

*Agrobacterium*에 의한 오이 형질전환에서 자엽절 절편의 이용

장현아 · 김현아 · 권석윤 · 최동욱 · 최필선

The use of cotyledonary-node explants in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.)

Hyun A Jang · Hyun A Kim · Suk Yoon Kwon · Dong Woog Choi · Pil Son Choi

Received: 29 June 2011 / Accepted: 30 July 2011
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract *Agrobacterium tumefaciens*-mediated cotyledonary-node explants transformation was used to produce transgenic cucumber. Cotyledonary-node explants of cucumber (*Cucumis sativus* L. cv., Eunsung) were co-cultivated with *Agrobacterium* strains (EHA101) containing the binary vector (pPZP211) carrying with CaMV 35S promoter-*nptII* gene as selectable marker gene and 35S promoter-DQ gene (unpublished data) as target gene. The average of transformation efficiency (4.01%) was obtained from three times experiments and the maximum efficiency was shown at 5.97%. A total of 9 putative transgenic plants resistant to paromomycin were produced from the cultures of cotyledonary-node explants on selection medium. Among them, 6 transgenic plants showed that the *nptII* gene integrated into each genome of cucumber by Southern blot analysis.

Keywords *Agrobacterium*, cotyledonary-node, paromomycin, transgenic cucumber

H. A. Jang · P. S. Choi (✉)
남부대학교 약용식물형질전환연구소
(Department of Oriental Pharmaceutical Development, Nambu University, Gwangju 506-824 Korea)
e-mail: cps6546@hanmail.net

H. A. Kim · S. Y. Kwon
한국생명공학연구원
(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 52 Eoeun-dong, Daejeon 305305, Korea)

D. W. Choi
전남대학교 생물교육과
(Department of Biological Education, Jeonnam National University 500-758, Gwangju, Korea)

서론

오이는 미국, 아시아 및 유럽을 중심으로 열대와 아열대 지방에서 재배되는 주요 박과 작물로 식용채소뿐 아니라 피부 미용에도 사용되는 중요한 경제작물로서 국내 소비량이 점차 증가되고 있다. 오이 형질전환연구는 모자이크 바이러스 (CMV) 및 zucchini yellow 모자이크 바이러스 (Boyhan et al. 1992; Nishibayashi et al. 1996) 등 주요 박과 작물의 생산성을 감소시키는 원인을 분자유종학적으로 극복할 수 있을 뿐 아니라 환경스트레스유전자 (TPSP, trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase)와 같은 유용유전자 도입을 가능하게 함으로서 (Kim et al. 2010) 신 품종육성과 오이의 생산량 증대를 기대할 수 있을 것이다. 초기 오이 형질전환은 *Agrobacterium rhizogenes*에 의해 이루어진 이후 (Trulson et al. 1986) 형질전환을 위한 배양 재료로서 배축, 엽병, 잎 및 자엽 절편 등을 이용한 기관발생 (Dong et al. 1991)과 체세포배 발생을 통하여 (Chee 1990) 이루어져 왔고, 형질전환 효율을 개선하기 위하여 새로운 선발 마커의 개발에 대한 연구 (Dong et al. 1991; Reed et al. 2001)가 이루어져 왔다. 그러나 기 연구에서 개발된 형질전환시스템의 경우 실험의 재현성, 높은 chimeric 형질전환체의 발생빈도, *nptII*선발마커의 비 효율성 등 많은 문제점이 보고되어 왔고 (Gaba et al. 2004), 최근 이러한 문제점을 해결하기 위하여 제초제에 저항성을 나타내는 *bar*유전자를 선발 마커로 이용하거나 (Cho et al. 2005a) 단세포 발생기원을 갖는 체세포배발생을 이용한 형질전환시스템 (Kim et al. 2008) 그리고 배양재료로서 stem-node를 이용하는 연구 (Miao et al. 2009) 등이 이루어져 왔다. 그러나 오이 형질전환 연구는 아직까지도 낮은 형질전환빈도와 genotype의존성 때문에 매우 까다로운 작물로 알려져 있을 뿐 아니라, 대부분의 경우 국내외 소수

