotyledon on shoot inducing medium of 18 tomato cultivars

Cultivars	Cotyledon		Hypocotyl	
	Shoot formation (%)	No. of shoots per explant	Shoot formation (%)	No. of shoots per explant
99-7	25	1.5	13	1.4
99-10	18	1.1	12	1.1
99-13	2	2.0	2	2.0
99-15	24	1.5	13	1.1
99-16	15	1.0	6	1.3
99-20	10	1.2	11	1.3
99-25	15	1.0	21	1.2
2001-58	93	2.4	14	1.0
2001-73	0	-	0	-
2001-82	0	-	0	-
2001-111	0	-	0	-
2001-113	58	1.8	15	1.2
2001-159	69	2.0	12	1.0
2001-412	23	1.3	39	1.5
2001-457	16	1.5	22	1.2
2001-478	0	-	28	1.5
CH152	32	1.4	6	1.3
CH154	22	1.5	15	1.1

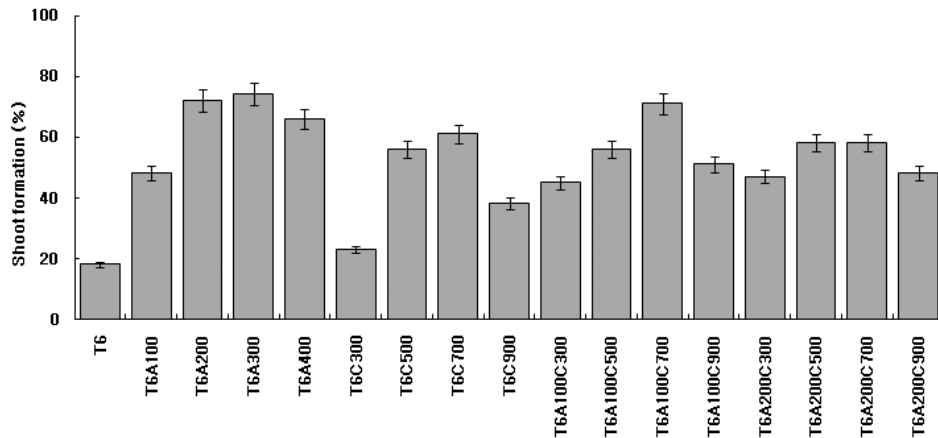


Fig. 1 Shoot formation of ascorbic acid and cystein treatments on shoot regeneration medium. Cotyledon explants from *L. esculentum* cv. 2001-58 were cultured on regeneration medium (T6) containing ascorbic acid 100~400 μ M/L and cystein 300~900 μ M/L. Vertical bar represents the standard error of the mean. A: ascorbic acid; C: cystein.

을 관찰할 수 있었으며, 전체 처리구 중 ascorbic acid 단용 처리구에서 효과가 좋았으며, 특히 ascorbic acid 200~300 μ M/L 처리구에서 줄기형성율이 72~74%로 양호하였다. Ascorbic acid가 첨가되어진 배지에서의 식물체 재분화 특성은 대조구에 비해 생체중이 증가되는 현상을 나타내었으며, 자엽 절편당 형성되는 줄기수는 대조구와 비슷한 경향치를 보였고, 줄기신장 속도는 대조구에 비해 다소 빨라짐을 알 수 있었다 (Table 2). Cystein 첨가시 보여지는 재분화 특성 중 가장 두드러진 현상은 다른 처리구에

비해 줄기신장속도가 빨라서 대조구에 비해 cystein이 첨가된 단용 또는 혼용처리구 모두에서 줄기길이 길어짐을 볼 수 있었으며, 생체중과 자엽 절편당 형성되는 줄기수에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보여진다. 또한 대조구의 경우 배양 2주가 지나면서 갈변현상이 나타나는 것과 달리 항산화제 첨가 배지에서는 녹색의 캘러스가 배양 4주까지 유지되는 것으로 보아 형질전환 시 식물체 조직에 가해지는 상처부위의 활성산소의 산화력을 감소시키는 데 항산화제가 효과가 있다고 사료되었다.

