

포도 (*Vitis labrusca* L.)의 직접 재분화 방법을 이용한 식물체 재분화와 형질전환

김세희 · 신일섭 · 조강희 · 김대현 · 김현란 · 김정희 · 임선형 · 김기욱 · 이향분 · 도경란 · 황해성

Plant regeneration and transformation of grape (*Vitis labrusca* L.) via direct regeneration method

Se Hee Kim · Il Sheob Shin · Kang Hee Cho · Dae Hyun Kim · Hyun Ran Kim · Jeong Hee Kim
Sun-Hyung Lim · Ki Ok Kim · Hyang Bun Lee · Kyung Ran Do · Hae Seong Hwang

Received: 16 November 2013 / Accepted: 27 November 2013
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Efficient regeneration methods and transformation system are a priority for successful application of genetic engineering to vegetative propagated plants such as grape (*Vitis labrusca* L.). This research is to establish shoot regeneration system from plant explants for ‘Campbell Early’, ‘Tamnara’, ‘Heukgoosul’, ‘Heukbosek’ using two types of plant growth regulators supplemented to medium. The highest adventitious shoot regeneration rate of 5% was achieved on a medium containing of Murashige and Skoog (MS) inorganic salts and Linsmaier and Skoog (LS) vitamins, 2 mg/L of TDZ and 0.1 mg/L of IBA. Leaf tissue of ‘Campbell Early’, was 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, the other *Agrobacterium* strains, GV3101 containing the vector pB7 WG2D carrying with *mPAPI-D* gene. *mPAPI-D* is a regulatory genes of the anthocyanin biosynthetic pathway.

‘Campbell Early’ harboring *mPAPI-D* gene was readily able to be selected by red color due to anthocyanin accumulation in the transformed shoot. These results might be helpful for further studies to enhance the transformation efficiency in grape.

서론

포도(*Vitis* spp.)는 식물 분류학상 포도과(*Vitaceae*) 포도속(*Vitis*)에 속하는 덩굴성 식물로 북반구의 온대 및 아열대 지역에 분포되어 있으며 발상지는 아시아 서부 원생, 아시아 동부 원생, 북미대륙 원생으로 분류된다(Olmo 1976). 현재 생식 및 가공용으로 재배되는 포도 품종은 서부 원생인 유럽 종(*Vitis vififera* L.)으로 세계 포도 생산의 대부분을 차지하고 있으며 나머지는 미국 종(*Vitis labrusca* L.) 포도로서 북미대륙 원생종에서 선발한 품종, 그리고 이들과 유럽 종을 교잡하여 얻은 품종들이다(Moreno-Sanz et al. 2011). 아시아 동부 원생종 중에는 중국 북부로부터 만주, 우리나라에 분포되어 있는 왕머루(*Vitis amurensis*)가 일부 지역에서 산포도라는 이름으로 재배되고 있다. 우리나라에서 재배되는 포도의 대부분은 미국 종으로 미국과 일본에서 육성된 품종들이며 ‘캠벨얼리’가 재배면적의 70% 이상을 차지하고 있어 소비자의 다양한 기호에 부합하는 고품질 포도 품종 육성이 필요하다. 야생종 포도를 품종 육종에 이용해서 교배 육종으로 창출되는 변이의 폭을 넓히고 있으나 배수성이 다양하고 자식열세 현상이 나타나며, 무핵 품종에서와 같이 종자가 형성되지 않는 경우도 있어서 교배육종이 쉽지 않다(Gray and Meredith 1992). 또한 기존의 포도 신품종 육성에는 10년 이상의 시

S. H. Kim (✉) · I. S. Shin · K. H. Cho · D. H. Kim · H. R. Kim
K. O. Kim · H. B. Lee · K. R. Do · H. S. Hwang
농촌진흥청 국립원예특작과학원 과수과
(Fruit Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 440-706, Korea)
e-mail: ezsehee@korea.kr

J. H. Kim
농촌진흥청 국립원예특작과학원 사과시험장
(Apple Research Station, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Gunwi 716-810, Korea)