연구그룹을 중심으로 이루어지고 있기 때문에 새로운 오이의 형질전환방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

식물형질전환이 어려운 작물의 경우 일반적으로 배양재료의 선택, 선발 마커의 최적화, *Agrobacterium*의 최적 공동배양조건 및 항산화제 등과 같은 형질전환효율을 증가시키기 위한 연구가 더욱 요구된다 (Somers et al. 2003). 배양재료에 대한 가장 좋은 예로서 대두의 경우 배축, 잎, 자엽, 미숙배가 아닌 자엽절 절편을 이용하여 성공적으로 형질전환방법을 확립되었고 (Clemente et al. 2000), 이 방법은 현재 체세포배발생을 통한 형질전환방법 (Finer and Finer 2000)과 더불어 대두의 유전자 기능연구와 신 품종 개발에 중요하게 이용되고 있다. 대두의 자엽절 절편 공동배양법은 배양기간을 단축하여 배양환경으로부터 받는 스트레스를 최소화 함으로서 배양체의 불임현상을 줄일 수 있고, 체세포배발생이나 기관발생과 같은 특정 genotype에 국한되는 단점을 극복할 수 있기 때문에 (Clemente et al. 2000) 매우 중요한 방법이라 할 수 있다. 특히 그 동안 자엽절 절편 공동배양법은 대두에서만 이용되어 왔지만 최근 동일한 박과 작물인 멜론의 자엽절 절편 공동배양을 통한 형질전환 (Cho et al. 2005b)과 오이의 stem-node를 이용한 형질전환이 이루어져 (Miao et al. 2009) 측아 발생을 위한 분열능 세포로 구성된 자엽절 절편의 중요성과 형질전환이 까다로운 작물의 경우 새로운 배양재료로서 이용가능성이 높아지고 있다 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 연구팀이 이미 확보하고 있는 대두와 멜론의 자엽절 절편 공동배양법 (Cho et al. 2005b)을 국내 재배 품종인 “Eunsung” 오이 품종에 적용하여 오이의 자엽절 절편공동배양법에 의한 형질전환방법을 확립하고자 수행하였다.

재료 및 방법

식물 재료

국내 오이 품종 중 재분화 능이 높은 (Cho et al. 2005a) 오이 (cv., Eunsung) 종자를 70% 알코올에 1분간, 2% sodium hypochlorite 용액에 15분간 표면 살균 하였다. 2% sucrose 가 첨가된 MS기본 고체배지 (Murashige and Skoog 1962)에 페트리디쉬 당 10개의 종자를 치상 하고 25°C 암 상태에서 7 - 8일 동안 발아시켰다. 발아된 오이 유식물체로부터 자엽과 자엽 사이를 종단으로 절단한 후 해부현미경하에서 자엽 사이에 있는 유경 조직을 제거하여 *Agrobacterium*과 공동배양하기 위한 재료로 사용하였다.

발현벡터

발현벡터 (pPZP211)는 CaMV 35S 프로모터에 선발마커로



Fig. 1 T-DNA region of the binary pPZP211 vector harboring *nptII* and DQ genes. The *nptII* genes were driven by cauliflower mosaic virus 35S promoter. LB: left border, *nptII*: neomycin phosphotransferase II gene, 35P: cauliflower mosaic virus 35S promoter, RB: right border.

서 *nptII* 유전자와 저온저항성 유전자로서 인삼유래 DQ 유전자가 (unpublished data) 발현될 수 있도록 제조하였으며 (Fig. 1), freeze-thaw 방법으로 EHA101에 형질전환하여 균주로 사용하였다 (Jefferson et al. 1987). 50 mg/L streptomycin과 50 mg/L spectinomycin이 첨가된 LB액체배지 25 mL에 각각의 colony를 접종하여 28°C로 8시간 이상 배양한 후 대수기 증식기 ($OD_{650} = 0.6 - 1.0$)의 균을 사용하였다.