Table 2 Influences of ascorbic acid and cystein treatments on regeneration from cotyledon explant of *L. esculentum* cv. 2001-58 after 4 weeks of culture

Medium	Number of Shoot (ea/explant)	Length of Shoot (mm)	Fresh weight (g/explant)
T6 J	2.0a*	7c	0.8ab
T6As100 J	1.8a	9bc	1.0ab
T6As200	2.3a	15abc	1.5ab
T6As300	2.2a	13abc	2.4a
T6As400	1.7a	12abc	1.9ab
T6Cys300	1.7a	20a	0.9ab
T6Cys500	1.7a	11abc	0.9ab
T6Cys700	2.0a	19a	0.9ab
T6Cys900	1.4a	14abc	0.6b
T6As100Cys300	1.9a	17ab	1.1ab
T6As100Cys500	1.6a	16ab	1.7ab
T6As100Cys700	1.8a	17ab	1.6ab
T6As100Cys900	1.7a	17ab	1.0ab
T6As200Cys300	2.4a	19a	1.4ab
T6As200Cys500	1.7a	18a	1.9ab
T6As200Cys700	2.0a	20a	2.1ab
T6As200Cys900	2.3a	19a	2.1ab

J MS basal medium + IAA 0.5 mg/L + BAP 1.0 mg/L + Sucrose 30 g/L + Phytigel 3 g/L

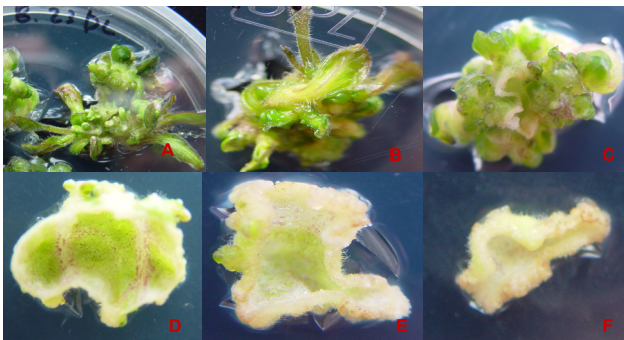
J The concentration of antioxidant is μ M/L

* Mean separation in columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

** As: Ascorbic acid, Cys: Cystein

Table 3 The analysis of comparison tomato (*L. esculentum*) with tobacco (*N. tabaccum*) plastid DNA. Portions of *N. tabaccum* nucleotide sequence are shown form 103,993 to 106,182

Gene	Product/Comment	Size (bp)	
		<i>L. esculentum</i>	<i>N. tabaccum</i>
rrn16	3'-16S rRNA	258	258
trnI	tRNA-Ile(GAU)5'exon	77	77
	Intron	723	707
	3'exon	35	35
<i>OriA</i>	Replication origin region	82	82
<i>trnA</i>	tRNA-Ala(UGC)5'exon	38	38
	Intron	809	709
	3'exon	35	35

**Fig. 2** Effect of spectinomycin on regeneration medium for chloroplast transformation in tomato. A: control; B: 5 mg/L; C: 10 mg/L; D: 15 mg/L; E: 20 mg/L; F: 25 mg/L

실질적으로 토마토 형질전환 시 항산화제인 티아민을 첨가하였을 때 형질전환효율이 높아졌다는 보고가 있으며 (Cortina and Culianez-Macia 2004), 항산화제인 tri-potassium

citrate를 *C. pendulum*의 자엽에 처리하였을 때 캘러스의 necrosis 현상이 감소되고 체세포배 형성이 증가되었다는 (Anthony et al. 2004) 실험결과가 보고된 바 있다.