S. H. Lim
농촌진흥청 국립농업과학원 생물소재공학과
(Metabolic Engineering Division, National Academy of Agricultural Science, RDA Suwon 441-707, Korea)

간과 노동력이 요구되며 목표로 하는 형질의 도입에 어려움이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 제시되고 있는 방법이 식물생명공학 기술을 이용해서 외래의 유용 유전자를 직접 도입하는 형질전환 방법이다. 형질전환 기술을 이용한 신품종 포도를 개발하기 위해서는 우선적으로 효율적인 재분화 체계가 확립되어 있어야 한다. 형질전환에 주로 사용되고 있는 간접 재분화 방법은 잎이나 잎자루에서 체세포 배발생을 통해 캘러스라는 중간 단계를 거친 후 신프가 유도되는 방법이다. 이러한 방법은 캘러스 발생 후 신프를 유도해야하는 과정이 필요하고, 재분화된 식물체에 유전적 변이가 생겨 모식물체와 다른 형태를 가지게 되는 경우도 있다. 본 연구실에서는 유럽 종 포도 '리자마트'의 잎이나 잎자루에서 바로 신프를 유도하는 직접 재분화 방법을 구축하였으며(Kim et al. 2011) 국내 주요 품종인 '캠벨얼리'의 재분화 체계 구축을 위해 본 연구를 수행하였다. 외국의 경우 *Agrobacterium*에 의한 포도 형질전환 연구 결과(Nakano et al. 1994)가 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, 일부 형질전환 연구가 진행되어 왔음에도 불구하고 아직까지 성공사례가 보고된 바는 없다(Lee 2007). 또한 식물형질전환이 어려운 작물의 경우 일반적으로 선발마커의 최적화, 배양재료의 선택, *Agrobacterium*의 최적공동 배양조건 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 '캠벨얼리'에 대한 GUS reporter gene의 도입 조건을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구에 사용한 재료는 농촌진흥청 국립원예특작과학원에서 보존 중인 포도 품종 캠벨얼리, 흑구슬, 흑보석, 탐나라를 이용하였다. 1년생 휴면지를 채취하여 약 30 cm 길이로 잘라 polyethylene film으로 포장하여 5°C에서 8주간 저온 처리하여 휴면을 타파시켰다. 약 10 cm 길이의 삽수를 수삽하여 발생한 신프를 3 cm 길이로 잘라 70% EtOH로 세척한 다음 3.0%의 sodium hypochlorite 용액에서 10 분간 살균하고 멸균수로 5~10회 반복하여 세척하였다. 신프로부터 유도된 성장점 부위를 채취하여 BA 1 mg/L, sucrose 30 g/L이 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962) 배

지에 접종하여 신프를 유도하였고, 이들을 MS배지에 BA 1 mg/L, IBA 0.1 mg/L, sucrose 30 g/L, plant agar 10 g/L를 첨가한 후에 pH를 5.8로 조정된 증식배지에 치상하여 계대 배양하였다. 신프 배양은 25°C로 조절되는 배양실에서 2,000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ 의 광도로 16시간 광주기, 8시간 암주기로 하였다. 신프 계대배양 4주 후에 1~1.5 cm 정도 길이의 신프들을 1/2 MS 무기염류에 IBA 0.3 mg/L, sucrose 15 g/L, plant agar 8 g/L를 첨가하고 pH를 5.8로 조정된 발근 배지로 옮겨 발근을 유도하였다.

식물생장조절물질이 식물체의 재분화에 미치는 영향

생장조절물질에 의한 식물체의 재분화율을 조사하기 위한 실험 결과 '리자마트'의 재분화 체계를 구축했던 두 종류의 배지 조성 MS 4.4 g/L, sorbitol 30 g/L, IBA 0.1 mg/L, BA 2 mg/L과 MS 4.4 g/L, sorbitol 30 g/L, IBA 0.1 mg/L, TDZ 2 mg/L (Kim et al. 2011)을 사용하였고, LS 비타민(Linsmaier and Skoog 1965)을 5 ml/L (thiamin HCL 0.4 mg/L, myo-inositol 100 mg/L)로 따로 첨가하였다. 기내 도입된 포도 품종 캠벨얼리, 흑구슬, 흑보석, 탐나라의 잎 절편체와 잎자루, 줄기를 각각10개씩 10반복으로 치상하여 암처리에서 5주간 배양 후 16시간 2000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ 광도의 광주기로 옮겨 2 주간 배양하면서 각 처리당 캘러스 생성과 신프의 재분화율을 비교 조사하였다.