오이 형질전환

형질전환체를 얻기 위하여 자엽절 절편을 pPZP211 벡터로 형질전환시킨 25 ml의 *Agrobacterium* 용액 (EHA101)에 30분 동안 침지한 후 공동배양용 배지 (Cho et al. 2005b)에 6개씩 치상 하여 3일 동안 공동 배양하였다. 공동배양 후 자엽절 절편으로부터 초기 2주 동안에 유도된 부정아의 제거, 항생제 저항성 부정아 유도, 부정아로부터 부정근 유도 및 유식물체 순화 등의 실험방법과 모든 배지 조성은 Cho 등 (2005a,b)의 방법에 따라 수행하였다. 선발배지에 100 mg/L paromomycin 항생제를 첨가하였으며, 모든 배지는 8 g/L Phyto-agar를 첨가하기 전 pH를 조정하여 121°C, 1.2기압에서 15분간 고압 멸균 하였다. 배지는 90 × 15 mm 플라스틱 페트리디쉬에 25 ml씩 분주하여 사용하였다. 배양은 24°C로 조절되는 배양실에서 광도 46 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 16시간 광주기에서 배양 하였다. 선발배지에서 얻은 유식물체는 토양으로 옮겨 온실에서 순화 하였으며, 크기가 50 cm 이상 자란 유식물체를 대상으로 분자 수준의 분석을 실시하였다.

Southern 분석

Paromomycin에 저항성을 나타내는 22개체의 유식물체를 토양으로 순화하였으나 최종적으로 9개체를 성숙한 개체로 생육시킬 수 있었다. 식물체의 크기가 50 cm 이상 된 성숙한 식물체의 어린 잎 조직으로부터 genomic DNA를 추출하였다 (Dellaporta et al. 1985). 약 10 μg 의 DNA를 *Bam*HI 제한효소로 37°C에서 16시간 동안 반응시켜 절단한 후 0.8% agarose 겔에 전기영동 하였다. Agarose 겔 상의 DNA 밴드를 Zeta^R Probe nylon membrane (Bio-Rad,

Table 1 The efficiency (%) of *Agrobacterium*-mediated transformation using cotyledonary-node explants of cucumber (cv. Eunsung) on selection medium amended with 100 mg/L paromomycin and Southern blot analysis for putative transgenic plants

Experiments	No. of cotyledonary node explants inoculated with <i>Agrobacterium</i>	No. of explants with adventitious shoot resistant to 10 mg/L paromomycin	No. of plantlets regenerated (%)	No. of transgenic plants confirmed by Southern blot analysis
I	71	6	3 (4.22)	1
II	67	11	4 (5.97)	3
III	86	5	2 (2.32)	2
Total	224	22	9 (4.01)	6

catalog #162-0196)에 옮겨 32 P-dCTP (Stratagene, catalog#300385)로 labelling한 약700 bp *nptII* probe로 65°C에서 hybridization하여 Southern분석을 실시하였다 (Southern 1975).

결과 및 고찰

*Agrobacterium*공동배양법에 의한 오이 형질전환시스템에서는 유식물체의 자엽, 배축 및 잎 절편이 이용되어 왔다 (Dong et al. 1991). 대부분의 연구에서 자엽과 배축 절편으로부터 기관발생과 체세포배 발생시스템을 이용하여 형질전환체를 생산하였고 (Chee 1990; Dong et al. 1991), 선발 마커로는 *nptII*유전자를 이용할 경우 kanamycin항생제를 사용하여 왔다 (Trulson et al. 1986; Chee 1990; Dong et al. 1991). 국내 재배품종인 “Eunsung” 종자를 7 - 8일 동안 무균 발아시켜 유식물체를 얻었다. 자엽과 자엽 사이에 있는 유경 조직과 액아를 메스 (No. 11)로 조심스럽게 제거한 후 자엽절 부위를 10회 이상 상처를 주었다. 이와 같이 준비된 자엽절 절편을 공동배양재료로 사용하였으며, 형질전환방법은 Cho 등 (2005b)의 방법에 따라 수행하였다 (Fig. 2A). 공동배양 3일 후 초기 2주 동안 선발배지에서 발생된 측아 및 부정아는 모두 제거하였다 (Fig. 2B,C). 이와 같이 배양 2주째 형성된 shoot와 배축 부위를 제거하고 자엽절 절편을 다시 동일배지에 2주 간격으로 6주 이상 계대 배양하면서 새로운 부정아를 유도하였다. 부정아 원기는 배양 4주째부터 형성되기 시작하였으며(Fig. 2D), 자엽절 뿐 아니라 자엽 기부에서도 캘러스 형성과 동시에 부정아 형성이 이루어졌다. 8주 이상 배양 하였을 때 이러한 원기로부터 2-3 mm 크기의 부정아로 자랐다 (Fig. 2E). 배양 8주 후 진한 녹색을 띠는 부정아 원기를 각각 1개씩 분리하여 부정아 신장배지에 옮겨 배양 하면서 (Fig. 2F) 3 cm이상 성장 시켰다 (Fig. 2G). 신장된 부정아를 부정근 유도배지에서 뿌리를 유도한 후 토양에 옮겨 순화시켰으며 (Fig. 2H), 온실에서 건강하게 자라는 오이의 암술과 수술을 이용하여 인공 수정 후 후대 종자를 수확하였다 (Fig. 2I, J).