엽록체 형질전환을 위한 선발 항생제 농도

엽록체 형질전환체 선발 효율이 높다고 알려져 있는 *aadA* (aminoglycoside 3"-adenylyltransferase)는 spectinomycin과 streptomycin에 내성 (Svab and Maliga 1993)을 보이는 특성을 가지고 있으며 이 유전자를 토마토 엽록체 형질전환 선발 마커로 사용하고자 적정 선발 항생제 농도 실험을 수행하였다 (Fig. 2). 본 실험에서는 spectinomycin을 재분화배지에 첨가한 후 토마토 자엽에서의 재분화능을 조사한 결과, spectinomycin 20~25 mg/L 첨가배지에서 재분화가 거의 이루어지지 않는 것으로 나타났기에 토마토 엽록체 형질전환

체 선발 항생제 농도로 spectinomycin 25 mg/L이 적합하다고 사료되었다. Ruf 등 (2001)은 토마토 엽록체 형질전환체를 spectinomycin 500 mg/L에서 선발하였다고 보고한 바 있다. 이러한 결과는 품종에 따른 항생제 민감도에서 기인한 것으로 생각되어지며, 추후 부가적인 실험을 할 예정이다.

카니즘 에 의해 토마토 엽록체 형질전환 벡터 작성 시 필요한 토마토 엽록체 게놈 flanking region을 분리하여 염기 서열 (Fig. 3)을 결정하고 해당부위의 담배 엽록체 DNA sequence와 비교 분석하였다 (Staub and Maliga 1992; Maliga 1993; Maliga et al. 1994; Wakasugi 1998; Kavanagh et al. 1999). 그림 3에서 16S rRNA 와 tRNA (*trnI* and *trnA*) 유전자 sequence는 토마토와 담배 모두 동일하였으며 단, *trnI* 유전자 내에 존재하는 intron의 크기가 토마토에서는 723 bp, 담배에서는 707 bp였으며, *trnA* 유전자 내에 존재하는