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. pB7WG2D vector는 애기장대에서 분리한 *mPAPID* 유전자를 포함하고 있는 안토시아닌 과발현 운반체로 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strain에 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°C, 220 rpm에서 약 24 시간 정도 배양하여 OD₆₀₀ (optical density) 0.8~1.0의 균을 사용하였다. 배양액은 22°C에서 10분 동안 원심분리하고, 회수된 pellets을 병원성 유도배지(citric acid 5.88 g/L, sucrose 20 g/L, pH 5.2)에 녹여 OD₆₀₀ 0.7~0.8로 희석하고, acetosyringone 0.2 mM과 proline 1.0 mM을 첨가하여 접종에 사용하였다.

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°C에서 150 rpm으로 배양하여 병원성을 유도·촉진한 뒤, 사각으로 자른 잎 절편체와 잎자루, 줄기를 침지하여 22°C에서 150 rpm으로 10분 동안 배양하였다. 접종 후, 처리는 Jorge 등(2011)의 방법에 따라 감염된 잎 절편체와 잎자루, 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, plant agar 7 g/L, pH5.8)에 각 10개의 절편체를 10회씩 반복 치상한 후, 온도 25°C, 습도 70%, 암 상태에서 3일간 공동 배양하였다. *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, plant agar 7 g/L, pH5.8)에 치상하여 형질전환 대조구로 사용하였다. 공동 배양 후에 잎 절편체를 항생제가 첨가된 선발 재분화 배지(TDZ 5 mg/L, kanamycin 100 mg/L, cefotaxime 350 mg/L)에 치상하였고, 4 주간 25°C, 암상태에서 배양하였다. 2주 동안 1,000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ 광도로 배양하고 다음 2주 동안 2,000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ 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, BA 1 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.

포도 잎의 GUS transient expression 분석

포도 캠벨얼리 품종의 잎에서 GUS transient expression을 보기 위하여 *Agrobacterium*과 잎 절편체를 공동 배양 한 후 37°C에서 5-bromo-4-chloro-3-indole-glucuronidase 용액에 침지 시켰다(Jefferson et al. 1987). 24시간 후 destaining 용액(70% EtOH+1% glacial acetic acid)으로 탈색 시킨 후 GUS 양성반응을 나타낸 잎 절편체를 조사하였다. 대조구로서는 *Agrobacterium*과 공동 배양하지 않은 잎 절편체를 사용하였다.

결과 및 고찰

식물생장조절물질과 포도 품종에 따른 식물체 재분화

포도 재분화 체계를 구축하기 위한 선행 연구 결과(Kim et al. 2011), ‘리자마트’의 재분화율이 높았던 MS + LSvitamin + Sorbitol + IBA 0.1 mg/L + BA 2 mg/L과 MS + LSvitamin + Sorbitol + IBA 0.1 mg/L + TDZ 2 mg/L를 사용하여 ‘캠벨얼리’, ‘흑구슬’, ‘흑보석’, ‘탐나라’의 캘러스 생성과 재분화율을 조사하였다(Table 1). 포도의 기내 생장에 영향을 미치는 성장조절제의 농도와 조합에 관한 연구를 보면 BA와 zeatin의 단용 및 혼용처리가 신초의 재분화에 미치는 영향(Goussard 1982), 포도의 액아 기내 배양시 BA와 IBA가 신초 재분화와 발근에 미치는 영향(Lee and Wetzstein 1990), 눈의 위치에 따른 신초 재분화율의 차이를 BA, TDZ, kinetin을 단용 및 혼용 처리하여 연구하였고(Sudarsono and Goldy 1991), 포도에서 신초 유도과 증식을 위해서는 고농도의 cytokinin과 저농도의 auxin이 필요하다는 연구 결

