J Plant Biotechnol (2011) 38:308-314
DOI:http://dx.doi.org/10.5010/JPB.2011.38.4.308

Research Article

Agrobacterium 공동배양을 이용한 포도 재분화율 향상과 GUS 유전자의 발현

김세희† · 김정희† · 김기옥 · 도경란 · 신일섭 · 조강희 · 황해성

GUS gene expression and plant regeneration via co-culturing with *Agrobacterium* in grapevine (*Vitis vinifera*)

Se Hee Kim† · Jeong-Hee Kim† · Ki Ok Kim · Il Sheob Shin · Kang-Hee Cho · Hae Seong Hwang

Received: 5 December 2011 / Accepted: 12 December 2011
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Efficient transformation and regeneration methods are a priority for successful application of genetic engineering to vegetative propagated plants such as grape. In this study, methods for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and plant regeneration of grapevine (*Vitis vinifera*) were evaluated. Tamnara, Heukgoosul, Heukbosek, Rizamat were co-cultivated with *Agrobacterium* strains, LBA4404 containing the vector pBI121 carrying with CaMV 35S promoter, GUS gene as reporter gene and resistance to kanamycin as selective agent. Seven percent of the maximum regeneration frequency was obtained from co-cultivated with explants from Rizamat with LBA4404 strain on selection medium with kanamycin. The addition of acetosyringone, 200 μm in virulence induction step was a key factor for successful GUS reporter gene expression in grapevine transformation. Transgenic plants showed resistance to kanamycin and the GUS positive response in leaf (T_0) stem (T_0) and petiole (T_0).

서 론

포도는 5,000여 년 전부터 인류가 재배해 온 가장 오래된 과수로서 현재 전 세계 과일 총 생산량의 1/3을 차지할 정도로 인간 생활과 밀접한 관계에 있으며, 주로 생식용, 건포도용, 양조용 및 주스용으로 이용되고 있다. 포도 (*Vitis* spp.)는 식물 분류학상 포도과 (Vitaceae) 포도속 (*Vitis*)에 속하는 덩굴성 식물로 약 60종이 존재한다 (Olmo 1976). 포도 속 식물은 북반구의 온대 및 아열대 지역에 40 ~ 50종이 분포되어 있으며 현재 재배 품종과 관계 있는 것은 10여 종이다 (Schneider et al. 2001). 이들은 원생지에 따라 아시아 서부 원생, 아시아 동부 원생, 북미대륙 원생으로 분류된다. 이 중 북미대륙 원생의 것이 가장 많고 다음이 아시아 동부 원생이며 아시아 서부 원생은 1종밖에 없다. 그러나 현재 생식 및 가공용으로 재배되는 포도 품종은 대부분 서부 원생인 유럽 종으로 세계 포도 생산의 98.5%를 차지하고 있다 (Moreno-Sanz et al. 2011). 나머지는 미국 종 포도로서 북미대륙 원생종에서 선발한 품종, 그리고 이들과 유럽 종을 교잡하여 얻은 품종들이다. 야생종 포도를 생식용, 가공용 및 대목 품종 육종에 이용하고 있거나 그 이용성을 검토하고 있어 (Ledbetter and Ramming 1989), 교배 육종으로 창출되는 변이의 폭을 넓히고 있으나 배수성이 다양하고 자식열세 현상이 나타나며, 무핵 품종에서와 같이 종자가 형성되지 않은 경우도 있어서 교배육종이 쉽지 않다 (Gray and Meredith 1992). 따라서 유전자원을 유지·보존하는데 있어서 유전자원의 분류 및 특성을 정확히 파악하는 것이 중요하며(Moreno-Sanz et al. 2008), 형질전환을 이용한 분자육종에 대한 관심과 연구가 함께 진행되어 왔다. 형질전환에 의한 품종 개발은 목적하는 형질의 유전자를 직접 도입하기 때문에 시간의 단축뿐만 아니라 새로운 품종을 만드는 데도 매우 효과적이라 할 수 있다. 국내에서 과수 형질전환 연구 동향을 보면 2000년에 최초로 사과에서 형질전환 성공사례가 보고되었다 (Song and Seong 2000). *Agrobacterium*을 이용한 사과 형질전환 효율에 영향을 미치는 요인들에 대해서 상당한 연구가 수행되었는데, 접종에 사용하는 식물체 기원 (Song et al. 2001), 균주의 밀도와 활력 및 균

†These authors contributed equally to this work.