토마토 엽록체 게놈 flanking sequence 분석

Homologous recombination에 의한 엽록체 형질전환 메

Tomato	AAAACCCGTCCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTCAGCCAT	80
Tobacco	AAAACCCGTCCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCCGGTCAGCCAT	80
Tomato	ACGGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCCTTTGACACACCCGCCCTCACACTATGGGAGCTGGCCATGCCCGAAGTCGTTACCT	160
Tobacco	ACGGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCCTTTGACACACCCGCCCTCACACTATGGGAGCTGGCCATGCCCGAAGTCGTTACCT	160
Tomato	TAACCGCAAGGAGGGGGATGCCGAAGGCAGGGCTAGTACTGGAGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGACTGGAAGGTGC	240
Tobacco	TAACCGCAAGGAGGGGGATGCCGAAGGCAGGGCTAGTACTGGAGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGACTGGAAGGTGC	240
Tomato	GGCTGGATCACCTCCTTTTTCAGGGAGAGCTAATGCTTGTGGGTATTTTGGTTTGACACTGCTTACACCCCAAAAAA	320
Tobacco	GGCTGGATCACCTCCTTTTTCAGGGAGAGCTAATGCTTGTGGGTATTTTGGTTTGACACTGCTTACACCCCAAAAAA	320
Tomato	AGAAGGGAGCTACGTCTGAGTTAAACTTGGAGATGGAAGTCTTCTTTCTTTTCGACGGTGAAGTAAGACCAAGCTCAT	400
Tobacco	AGAAGGGAGCTACGTCTGAGTTAAACTTGGAGATGGAAGTCTTCTTTCTTTTCGACGGTGAAGTAAGACCAAGCTCAT	400
Tomato	GAGCTTATTATCCTAGGTGCGAACCAAGTTGATAGGACCCCTTTTTTACGTCCCTATGTTCCCCCGGTGTGGCGACATGG	480
Tobacco	GAGCTTATTATCCTAGGTGCGAACCAAGTTGATAGGACCCCTTTTTTACGTCCCTATGTTCCCCCGGTGTGGCGACATGG	480
Tomato	GGGCGAAAAAGGAAAGAGAGGGATGGGGTTTCTCTCGCTTTTGGCATAGCGGGCCCCAGTGGGAGGCTCGCACGACGG	560
Tobacco	GGGCGAAAAAGGAAAGAGAGGGATGGGGTTTCTCTCGCTTTTGGCATAGCGGGCCCCAGTGGGAGGCTCGCACGACGG	560
Tomato	GCTATTAGCTCAGTGGTAGAGCGCGCCCTGATAATTGCGTCGTTGTGCTGGGCTGTGAGGGCTCTCAGCCACATGGGA	640
Tobacco	GCTATTAGCTCAGTGGTAGAGCGCGCCCTGATAATTGCGTCGTTGTGCTGGGCTGTGAGGGCTCTCAGCCACATGGG-A	639
Tomato	TAGTTCAATGTGCTCATCGGCGCCTGACCCTGAGATGTGGATCATCCAAGGCACATTAGCATGGCGTACTCCTCCTGTT	720
Tobacco	TAGTTCAATGTGCTCATCGGCGCCTGACCCTGAGATGTGGATCATCCAAGGCACATTAGCATGGCGTACTCCTCCTGTT	719
Tomato	GAACCGGGGTTTGAACCAAACTCCTCCTCAGGAGGATAGATGGGGCGATTGGGTGAGATCCAATGTAGATCCAACCTT	800
Tobacco	GAACCGGGGTTTGAACCAAACTCCTCCTCAGGAGGATAGATGGGGCGATTGGGTGAGATCCAATGTAGATCCAACCTT	799
Tomato	CGATTCACCTCGTGGGATCCGGGCGTCCGGGGGGACCCACCGCTCCTCTTCTCGAGAATCCATACATCCCTTTATC	880
Tobacco	CGATTCACCTCGTGGGATCCGGGCGTCCGGGGGGACCCACCGCTCCTCTTCTCGAGAATCCATACATCCCTTTATC	879
Tomato	AGTGTATGGACAGCTATCTCTCGAGCACAGGTTTAG GTTCCGGCT CAATGGGAAAAATAAAATGGAGCACCTAACACGCA	960
Tobacco	AGTGTATGGACAGCTATCTCTCGAGCACAGGTTTAG-----CAATGGGAAAAATAAAATGGAGCACCTAACACGCA	950
Tomato	TCTTCACAGACCAAGAAGCTACGAGATCACCCCTTTTCACTTGGGTGACGGAGGGATCGTACCATTGAGCCGTTTTTTT	1040
Tobacco	TCTTCACAGACCAAGAAGCTACGAGATCACCCCTTTTCACTTGGGTGACGGAGGGATCGTACCATTGAGCCGTTTTTTT	1030
Tomato	CTTGACTCGAAAT CGAAAT GGGAGCAGGTTTGA AAAAGGATCTTAGAGTGTCTAGGGTTGGGCCAGGAGGGTCTCTTAAC	1120
Tobacco	CTTGACTCGAAAT-----GGGAGCAGGTTTGA AAAAGGATCTTAGAGTGTCTAGGGTTGGGCCAGGAGGGTCTCTTAAC	1104