Table 1 Effect of IBA in combination with cytokines on shoot regeneration and callus induction from leaf explant and petiole and stem

Cultivars	explants	IBA 0.1 mg/L + BA 2 mg/L		IBA 0.1 mg/L + TDZ 2 mg/L	
		Calli induction (%)	Shoot regeneration (%)	Calli induction (%)	Shoot regeneration (%)
Campbell Early	leaf	17	0	56	4
	petiole	0	0	70	5
	stem	0	0	12	3
Heukgoosul	leaf	24	0	43	0
	petiole	0	0	51	1
	stem	0	0	0	0
Heukbosek	leaf	12	0	68	0
	petiole	0	0	73	1
	stem	0	0	0	0
Tamnara	leaf	25	0	52	0
	petiole	20	2	76	1
	stem	0	0	0	0

과가 보고되었다(Chee and Pool 1983). 이러한 연구결과들은 식물체 재분화에 있어서 성장조절제의 조성과 농도, 절편체의 종류와 위치 등이 많은 영향을 미치고 있음을 보여준다. 본 연구에서는 IBA 0.1 mg/L + TDZ 2 mg/L 조합 배지에서 ‘캠벨얼리’, ‘흑구슬’, ‘흑보석’, ‘탐나라’의 캘러스 생성과 재분화율을 관찰할 수 있었고, 이러한 식물생장조절물질의 농도와 조합은 포도의 조직 배양 시 신초의 형성에는 고농도의 cytokinin과 저농도의 auxin이 필요하다는 결과를 보여준다. Cytokinin의 종류를 TDZ와 BA로 2 mg/L 농도로 처리한 결과 BA 처리구보다는 TDZ 처리구에서 높은 신초 재분화율을 관찰할 수 있었다. 본 연구실에서 수행중인 배 ‘신고’의 재분화에 있어서 TDZ 1 mg/L 처리구보다 BA 5 mg/L 처리구에서 높은 신초 재분화를 나타낸 결과와는 다른데 이러한 차이는 식물의 과종과 품종에 따라 서로 다른 최적 cytokinin의 종류와 농도를 가지는 것으로 보인다. 지금까지 TDZ는 cytokinin과 유사한 역할을 하는 물질로 알려져 있으며(Nayak and Rath 1997) 목본식물에서 신초의 증식에 효과적인 성장조절물질로 조직배양에 이용되고 있다(Huetteman and Preece 1993). 따라서 본 연구는 cytokinin류에 있어 BA 처리보다 TDZ의 처리가 포도 품종의 신초 발생과 식물체를 분화시키는 조건에 있어 적합하다고 판단된다.

포도 품종에 따른 신초 재분화 상태를 보면 ‘캠벨얼리’, ‘흑구슬’, ‘흑보석’, ‘탐나라’의 액아에서 재분화된 신초의 크기 및 식물체 형성 정도가 ‘캠벨얼리’에서 가장 잘 분화되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 식물 절편체에서 신초가 분화되는 과정을 보면 배지에 이식 후 4~5일까지는 신초가 생성되지 않고 절편체의 비대현상이 관찰되며 배양 10일후 신초 분화가 일어난다(Fig. 1A). 배양 2주후에는 절편체로부터 어린잎이 전개된 다음(Fig. 1B) 배양 5주후에는 정상적인 식물체로 분화하였다. 배양기간이 경과할수록 절편체에서 다수의 신초가 분화되는 것이 관찰되었다. 배양된 잎 절편체로부터 유기된 신초에서 정

상적인 개체로 성장한 식물체를 증식배지(BA 1 mg/L, IBA 0.1 mg/L, sucrose 30 g/L, plant agar 10 g/L)로 옮긴 후 관찰하였다(Fig. 1C). ‘캠벨얼리’, ‘흑구슬’, ‘흑보석’, ‘탐나라’의 네가지 품종 중 재분화율이 가장 높은 ‘캠벨얼리’ 품종을 이용해서 *Agrobacterium tumefaciens*을 이용한 형질전환 조건을 살펴보았다.