S. H. Kim (✉) · J.-H. Kim · K. O. Kim · I. S. Shin · K.-H. Cho · H. S. Hwang
농촌진흥청 국립원예특작과학원
(National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 440-706, Korea)
e-mail: ezsehee@korea.kr

주 밀도와 품종과의 작용 (Seong et al. 2003), 공동배양 단계에서의 acetosyringone 농도 및 배양기간 (Seong and Song 2008), 재분화 과정에서의 선발강도 및 에틸렌 발생 (Seong et al. 2005)등이 중요하게 작용하는 것으로 밝혀졌다. 포도의 경우 Nakano 등 (1994)에 의해 포도에서 *Agrobacterium* 형질전환 보고가 이루어진 이래 형질전환에 대한 많은 연구가 보고되어 왔다 (Dhekney et al. 2009). 이러한 많은 연구에도 불구하고 주요 재배 품종의 재분화 체계가 아직 확립되어 있지 못하고, 또한 국내에서도 포도 재분화 연구 (Kwon et al. 2000)에 이어, 포도 세포현탁배양계를 이용한 anthocyanin생합성 연구 (Choi et al. 2004), 포도 생물반응기 배양에서 접종밀도가 미치는 영향 (Choi et al. 2008) 에 대한 보고가 있었지만, 아직까지 포도 형질전환에 대한 성공사례가 보고된 바는 없다 (Lee 2007). 형질전환을 통한 외래 유전자의 도입은 대부분 기내에서 세포배양의 과정을 거쳐 이루어지기 때문에 식물의 세포나 조직을 이용한 형질전환 연구가 성공적으로 수행되기 위해서는 조직배양체계의 확립이 선행되어야 한다. 또한 식물형질전환이 어려운 작물의 경우 일반적으로 선발마커의 최적화, 배양재료의 선택, *Agrobacterium*의 최적공동배양조건 및 항산화제 등과 같은 형질전환효율을 증가시키기 위한 연구가 더욱 요구된다 (Olhoft and Somers 2001). 본 연구에서는 포도의 형질전환 체계 확립을 위하여 재분화 효율 향상을 위한 조건 및 *Agrobacterium* 형질전환 방법을 이용한 포도 품종 리자마트에 대한 GUS reporter gene의 도입 조건을 구명하고자 하였다.

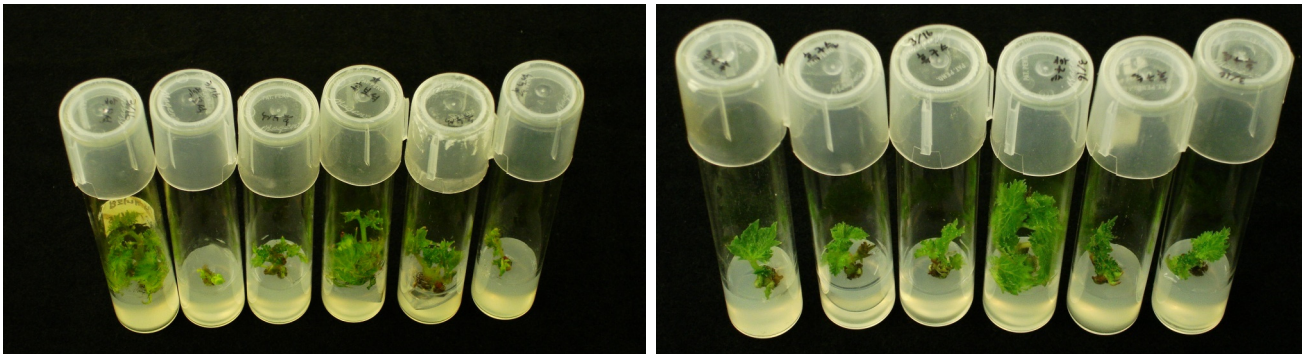
재료 및 방법

식물재료

본 연구에 사용한 재료는 농촌진흥청 국립원예특작과학원에서 보존 중인 포도 4품종을 이용하였다. 국내육성품종인 탐나라, 흑구슬, 흑보석과 도입 품종인 리자마트를 기내 도입하여, 유지 증식시킨 식물체를 공시하였다 (Fig. 1). 1년생 휴면지를 채취하여 약 30 cm길이로 잘라 polyethylene film으로 포장하여 5℃에서 8주간 저온 처리하여 휴면을 타파시켰다. 약 10 cm 길이의 삽수를 수삽하여 발생한 신초를 3cm길이로 잘라 중성세제로 세척한 다음 1.0%의 sodium hypochlorite 용액에서 1분간 3회씩 살균하였다. Clean bench 내에서 멸균수로 완전히 세척한 후 생장점 부위를 채취하여 BA 1 mg/L, sucrose 30 g/L이 첨가된 MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지에 접종하여 다신초를 유도하였고, 이들을MS배지에 무기염류, BA 1 mg/L, IBA 0.1 mg/L, Sucrose 30 g/L, Plant agar 8 g/L를 첨가한 후에 pH를 5.8로 조정하여 121℃, 1.2 기압에서 15분간 고압멸균하여 사용하였다. 신초 배양은 형광등 아래 25±2℃로 조절되는 배양실에서 2,000 μmol·m^2·sec^1의 광도로 16시간 광주기, 8시간 암주기로 하였다. 신초 계대배양 4주 후에 1~1.5 cm 정도 길이의 신초들을 1/2MS 무기염류에 IBA 0.3 mg/L, Sucrose 15 g/L, Plant agar 8 g/L를 첨가하고 pH를 5.8로 조정한 발근배지로 옮겨 발근을 유도하였다.