Tomato	GCCTCTTTTTTCTTCTCATCGGAGTTATTTTCAAAAAGACTTGGCCAGGGTAAGGAAGAAGGGGGG-AACAAGCACACTTG	1200
Tobacco	GCCTCTTTTTTCTTCTCATCGGAGTTATTTTCAAAAAGACTTGGCCAGGGTAAGGAAGAAGGGGGG-AACAAGCACACTTG	1183
Tomato	GAGAGCGCAGTACAACCGGAGAGTTGTATGCTGCGTTCGGGAAGGATGAATCGCTCCGGAAGGGAAATCTATTGATCTCT	1280
Tobacco	GAGAGCGCAGTACAACCGGAGAGTTGTATGCTGCGTTCGGGAAGGATGAATCGCTCCGGAAGGGAAATCTATTGATCTCT	1263
Tomato	CCCAATTGGTTGGACCGTAGGTGCGATGATTTACTTACCGGGCGAGGTCTCTGGTTCAAGTCCAGGATGGCCAGCTGCG	1360
Tobacco	CCCAATTGGTTGGACCGTAGGTGCGATGATTTACTTACCGGGCGAGGTCTCTGGTTCAAGTCCAGGATGGCCAGCTGCG	1343
Tomato	CCAGGGAAAAAGATAAAGAAGCATCTGACTACTTATGCATGCTCCACTTGGCTCGGGGGGATATAGCTCAGTTGGTAT	1440
Tobacco	CCAGGGAAAAAGATAAAGAAGCATCTGACTACTTATGCATGCTCCACTTGGCTCGGGGGGATATAGCTCAGTTGGTAT	1423
Tomato	AGCTCCGCTCTTGAATGGGTGCGATTACGGGTTGGATGTCTAATTGTCCAGGCGGTAATGATAGTATCTTGTAC	1520
Tobacco	AGCTCCGCTCTTGAATGGGTGCGATTACGGGTTGGATGTCTAATTGTCCAGGCGGTAATGATAGTATCTTGTAC	1503
Tomato	CTGAACCGGTGGCTCACTTTTTCTAAGTAATGGGGAAGAGGACCGAAACGTGCCACTGAAAGACTCTACTGAGACAAGA	1600
Tobacco	CTGAACCGGTGGCTCACTTTTTCTAAGTAATGGGGAAGAGGACCGAAACGTGCCACTGAAAGACTCTACTGAGACAAGA	1583
Tomato	TGGGCTGTCAAGAACGTAGAGGAGGTAGGATGGGCAGTTGGTCAAGTCTAGTATGGATCGTACATGGACGGTAGTTGGAG	1680
Tobacco	TGGGCTGTCAAGAACGTAGAGGAGGTAGGATGGGCAGTTGGTCAAGTCTAGTATGGATCGTACATGGACGGTAGTTGGAG	1663
Tomato	TCGGCGGCTCTCCAGGGTTCCCTCATCTGAGATCTCTGGGGAAGAGGATCAAGTTGGCCCTTGCGAACAGCTTGATGCA	1760
Tobacco	TCGGCGGCTCTCCAGGGTTCCCTCATCTGAGATCTCTGGGGAAGAGGATCAAGTTGGCCCTTGCGAACAGCTTGATGCA	1743
Tomato	CTATCTCCCTTCAACCCCTTTGAGCGAAATGCGGCAAAAGAAAGGAAAGAAATCCATGGACCGACCCCATCATCTCCAC	1840
Tobacco	CTATCTCCCTTCAACCCCTTTGAGCGAAATGCGGCAAAAGAAAGGAAAGAAATCCATGGACCGACCCCATCATCTCCAC	1823
Tomato	CCCGTAGGAACACTACGAGATCACCCCAAGGACGCCTTCGGCATCCAGGGGTACGGACCGACCATAGAACCCTGTTCAATA	1920
Tobacco	CCCGTAGGAACACTACGAGATCACCCCAAGGACGCCTTCGGCATCCAGGGGTACGGACCGACCATAGAACCCTGTTCAATA	1903
Tomato	AGTGGAACGCATTAGCTGTCCGCTCTCAGGTTGGGCAGTCAGGGTCGGGAGAGGGCAATGACTCATTCTT AAAACCCAGCG	2000
Tobacco	AGTGGAACGCATTAGCTGTCCGCTCTCAGGTTGGGCAGTCAGGGTCGGGAGAGGGCAATGACTCATTCTT-----AGCG	1973
Tomato	TTCTTAAGACCAAAGAGTCGGGCGGAAGGGGGGAAAGCCCTCCGTTCTCGTGTAGTTGGATCTCCGGAACC	2080
Tobacco	-----	
Tomato	ACAAGAATCCTT AGTTAGAATGGGATCCAACCTCAGCACCTTTTGGAGTGAATTTTGAAGAAGGTTGCTCTTTGGAGAGC	2160
Tobacco	-----AGTTAGAATGGGATCCAACCTCAGCACCTTTTGGAGTGAATTTTGAAGAAGGTTGCTCTTTGGAGAGC	2041
Tomato	ACAGTACGATGAAAGTTGTAAGCTGTGTTCCGGGGGGAGTTATTGTCTATCGTTGGCCTCTATGGTGAATCAGTCGGGG	2240
Tobacco	ACAGTACGATGAAAGTTGTAAGCTGTGTTCCGGGGGGAGTTATTGTCTATCGTTGGCCTCTATGGTGAATCAGTCGGGG	2121
Tomato	GACCTGAGAGGGCGGTGTTTACCCTGCGGGCGGATGTCCAGCGGTTGAGTCCGCTTATCTCCAACCTCGTG	2310
Tobacco	GACCTGAGAGGGCGGTGTTTACCCTGCGGGCGGATGTCCAGCGGTTGAGTCCGCTTATCTCCAACCTCGTG	2190