*Agrobacterium*을 이용한 포도 ‘캠벨얼리’의 형질전환 적정조건 검토

*Agrobacterium*을 이용한 포도 ‘캠벨얼리’의 도입 유전자 발현에 있어서 포도 ‘리자마트’의 선행연구 결과, acetosyringone이 첨가되지 않은 처리구에서는 *gus* 유전자가 발현되는 절편체를 얻을 수 없었으나 100 μ M 이상의 acetosyringone을 병원성 유도 배지에 첨가하였을 경우 *gus* 유전자의 발현이 나타났으며, 200 μ M의 acetosyringone을 처리했을 때 가장 높은 발현율을 나타냈다(Kim et al. 2011). 따라서 ‘캠벨얼리’ 품종을 이용한 외래 유용 유전자 도입 실험에서도 acetosyringone의 적정 농도를 200 μ M로 처리하였다. 일반적으로 쌍자엽 식물에서 acetosyringone 첨가에 따른 전처리 유도과정은 유전자 전환 연구에 있어서 단자엽 식물만큼 중요한 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있으나(Smith and Hood 1995) 쌍자엽 식물인 호접란의 형질전환에서 공동배양배지에 acetosyringone을 첨가했을 때 형질전환율이, 첨가하지 않았을 때 보다 4배 이상 차이가 난다는 결과가 보고되었다(Belardino and Mill 2000). 이러한 결과는 공동배양단계에서 acetosyringone의 첨가가 식물의 종과 품종에 따라서 형질전환율을 증가시키는 데 필수요인임을 나타낸다. 따라서 ‘캠벨얼리’ 품종을 이용한 외래 유용 유전자 도입 실험에서도 acetosyringone의 적정 농도를 200 μ M로 처리하였고, acetosyringone 첨가는 포도 유전자 전환 연구에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

포도 형질전환 방법은 주로 particle bombardment를 이



Fig. 1 The induction of shoot formation and plant regeneration from ‘Campbell Early’ A. Adventitious shoot from stem B. Adventitious shoot from petiole C. 4 weeks after transfer proliferating on the MS medium supplemented with BA 1 mg/L+IBA 0.1 mg/L

용해서 유전자를 직접적으로 도입하는 방법(Vidal et al. 2003)이나 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환방법 등을 토대로 하여 형질전환의 효율을 극대화시키는 방향으로 이루어져 왔다(Li et al. 2006). 그 중 *Agrobacterium*을 매개로 한 형질전환방법이 많이 이용되었으며 절편체의 종류에 따라서 다양하게 연구가 진행되었다. 그러나, 세부적으로는 포도의 품종이나 selection marker, 배양조건 및 배지 조성 등에서 차이가 있다. 본 연구에서는 준비된 잎 절편체, 잎자루, 줄기를 공동배양 재료로 사용하였으며, *Agrobacterium*을 이용한 GUS 유전자 발현 효율에 영향을 미치는 요인 중 박테리아의 농도를 조사한 포도 ‘리자마트’의 선행 연구결과, 균의 전처리 배양 농도 A₆₀₀ nm 0.3에서 최종 접종 농도를 A₆₀₀ nm 0.8로 희석하여 접종한 조건에서 *gus* 유전자 발현율이 가장 높게 나타났으므로(Kim et al. 2011) 동일한 방법으로 접종을 수행하였다. T-DNA의 식물체 내로의 전이에 *Agrobacterium*의 농도가 중요한 요인이라는 연구 결과가 있으며(Humara et al. 1999), 식물의 종이나 품종에 따라 박테리아 농도가 미치는 영향이 현저하게 차이가 나는 것으로 보아(Seong et al. 2003), *Agrobacterium*의 최적 농도를 구명해야 형질전환율을 높일 수 있다고 보여진다. 따라서 선행 연구에서 밝힌 박테리아의 최적 농도는 앞으로 식물 절편체를 이용한 포도 형질전환 연