오이 형질전환에서 배양절편으로서 자엽절 절편을 이

용한 경우는 거의 없다. 배축, 자엽 및 잎 절편을 이용할 경우 분화 능이 높은 품종 스크리닝 과정을 통해 기관 및 체세포배 발생이 가능한 품종 선택이 필수적이며, 이러한 경우 형질전환은 특정 genotype에서 이루어질 수 밖에 없다 (Gaba et al. 2004; Cho et al. 2005a). 반면 자엽절 절편의 경우 자엽과 배축 사이에 측아 발생을 위한 분열 능 세포가 존재하기 때문에 형질전환이 까다로운 대두와 같은 형질전환시스템에서 가장 많이 이용되는 배양 재료가 되었으며 (Clemente et al. 2000; Cho et al. 2004), 박과 작물인 멜론에서도 그 이용 가능성이 확인 되었다 (Cho et al. 2005b). 오이 자엽절 절편의 경우도 선발배지에서 멜론 자엽절 절편과 매우 유사한 경향을 보였으며, 특히 배양



Fig. 2 Plant regeneration from cotyledonary-node explants of cucumber transformed with *Agrobacterium* containing *nptII* gene A: Cotyledonary-node explants on co-cultivation medium. B,C: The explants on selection medium supplemented with 100mg/L paromomycin for first 2 weeks. D: The explants with only node region on selection medium after removing axillary bud. E: Shoots induced from the node explants. F: Elongated shoots on elongation medium. G: Putative transgenic shoots on root induction medium. H: Plants in greenhouse. I: Plants growing until maturity. J: Harvested fruit (T₁)

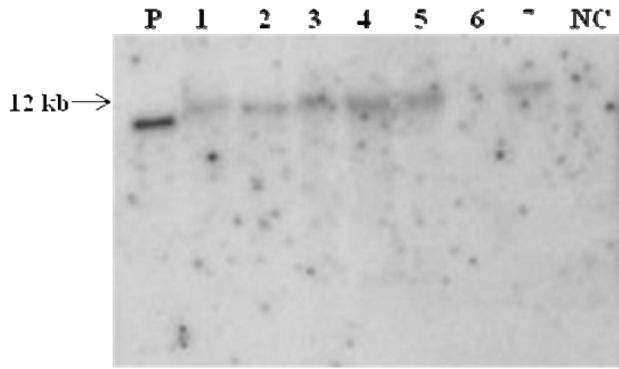


Fig. 3 Southern blot analysis of 7 transgenic cucumber carrying *nptII* gene. Genomic DNA was digested with *Bam*HI and hybridized with 700bp *nptII* probe DNA labeled with ³²P-dCTP. P: Plasmid vector (pPZP211) digested with *Bam*HI; NC: Non-transgenic cucumber; 1: I-1, 2: II-1, 3: II-2, 4: II-3, 5: II-4, 6: III-1, 7: III-2.