Fig. 3 Alignment of nucleotide sequences of flanking region used for plastid transformation vector from the plastid DNAs of *L. esculentum* and *N. tabacum*. A bold indicates that a nucleotide is only present in *L. esculentum*. A dash indicates that a nucleotide that is absent from a sequence. The *N. tabacum* plastid DNA sequences reported in this figure have been deposited in the EMBL nucleotide sequence databases with the accession number Z00044

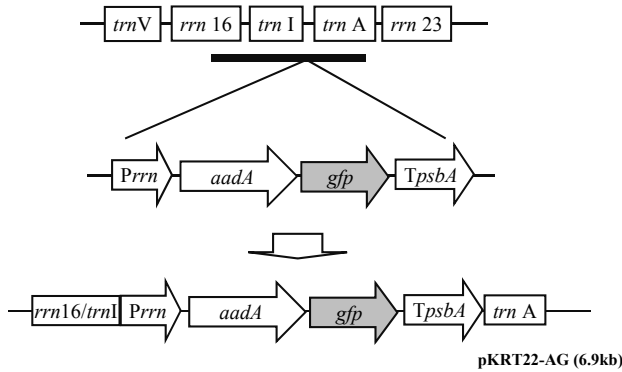


Fig. 4 Construction of tomato chloroplast expression vector. Chloroplast border region for homologous recombination. The spectinomycin resistance (*aadA*) and *gfp* gene and chloroplast genes *rrn16*, *trnI* and *trnA* are shown

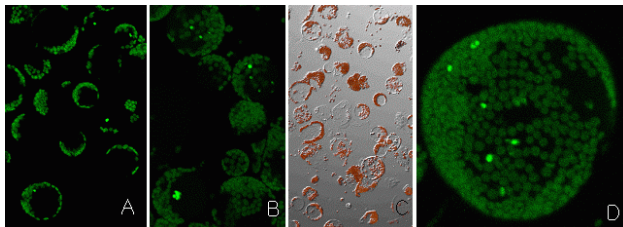


Fig. 5 Confocal laser scanning microscopy images of chloroplast expressing GFP of pKRT22-AG on protoplast cell in tomato. A: DNA 0.5 $\mu\text{g}/\text{shot}$; B: DNA 1 $\mu\text{g}/\text{shot}$; C: DNA 2 $\mu\text{g}/\text{shot}$; D: DNA 1 $\mu\text{g}/\text{shot}$. One milligram of 0.6 μm gold particle used for one shot. Target distance was 9 cm

intron의 크기는 토마토가 809 bp, 담배에서는 709 bp로 토마토 엽록체 DNA의 intron의 크기가 담배보다 크다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Palmer 등 (1987, 1988)이 보고한 바와 같이 엽록체 DNA sequence 간의 homology가 높았으며, 특히 structural gene의 homology가 매우 높다는 것을 알 수 있었다.