Agrobacterium tumefaciens strain과 vector

형질전환에 이용된 pBI121 vector는 선발표지 마커로 NPTII 유전자 (Vancanneyt et al. 1990)를 넣은 expression cassette, CaMV 35S promoter (Jach et al. 1995)와 β-glucuronidase (GUS) reporter gene을 포함하고 있다. Freeze-thaw 방법 (Burrow et al. 1990)으로*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strain (Hoekema et al. 1983)에 형질전환하여 균주로 사용하였다. 박테리아는 액체 YEP 배지 (Nutrient broth 13.3 g/L, Yeast extract 1.0 g/L, Sucrose 5 g/L, MgSO4 0.24 g/L pH 7.5) 50 ml에 항생제 (Rifampicin 100 mg/L, Streptomycin 300 mg/L, Kanamycin 50 mg/L)를 첨가하여 28℃, 220 rpm에서 약 24시간 정도 배양하여 OD_{600} (optical density) 0.8~1.0의 균을 사용하였다. 배양액은 22℃에서 10분 동안 원심분리하고, 회수된



(a) (b)

Fig. 1 Incubation and proliferation in test tube of Heukbosuck (A) and Heukgoosul (B) via nod culture

Table 1 Effect of TDZ and BA concentrations in combination with IBA concentrations on frequency of plant regeneration

Cultivar	Medium A		Medium B		Medium C		Medium D		Medium E		Medium F	
	leaf	petiole	leaf	petiole	leaf	petiole	leaf	petiole	leaf	petiole	leaf	petiole
Kyoho	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1
Tamnara	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1
Heukbosek	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Rizamat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
Thompson seedless	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2

Medium A: MS + Tvitamin + Sucrose + IBA 0.1 mg/L + BA 2 mg/L
Medium B: MS + Tvitamin + Sorbitol + IBA 0.1 mg/L + BA 2 mg/L
Medium C: MS + Tvitamin + Sucrose + IBA 0.1 mg/L + TDZ 5 mg/L
Medium D: MS + Tvitamin + Sorbitol + IBA 0.1 mg/L + TDZ 5 mg/L
Medium E: MS + LSvitamin + Sorbitol + IBA 0.1 mg/L + BA 2 mg/L
Medium F: MS + LSvitamin + Sorbitol + IBA 0.1 mg/L + TDZ 2 mg/L

pellets을 병원성 유도배지 (citric acid 5.88 g/L, sucrose 20 g/L, pH 5.2)에 녹여 OD_{600} 0.7~0.8로 희석하고, acetosyringone 0.2mM과 proline 1.0mM을 첨가하여 접종에 사용하였다.

BA및 Thidiazuron (TDZ)의 혼합처리구가 식물 재분화에 미치는 영향

기내 도입된 식물체를 증식배지로 옮겨 6주 후부터 새로 나온 1~1.5 cm의 정단부 유엽을 사용하여 증식된 식물체의 잎 절편체와 엽병, 줄기를 BA와 TDZ를 조합한 배지 (Table 1)에 각 처리구당 200개씩 치상하였다. 그 후 5주 동안 2000 μmol·m^2·sec^1 광도로 배양한 후 신초 형성률을 측정하였다.