8주째 자엽절 절편으로부터 형성되는 항생제 저항성 부정아는 자엽 절편으로부터 발생하는 부정아에 비하여 (Cho et al. 2005a) 매우 빠른 성장을 보여 주위의 괴사되는 조직과 뚜렷하게 구분할 수 있었다. 따라서 향후 유용유전자 도입을 위한 오이 형질전환에서 자엽절 절편은 매우 유용한 배양재료가 될 수 있음을 시사한다.

Paromomycin 항생제가 첨가된 선발배지에서 자엽절 절편 (224개)으로부터 형성된 22개의 부정아 중에서 최종적으로 9개체가 토양순화과정을 거쳐 정상적으로 생육되었다. 실험I에서 71개의 자엽절 절편으로부터 항생제 저항성 부정아는 6개체, 이중에서 완전한 유식물체는 3개체를 얻어 4.22%의 형질전환빈도를 그리고 실험II의 경우 67개의 배양절편으로부터 11개의 항생제 저항성 부정아를 얻었고, 이중에서 4개의 완전한 개체를 얻어 가장 높은 형질전환 빈도 (5.97%)를 보였다. 또한 실험III에서 86개의 배양절편으로부터 5개의 부정아를 얻었고, 2개체의 완전한 식물체를 얻어 가장 낮은 형질전환빈도 (2.32%)를 보였다. 결과적으로 3회의 반복 실험으로부터 총 224개의 자엽절 절편으로부터 22개의 항생제 저항성 부정아를 선발하였고, 9개의 완전한 개체를 생육시켜 4.01%의 형질전환 빈도를 얻었다. 식물의 형질전환빈도는 매우 다양한 요인에 의해 영향을 받는다. 작물의 품종과 *Agrobacterium*의 종류에 따라 (Simmonds and Donaldson 2000), 선발 마커 (Cho et al. 2005a) 및 배양절편의 종류 (Cho et al. 2005b; Kim et al. 2008) 등에 의해 다르게 나타날 수 있고, 그 외에 연구자의 숙련도에 의해서도 영향을 받는다 (Gaba et al. 2004). 특히 오이의 자엽 절편을 이용한 경우 최대 GUS발현빈도는 0.35%에 불과 하였으며 (Cho et al. 2005a), 배축을 이용한 경우 2.1% (Kim et al. 2008) 그리고 동일한 박과 작물인 멜론의 자엽절 절편을 이용하였을 때도 아주 낮은 0.16%의 형질전환빈도를 보

였다 (Cho et al. 2005b). 반면 본 연구에서는 오이 자엽절 절편을 이용하였을 경우 4.01%의 비교적 높은 형질전환을 보여 줌으로서 배양절편의 종류따라 매우 달라질 수 있음 보여 주었다. 따라서 오이의 형질전환 효율을 개선하기 위해서는 최적의 배양재료 선택이 매우 중요함을 알 수 있었다.

온실에서 건강하게 자란 7개의 식물체 (I-1, II-1, II-2, II-3, II-4, III-1, III-2) 잎 절편으로부터 genomic DNA를 추출하여 Southern분석을 수행하였다. III-1을 제외한 나머지 형질전환체의 genome에 *nptII*유전가 안정적으로 도입되어 있음을 확인 할 수 있었고, 또한 모든 형질전환체의 게놈에는 1 copy가 도입되어 있었다 (Fig. 3). 따라서 항생제가 첨가된 선발배지에서 paromomycin 저항성식물체 선발과 Southern분석 결과로 미루어 볼 때 배양재료로서 자엽절 절편은 자엽이나 배축 절편에 비하여 매우 효율적임을 알 수 있었고, 그 형질전환 빈도 또한 매우 높아 유용유전자 도입을 위한 새로운 방법임을 제시할 수 있었다.