토마토 엽록체 형질전환을 위한 유전자총 조건

엽록체 형질전환 벡터 pKRT22-AG (Fig. 4)를 토마토 자엽에 bombardment 할 때의 조건을 구명하고자 DNA농도, particle gold양, target distance를 달리하여 처리한 후, 48시간이 지난 후 자엽으로부터 원형질체를 추출하여 GFP 발현 여부를 조사한 결과, DNA 농도가 0.5 $\mu\text{g}/\text{shot}$ 에서는 GFP 발현 엽록체 개수가 1-2개로 저조한 반면, DNA 농도가 2 $\mu\text{g}/\text{shot}$ 에서는 gold와 엉키어서 세포를 손상시켜 죽게 하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5). 그리고 GFP가 정확하게 엽록체 내에서만 발현되는 것을 관찰하였고, 이를 통해 토마토 엽록체 형질전환용 벡터가 잘 만들어졌음을 알 수 있었다. 또한 gold 양을 증가하였을 때 DNA 농도 증가와 비슷한 경향을 나타내었다 (data not shown).

Target distance가 6 cm인 경우 거의 터져서 죽는 것이 관찰되었고, 12 cm인 경우 GFP 발현이 거의 관찰되지 않았다 (data not shown). 따라서 토마토 엽록체 형질전환을 위한 적정 유전자총 조건으로는 1 bombardment의 경우 DNA 농도 1 μg , 0.6 μm gold particle 1 mg, target distance 9 cm가 효과적이었다고 사료되었으며, 이 결과는 담배 엽록체 형질전환의 유전자 총 조건 (Lee et al. 2003; Roh et al. 2006) 과 같음을 알 수 있었다. 본 실험을 통해 얻어진 토마토 엽록체 형질전환용 벡터 및 형질전환 조건은 토마토 엽록체 형질전환체를 생산하는데 매우 효과적일거라 사료되었다.