Agrobacterium tumefaciens 형질전환을 위한 조건

포도 형질전환체를 생산하기 위하여 기내 도입된 식물체를 증식배지로 옮겨 6주 후부터 새로 나온 1~1.5 cm의 정단부 유엽을 사용하였다. *Agrobacterium* 현탁배지를 22℃에서 150 rpm으로 배양하여 병원성을 유도·촉진한 뒤, 사각으로 자른 잎 절편체와 엽병, 줄기를 침지하여 22℃에서 150 rpm으로 10분 동안 배양하였다 (Seong et al. 2003). 접종 후, 감염된 잎 절편체와 엽병, 줄기의 접종액을 흡수시킨 뒤, acetosyringone 0.2 mM과 proline 1.0 mM이 첨가된 공동배양 배지 (MS salts, LS vitamin, TDZ 5 mg/L, IBA 0.1 mg/L, sorbitol 30 g/L, Daishin agar 7 g/L, pH 5.8)가 들어있는 페트리디쉬에 각 10개의 절편체를 치상한 후, 온도 25℃, 습도 70%, 암 상태에서 3일간 공동 배양하였다 (Jorge et al. 2011). *Agrobacterium*을 접종하지 않은 잎 절편체는 항생제가 포함되지 않은 배지 (MS salts, LS vitamin, TDZ 5 mg/L, IBA 0.1 mg/L, cefotaxime 350 mg/L, Daishin agar 7 g/L, pH5.8)에 치상하여 형질전환 대조구로 사용하였다. 공동배양 후에 잎 절편체를 항생제가 첨가된 선발 재분화 배지 (TDZ 5 mg/L, kanamycin 100 mg/L, cefotaxime 350 mg/L)에 치상하였고, 4주간 25℃, 암상태에서 배양하였다. 2주 동안 1000 μmol·m^2·sec^1 광도로 배양하고 다음 2주 동안 2000 μmol·m^2·sec^1 광도로 배양하였다. 5주 뒤에 동일 조성의 선발 배지 (TDZ 5 mg/L, kanamycin 100 mg/L, cefotaxime 350 mg/L)로 계대배양하였다. 첫 번째 선발배지로부터 10주 뒤에 재분화 된 신초는 항생제가 없는 증식배지 (MS, BA1 mg/L, IBA 0.3 mg/L, GA3 0.5 mg/L, sucrose 30 g/L, plant agar 8 g/L, pH5.8)에 이식하여 증식시킨 뒤, kanamycin 30 mg/L가 첨가된 증식 배지 (MS, IBA 0.1 mg/L, BA 0.1 mg/L, sucrose 30 g/L, plant agar 8 g/L, pH 5.8)에서 재선발하였다.

B-Glucuronidase (GUS) 발현

*Agrobacterium*과 식물체를 공동 배양 한 후 선발배지에서 6~8주 동안 배양 후 얻은 GUS 발현 형질전환체 (T_0)를 37℃에서 5-bromo-4-chloro-3-indole-glucuronidase 용액에 침지 시켰다 (Jefferson et al. 1987). 24시간 후 70% 알코올 용액으로 탈색 시킨 후 GUS 양성반응을 나타낸 잎 절편체와 엽병, 줄기를 조사하였다. 대조구로서는 *Agrobacterium*과 공동 배양하지 않은 잎, 엽병, 줄기를 사용하였다.

결과 및 고찰

BA 및 TDZ의 혼합처리구와 포도 품종에 따른 식물체 재분화

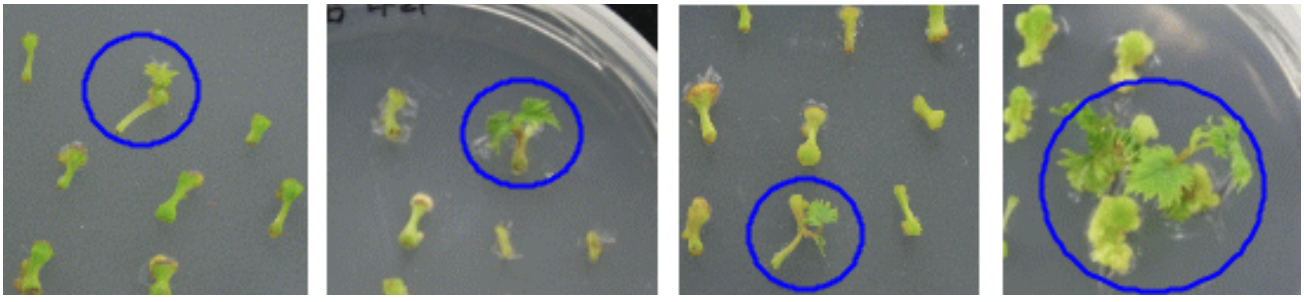
식물체 재분화는 생장조절제의 조성과 절편체의 종류, 배양재료의 유전형 등에 따라 많은 차이가 있다 (Moon et al. 2000). BA 및 TDZ의 혼합처리구가 식물체 재분화에 미치는 영향을 검토한 결과 배지 조성을 MS+LSvitamin+Sorbitol+IBA 0.1 mg/L+BA 2 mg/L로 만든 배지 E와 MS +

Table 2 Effect of explants on frequency of shoot regeneration and number of shoots per explant on the medium E and F

Cultivars	explants	Medium E		Medium F	
		Callus induction (%)	Shoot regeneration (%)	Callus induction (%)	Shoot regeneration (%)
Tamnara	leaf	5	0	70	0
	petiole	0	0	70	0
Heukgoosul	leaf	30	0	25	0
	petiole	0	0	50	0
Heukbosek	leaf	0	0	75	0
	petiole	0	0	100	0
Rizamat	leaf	24	0	54	0
	petiole	20	0	84	7