적 요

*Agrobacterium*과 자엽절 절편 공동배양으로 오이 형질전환체를 생산하였다. 오이 자엽절 절편 (c.v. Eunsung)은 선발 마커로서 *nptII*유전자와 유용유전자로서 DQ유전자가 포함된 pPZP211를 EHA101에 형질전환하여 공동 배양하였다. 3회 반복실험으로부터 평균 형질전환 빈도는 4.01%를, 최대 빈도는 5.97%를 보여 주었다. Paromomycin항생제 저항성을 갖는 9개의 식물체를 선발과정을 통해 얻었으며, Southern blot 분석에 의해 6개 식물체의 genome에 *nptII*유전자 안정적으로 도입되어 있음을 확인할 수 있었다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(식물분자육종사업단 과제번호: PJ008103)과 IPET의 지원에 의해 이루어진 것임.

이용문헌

Boyhan GJ, Norton D, Jacobsen BJ, Abrahams BR (1992) Evaluation of watermelon and related germplasm for resistance to zucchini yellow mosaic virus. *Plant Dis* 76:251-252
 Chee PP (1990) Transformation of *Cucumis sativus* tissue by *Agrobacterium tumefaciens* and the regeneration of transformed plants. *Plant Cell Rep* 9:245-248

- Cho MA, Choi DW, Liu JR, Clemente T, Choi PS (2004) Development of transgenic soybean using *Agrobacterium tumefaciens*. Kor J Plant Biotechnol 31:255-259
- Cho MA, Song YM, Park YO, Ko SM, Min SR, Liu JR, Choi PS (2005a) The use of glufosinate as a selective marker for the transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Kor J Plant Biotechnol 32:161-165
- Cho MA, Song YM, Park YO, Ko SM, Min SR, Liu JR, Lee JH, Choi PS (2005b) Production of transgenic melon from the cultures of cotyledonary-node explant using *Agrobacterium*-mediated transformation. Kor J Plant Biotechnol 32:257-262
- Clemente T, LaValle BJ, Howe AR, Ward DC, Rozman RJ, Hunte PE, Broyles DL, Kasten DS, Hinchee MA (2000) Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybean derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. Crop Sci 40: 797-803
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1985) Maize DNA miniprep. In: Malmberg R, Messing J, Sussex (eds), Molecular Biology of Plants: A laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor, New York, pp 36-37
- Dong JZ, Yang MZ, Jia SR, Chua NH (1991) Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from the cauliflower mosaic virus 35s promoter in transgenic melon. Bio/Tech 9: 858-863
- Finer KR, Finer JJ (2000) Use of *Agrobacterium* expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation-treated soybean cotyledons. Lett Appl Microbiol 30:406-410
- Gaba V, Zelcer A, Gal-On A (2004) *Cucurbit* biotechnology-the importance of virus resistance. In Vitro Cell Dev Biol Plant 40: 346-358
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6:3901-3907
- Kim HA, Min SR, Choi DW, Choi PS, Hong SG (2010) Development of transgenic cucumber expressing TPSP gene and morphological alterations. J Plant Biotechnol 37:1-5
- Kim HA, Lee BY, Jeon JJ, Choi DW, Choi PS, Utomo SD, Lee JH, Kang DH, Lee YJ (2008) GUS gene expression and plant regeneration via somatic embryogenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Kor J Plant Biotechnol 35:275-280
- Miao MM, Xu R, Zheng LJ (2009) High-efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) using stem nodes as explants. The J Horticult Sci Biotechnol 84:199-203
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Nishibayashi S, Kayakawa T, Nakajima T, Suzuki M, Kaneko H (1996) CMV protection in transgenic cucumber plants with an introduced CMV-O cp gene. Theor Appl Genet 93:672-678
- Reed J, Privalle L, Powell ML, Meghji M, Dawson J, Dunder E, Suttie J, Wenck A, Launis K, Kramer C, Chang YF, Hansen G, Wright M, Chang YF (2001) *Phosphomannose isomerase*: an efficient selectable marker for plant transformation. In vitro Cell Dev Biol Plant 37:127-132
- Simmonds DH, Donaldson PA (2000) Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes. Plant Cell Rep 19:485-490
- Somers DA, Samac DA, Olhoft PM (2003) Recent advances in legume transformation. Plant Physiol 131:892-899
- Southern E (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98: 503-512
- Trulson AJ, Simpson RB, Shahin EA (1986) Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium rhizogenes*. Theor Appl Genet 73:11-15