적 요

국립원예특작과학원에서 분양받은 토마토 18계통을 공시하여 재분화가 잘되는 적정 품종을 탐색한 결과, 계통번호 2001-58에서의 재분화율이 93%로 양호하였다. 또한 식물체로의 재분화 과정에서 보여 지는 갈변현상과 phenolic compound에 의한 식물조직의 괴사현상을 막기 위하여 항산화제인 ascorbic acid와 cystein을 단독 또는 혼용으로 첨가한 후 토마토 재분화에 미치는 영향을 살펴본 결과, ascorbic acid 200~300 $\mu\text{M}/\text{L}$ 처리구에서 줄기형성을 및 생체중이 증가되는 현상을 관찰할 수 있었다. 토마토 엽록체 형질전환체 선별을 위해 spectinomycin의 적정 농도를 살펴본 결과, 재분화배지에 spectinomycin 20~25 mg/L 농도가 첨가되어진 처리구에서 재분화가 거의 이루어지지 않았다. 토마토 엽록체 형질전환을 위해 토마토 엽록체 게놈 일부를 분리하여 염기서열을 분석하여 담배와 비교 분석한 결과, homology가 매우 높음을 알 수 있었다. Homologous recombination에 의한 엽록체 형질전환이 되기 위해서 분리한 토마토 엽록체 게놈 일부를 border sequence로 이용하였고, transient assay를 위해 GFP 유전자가 포함된 토마토 엽록체 형질전환용 운반체 pKRT22-AG를 제작하였다. Bombardment를 한 후 원형질체를 추출하여 공초점 현미경하에서 관찰한 결과 엽록체 내에서만 GFP가 발현됨을 알 수 있었으며, DNA 농도 1 μg , 0.6 μm gold particle 1 mg, target distance 9 cm 조건이 가장 좋았다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 기관과유과제 (PJ006704, PJ006776)와 프론티어과제 (CG2141)에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Anthony JM, Senaratna T, Dixon KW, Sivasithamparam K (2004) The role of antioxidants for initiation of somatic embryos with *Conostephium pendulum* (Ericaceae). *Plant Cell Tiss Org Cult* 78:247-252
- Cerutti H, Osman M, Grandoni P, Jagendorf AT (1992) A homolog of *Escherichia coli* RecA protein in plastids of higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8068-8072
- Cortina C, Culianez-Macia FA (2004) Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell Tiss Org Cult* 76: 269-275
- Daniell H, Datta R, Varma S, Gray S, Lee SB (1998) Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnology* 16:345-348
- Daniell H (2002) Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nature Biotechnology* 20:581-586
- DeCosa B, Moar W, Lee SB, Miller M, Daniell H (2001) Overexpression of the Bt *cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Biotechnology* 19:71-74
- Dufourmantel N, Pelissier B, Garcon F, Peltier G, Feullo JM, Tissot G (2004) Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Molecular Biology* 55:479-489
- Fernandez-San, MA, Mingo-Castel A, Miller M, Daniell H (2003) A chloroplast transgenic approach to hyper express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnology J* 1:71-79
- Giddings G, Allison G, Brooks D, Carter A (2000) Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnol* 18:1151-1155
- Hou BK, Zhou YH, Wan LH, Zhang ZL, Shen GF, Chen ZH, Hu ZM. (2003) Chloroplast transformation in oilseed rape. *Transgenic Res* 12:111-114
- Iamtham S, Day A (2000) Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nat Biotechnol* 18:1172-1176
- Kavanagh TA, Thanh ND, Lao NT, McGrath N, Peter SO, Horvath EM, Dix PJ, Medgyesy P (1999) Homologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. *Genetics* 152:1111-1122
- Kota M, Daniell H, Varma S, Garczynski SF, Gould F, Moar WJ (1999) Overexpression of the *Bacillus thuringiensis*(Bt) *Cry2Aa2* protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1840-1845
- Kumar, S, Dhingra A, Daniell H (2004) Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Molecular Biology* 56:203-216
- Lee SB, Kwon HB, Kwon SJ, Park SC, Jeong MJ, Han SE, Byun MO, Daniell H (2003) Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. *Mol Breed* 11:1-13
- Maliga P (1993) Towards plastid transformation in flowering plants. *Tibtech* 11:101-107
- Maliga P, Staub J, Carrer H, Kanewski I, Svar Z (1994) Homologous recombination and integration of foreign DNA in plastids of higher plants. In: *Homologous Recombination and Gene Silencing in Plants*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands
- McBride KE, Svab Z, Schaaf DJ, Hogan PS, Stalker DM, Maliga P (1995) Amplification of a chimeric Bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio/Technology* 13:362-365
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Palmer JD, Osorio B, Aldrich J, Thompson WF (1987) Chloroplast DNA evolution among legumes: Loss of a large inverted repeat occurred prior to other sequence rearrangements. *Curr Genet* 11:275-286
- Palmer JD, Osorio B, Thompson WF (1988) Evolutionary significance of inversions in legume chloroplast DNAs. *Curr Genet* 14:65-74
- Roh KH, Shin KS, Lee YH, Seo SC, Park HG, Daniell H, Lee SB (2006) Accumulation of sweet protein monellin is regulated by the *psbA* 5'UTR in tobacco chloroplasts. *Journal of Plant Biology* 49:34-43
- Ruf S, Hermann M, Berger I, Carrer H, Bock R (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat Biotechnol* 19:870-875
- Sidorov VA, Kasten D, Pang SZ, Hajdukiewicz PT, Staub JM, Nehra NS (1999) Technical advance: stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J* 19:209-216
- Sikdar SR, Serino G, Chaudhuri S, Maliga P (1998) Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 18: 20-24
- Staub JM, Graves B, Graves J, Hajdukiewicz PT, Hunter P, Nehra N, Paradkar V, Schlittler M, Carroll JA, Spatola L, Ward D, Ye G, Russell DA (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol* 18:333-338
- Staub JM, Maliga P (1992) Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. *The Plant Cell* 4:39-45
- Svab Z, Maliga P (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:913-917
- Wakasugi T, Sugita M, Tsudzuki T, Sugiura M (1998) Updated gene map of tobacco chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology Reporter* 16:231-241