Table 3 Frequency (%) of GUS expression in leaf, stem, petiole of transgenic plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* strains

Explants	*Agrobacterium* strains and vectors	No. of explants cocultured	No. of GUS expression (%)
Leaf	LBA 4404, PBI121	300	99.00
Stem	LBA 4404, PBI121	300	1.00
petiole	LBA 4404, PBI121	300	0.67



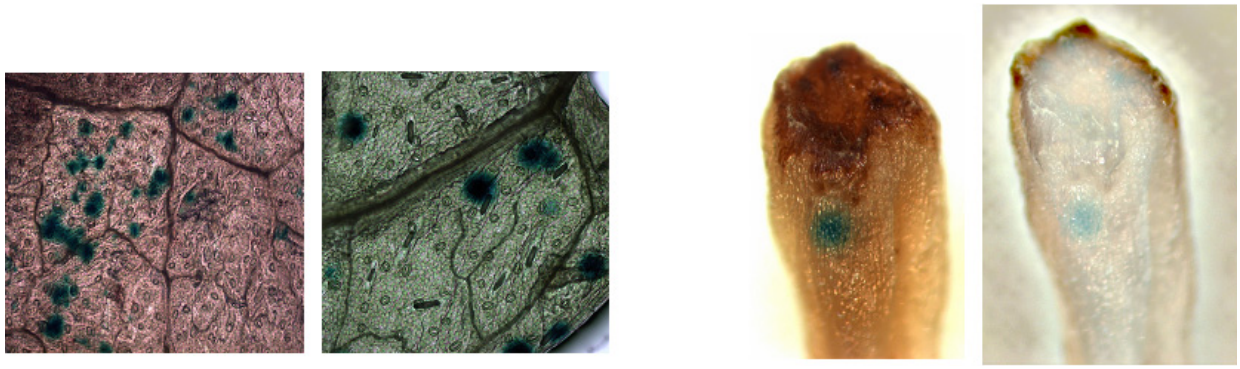
(a) (b) (c) (d)

Fig. 2 Genotypic differences of shoot formation ability in petiole A: Khoho B: Tamnara C: Thompson seedless D: Rizamat

LSvitamin + Sorbitol + IBA 0.1 mg/L + TDZ 2 mg/L로 만든 배지 F 처리구에서 거봉, 탐나라, 흑보석, 리자마트, 탐슨 시들리스의 재분화된 식물체가 많이 관찰되었다 (Table 1). BA 단독 처리구에서 유도된 신초는 외관상 정상적으로 분화하나 신초의 생장이 늦고, TDZ 단독 처리구의 경우는 식물체 재분화 과정에서 외관상 기형을 보인 신초가 발생하였다. 배지 조성에 따른 재분화율 결과를 바탕으로 배지 E와 배지 F에서 탐나라, 흑구슬, 흑보석, 리자마트의 캘러스 형성율과 신초 재분화율을 보았다 (Table 2). BA 2 mg/L을 첨가한 배지보다 TDZ 2 mg/L을 첨가한 배지에서 높은 캘러스 형성율과 신초 재분화율이 관찰되었다. 지금까지 TDZ는 cytokinin과 유사한 역할을 하는 물질로 알려져 있으며 난 (Nayak and Rath 1997)에서 식물체 재분화에 매우 유용하다는 결과가 있었다. 그러나 벼에서는 TDZ을 첨가하면 재분화된 식물체로부터 상당수의 식물이 기형을 보인다는 보고가 있다 (Seo et al. 2002). 따라서 본 연구는 TDZ 2 mg/L 의 처리구가 신초 발생 수와 식물체를 분화시키는 조건에 있어 적합하다고 판단된다. 또한 포도 품종에 따른 신초 재분화 상태를 보면 거봉, 탐나라, 탐슨 시들리스, 리자마트의 엽병에서 재분화된 신초의 크기 및 식물체 형성 정도가 리자마트에서 가장 잘 분화되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). 재분화가 잘 되는 리자마트 품종을 이용해서 *A. tumefaciens*을 이용한 GUS 유전자의 발현 조건을 살펴보았다.

Acetosyringone의 적정농도 조건

*Agrobacterium*을 이용한 포도의 GUS 유전자 발현에 있어서 병원성 유도 배지 내에 첨가되는 acetosyringone의 영향을 조사한 바, acetosyringone이 첨가되지 않은 실험구에서는 GUS 유전자가 발현되는 절편체를 얻을 수 없었으나 100 μM 이상의 acetosyringone 을 병원성 유도 배지에 첨가하였을 경우 GUS 유전자의 발현이 나타났으며 (데이터 미제시), 200 μM의acetosyringone을 처리했을 때 97%로 가장 높은 발현율을 나타냈다 (Table 3). 따라서 포도의 잎을 이용한 GUS유전자 도입 실험에서acetosyringone



(a) (b)

Fig. 3 Explants of Rizamat transformed with Agrobacterium containing GUS reporter gene A: GUS positive response of transgenic leaf B: GUS positive response of transgenic stem

의 적정 농도는 200 μm로 처리해야 효율적임을 알 수 있었다. 일반적으로 쌍자엽 식물에서acetosyringone 첨가에 따른 전처리 유도과정은 유전자 전환 연구에 있어서 단자엽 식물만큼 중요한 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있다. 돌소나무 (*Pinus pinea* L.)의 자엽으로 GUS 유전자 발현을 연구한 결과에서는acetosyringone이 병원성 유도에 그다지 중요하지 않다는 결론을 내렸다 (Humara et al. 1999). Acetosyringone은 식물조직이 상해를 입었을 때 분비되는 페놀물질의 일종으로 *Agrobacterium*의 Ti-plasmid 내의 병원성 유도에 관여하는virulence유전자의 발현 유도에 가장 중요하게 작용하는 요인중의 하나로 알려져 있다. 벼와 같은 단자엽 식물은 *Agrobacterium*이 감염될 때 α-hydroxy-acetosyringone과 같은 페놀물질을 생성하지 않기 때문에 공동배양 배지에acetosyringone을 첨가하는 것이 필수적이라고 보고되어 있으며, 그 농도에 따라 형질전환 효율이 다른 것으로 알려져 있다 (Smith and Hood 1995). *Phalenopsis orchard*의 형질전환에서 공동배양배지에acetosyringone을 첨가했을 때와 첨가하지 않았을 때 형질전환율이 4배 이상 차이가 나는 결과가 보고 된 바 있다 (Belarmino and Mill 2000). 그러므로 식물의 종과 품종에 따라서 식물조직에 상처를 가했을 때 분비되는 페놀물질의 양과 조성에 있어서의 차이가 공동배양단계에서의 식물체 내로의 유전자 전이와도 관계되는 것으로 보여진다. 이러한 결과는 공동배양단계에서 acetosyringone의 첨가가 형질전환율을 증가시키는 데 필수요인임을 나타낸다. 본 연구에서도 acetosyringone이 첨가되지 않은 배지에서 GUS유전자가 발현된 포도의 잎 절편체를 얻을 수 없었으므로 200μm 농도의 acetosyringone 첨가는 포도 유전자 전환 연구에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

*Agrobacterium*을 이용한 포도의 형질전환 적정조건 구명

준비된 잎 절편체와 엽병, 줄기를 공동배양 재료로 사용하였으며, 형질전환 방법은 Jorge 등 (2011)의 방법에 따라 수행하였다. 포도 형질전환 방법은 주로 particle bombardment를 이용해서 유전자를 직접적으로 도입하는 방법 (Vidal et al. 2003)이나 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환방법 등을 토대로 하여 형질전환의 효율을 극대화시키는 방법을 개발하는 방향으로 이루어져 왔다 (Li et al. 2006). 그 중 *Agrobacterium*을 매개로 한 형질전환방법이 많이 이용되며 절편체의 종류에 따라서 다양하게 연구가 진행되었다. 그 외에도 다른 절편체를 이용한 형질전환 효율을 증대시키기 위한 여러 연구 결과가 있었으나, 형질전환 방법의 기본조건은 비슷하였다. 그러나, 세부적으로는 포도의 품종이나 selection marker, 배양조건 및 배지조성 등에서 차이가 있었다. 공동 배양된 포도의 잎 절편체 (300개), 엽병 (300개), 줄기 (300개)에서 엽병으로부터 신초가 발생하였으며, 이들 형질전환체 (T_0)의 잎 절편체와 줄기에서 GUS양성반응을 확인하였다 (Fig. 3). *Agrobacterium*을 이용한 포도의 GUS 유전자 발현 효율에 영향을 미치는 요인 중 박테리아의 농도를 조사하였다. 박테리아의 전처리 배양 농도와 최종 접종 농도는 다음과 같은 차이를 나타냈다. 균의 전처리 배양 농도 A_{600}nm 0.3에서 최종 접종 농도를 A_{600}nm 0.8로 희석하여 접종한 조건에서 GUS 유전자 발현율이 가장 높게 나타났다. 접종농도 A_{600}nm 1.0으로 맞춘 조건에서는 GUS 유전자 발현율이 10% 이하로 나타났다 (데이터 미제시). T-DNA의 식물체 내로의 전이에 영향을 미치는 요인 중 *Agrobacterium*의 농도가 중요하다고 하는 보고가 있는데 (Humara et al. 1999), 박테리아 농도가 A_{600}nm에서 0.8일 때 절편체를 접종하여 실험하면 GUS 유전자의 발현율이 가장 높았다. 이렇듯 A_{600}nm 값의 증가와 감소는 형질전환 효율에 많은 영향을 미친다 (Mondal et al. 2001). 차나무의 형질전환에서는 A_{600}nm 값이 0.8보다 박테리아 농도가 높아지면 형질전환에 적당하지 않고 A_{600}nm 값이 1.0 이상 되면 박테리아의 지나친 생장으로 인해 식물조직에 피해를 입힐

수 있다고 보고하였다. 감귤류의 형질전환에서는 박테리아의 지나친 생장으로 인하여 재분화율이 저하될 수 있고, 공동배양 시 박테리아의 과다 생장을 억제하기 어렵다는 보고가 있다 (Pena et al. 1995). 국내에서는 포도에서 이러한 박테리아의 농도에 따른 외래 유전자나 GUS 유전자의 발현에 대한 보고가 아직 없다. 본 연구에서 나온 결과로 볼 때 식물의 종류 및 품종에 따라 박테리아 농도가 미치는 영향은 현저하게 차이가 나는 것으로 보아, *Agrobacterium*의 최적 농도를 규명해야 형질전환율을 높일 수 있다고 보여진다. 따라서 본 연구에서 밝힌 박테리아의 최적 농도는 앞으로 잎 절편체를 이용한 포도 형질전환 연구에 활용될 수 있을 것으로 생각된다. GUS 발현이 잎, 줄기, 엽병에서 확실하게 나타남으로써 본 연구는 GUS 유전자가 *Agrobacterium* 공동배양에 의해서 식물체 내에 삽입되어 형질전환이 가능하다는 고무적인 결과를 보여주고 있다. Transient expression system은 DNA 전이가 일어난 후 가급적 빠른 시간 내에 유전자 발현 양상을 측정할 수 있고 형질 전환된 세포가 재분화되기 어려운 경우에 독립적으로 유전자 전이를 분석할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 그러나 신초에서 아직 재분화된 식물체(T_1)를 얻지 못하여 유전자 도입을 확인하기 위한 PCR과 Southern 확인이 필요하다. 본 연구에서 공동 배양한 포도 품종의 수와 절편체의 수에 있어서 정확한 빈도 측정을 위해서는 더 많은 배양재료를 사용해야 할 것으로 판단된다. *Agrobacterium* 균주의 감염성은 그 균주의 종류에 따라 그리고 식물의 계통, 품종, 배양재료 및 종에 따라서도 다르게 나타나게 되는데, 예로서 벼의 형질전환 연구에서 품종 간 LBA4404 균주의 감염성이 달라진다는 보고가 있다 (Lee et al. 1999). 지금까지 국내에서 *Agrobacterium* 공동배양법을 이용한 포도의 형질전환에 대한 결과는 아직 보고된 바가 없다. 본 연구에서는 포도 도입품종인 리자마트에서 형질전환 조건을 규명하였고 이러한 결과들은 포도의 조직배양 효율 향상에 직접 이용될 수 있을 뿐만 아니라 조직배양 기법을 이용한 포도의 형질전환 효율 향상에도 매우 유익하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

인용문헌

Belarmino MM, Mill M (2000) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a phalenopsis orchard. Plant Cell Rep 19:435-442

Burrow MD, Chlan CA, Sen P, Murai N (1990) High frequency generation of transgenic tobacco plants after modified leaf disk cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol Biol Rep 8:124-139

Choi KS, Kim SK, IN JG, Shin DH (2004) Phytochrome signal transduction regulates anthocyanin biosynthesis in cell suspernsion cultures of *Vitis vinifera*. J Plant Biotechnol 35:127-132

Choi EJ, Hahn EJ, Paek KY (2008) Plantlet growth, leaf stomata and photosynthesis of grape rootstock '5BB' as affected by inoculums density in bioreactor cultures. Korean J Plant Biotechnol 31:239-248

Dhekney SA, Li ZT, Zimmerman TW, Gray DJ (2009) Factors influencing genetic transformation and plant regeneration of Vitis. Am J Enol Vitic 60:285-292

Gray DJ, Merdith CP (1992) Grape biotechnology, In: Hammerschlag FA, Litz RE (eds) Biotechnology in perennial fruit crops. CAB International Wallingford, UK pp 229-262

Hoekema A, Hirsh PR, Jooykaas PJJ, Schilperoort RA (1983) A binary plant vector strategy based on separatin of vir-and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature 303:179-180

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

Jach G, Gornhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf E, Leah R, Schell J (1995) Enhanced Quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley angifungal proteins in tobacco. Plnat J 8:101-113

Jefferson RA, Kavanaugh TA, Bevan NH (1987) GUS fusions: β-glucuroindase as a sensitive and versatile gene fusion marker for higher plants. EMBO J 6:3901-3907

Jorge G, Jacqueline GP, Pedro PG (2011) Vascular-specific expression of CUS and GFP reporter genes in transgenic grapevine (Vitis vinifera L. cv. Albarino) conferred by the EGCCR promoter of Eucalyptus gunnii. Plant Physiol Biochem 49:413-419

Kwon YJ, Lee CH, Hyung NI (2000) Effects fo medium composition and culture condition on plant regeneration via organogenesis of Kyoho grape. J Kor Soc Hort Sci 41:276-280

Ledbetter CA, Ramming DW (1989) Seedless in grapes. Hort Rev 11:159.184

Lee CH (2007) Grape genetic transformation. P. 391-403. In; Han JH et al. (eds.) Plant genetic transformation, Jungmunkag, Korea

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

LI ZT, Dhekney S, Dutt M, Van Aman M, Tattersall J, Kelley KT, Gray DJ (2006) Optimizing *Agrobacterium*-mediated transformation of grapevine. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 42:220-227

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 Pet 20:712-720

Moon JG, Choo BK, Doo HS, Kwon TH, Yanh MS, Ryu JH (2000)

Effect of growth regulators on plant regeneration from the cotyledon explants in Oriential Melon (*Cucumis melo* L.). Kor J Plant Tiss Cult 27:1-6

Moreno-Sanz P, Loureiro MD, Suarez B (2011) Microsatellite characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) genetic diversity in Asturias (Northern Spain). Sci Hortic 129:433-440

Moreno-Sanz P, Suarez B, Loureiro D. (2008) Identification of synonyms and homonyms in grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) from Ausurias (Spain). J Hort Sci & Biotech 83:683-688

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497

Nakano M, Hoshino Y, Mii M (1994) Regeneration of transgenic plants of grapevine (Vitis vinifera L.) via *Agrobacterium* rhizogenes-mediated transformation of embryogenic calli. J Exp Bot 45:649-656

Nayak PS, Rath SP (1997) Direct shoot regeneration from foliar explants of anepiphytic orchid, *Acampe praemorsa* (*Roxb*.) *Blatter* and *McCann*. Plant Cell Rep 16:583-586

Olhoft PM, Somers DA (2001) L-cysteine increase *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. Plant Cell Rep 20:706-711

Olmo HP. 1976. Grapes. In: Simmonds NW (ed) Evolution of crop plants. Longman, London. pp 294-298

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

Schneider A, Carra A, Akkak A, This P, Laucou V, Botta R (2001) Verifying synonymies between grape cultivars from France and Northwestern Italy using molecular markers. Vitis 40: 197-203

Seo MS, Bae CH, Choi DO, Rhim SL, Seo SC, Song PS, Lee HY (2002) Investigation of transformation evviciency of rice using *Agrobacterium* tumefaciens and high transformation of GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase) gene relative to chilling tolerance. Korean J Plant Biotechnology 29:85-92

Seong ES, Cha JE, Park SW, Yu CY, Song KJ (2003) The effect of *Agrobacterium* density on transformation efficiency in apple. Korean J Plant Biotechnol 30:215-219

Seong ES, Song KJ, Sung J, Yu CY, Chung IM (2005) Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine affect Agrobacterium mediated apple transformation. Plant Growth Regul 45:75-82

Seong ES, Song KJ (2008) Factors affecting the early gene transfer step in the development of transgenic Fuji apple plants. Plant Growth Regul 54:89-95

Song KJ, Seong ES (2000) Kanamycin concentration for selection of McIntosh Wijcik transgenic apple. Kor J Hort Sci Technol 18:811-814

Song KJ, Soing ES, Hwang JH, Jegal S, Cha JE, Kim JH, Shin YU (2001) Factors affecting the Agrobacterium mediated transformation of 'Gala' apple. Kor J Plant Tiss Cult 28:221-225

Smith RH, Hood EE (1995) Review and interpretation: *Agrobacterium* tumefaciens transformation of monocotyledons. Crop Sci 301-309

Vancanneyt G, Schimidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M (1990) Construction of an intron containing marker gene: Splicing of an intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium-mediated plant transformation. Mol Gen Genet 220:245-250

Vidal JR, Kikkert JR, Wallace PG, Reisch BI (2003) High-efficiency biolistic co-transformation and regeneration of 'Chardonnay' (Vitis vinifera L.) containing npt-II and antimicrobial peptide genes. Plant Cell Rep 22:252-260