구에 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

형질전환에 사용된 pBI121 vector는 reporter gene으로 β -glucuronidase (GUS)를 포함하고 있으며 pB7WG2D vector는 애기장대에서 분리한 *mPAP1D* 유전자를 포함하고 있는 안토시아닌 과발현 운반체로 안토시아닌이 식물체에 축적되어 붉은색을 나타내게 된다. ‘캠벨얼리’의 잎자루에서 형질전환 실험 결과 pBI121 vector가 도입된 식물체로부터 재분화된 싹초는 무색 투명하거나 연한 녹색을 보이지만 pB7WG2D vector가 도입된 식물체에서는 붉은색의 싹초가 재분화되었다(Fig. 2). 식물의 형질전환체 선발에 사용되는 제초제 저항성이나 항생제 저항성 유전자의 경우, 관상용으로 볼 수 있는 화훼류와 달리 과실처럼 식용하게 되면 유전자변형 식물체의 문제점으로 생각되어 왔으며 GUS 발현으로 유전자 도입을 확인하게 되면 식물체가 소실되는 단점이 있다. 안토시아닌의 과발현으로 인한 ‘캠벨얼리’ 형질전환체는 싹초단계에서부터 붉은색으로 선별이 가능하였으나(Fig. 3A) 싹초에서 아직 재분화된 식물체를 얻지 못하여 유전자 도입을 확인하기 위한 PCR과 Southern 분석이 필요한 단계이다. GUS transient expression을 보기 위한 실험에서 ‘캠벨얼리’의 잎에서 GUS 발현이 확실하게 나타남으로써(Fig. 3B) 본 연구는 외래 유입 유전자가 *Agrobacterium* 공동배양에 의해서 식물체내

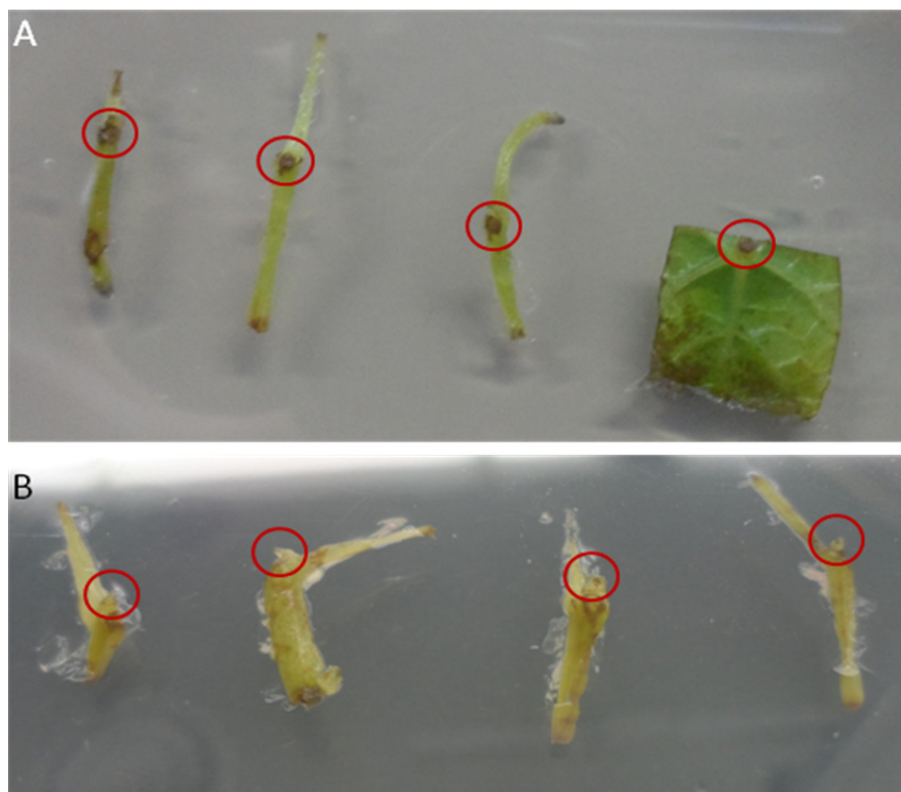


Fig. 2 Shoot regeneration can be observed in leaf and petiole of ‘Campbell Early’ transformed with *Agrobacterium tumefaciens* A. *mPAP1-D* expression can be observed in leaf and petiole of transformed ‘Campbell Early’ B. Shoot regeneration can be observed in petiole of ‘Campbell Early’ transformed with *gus* reporter gene

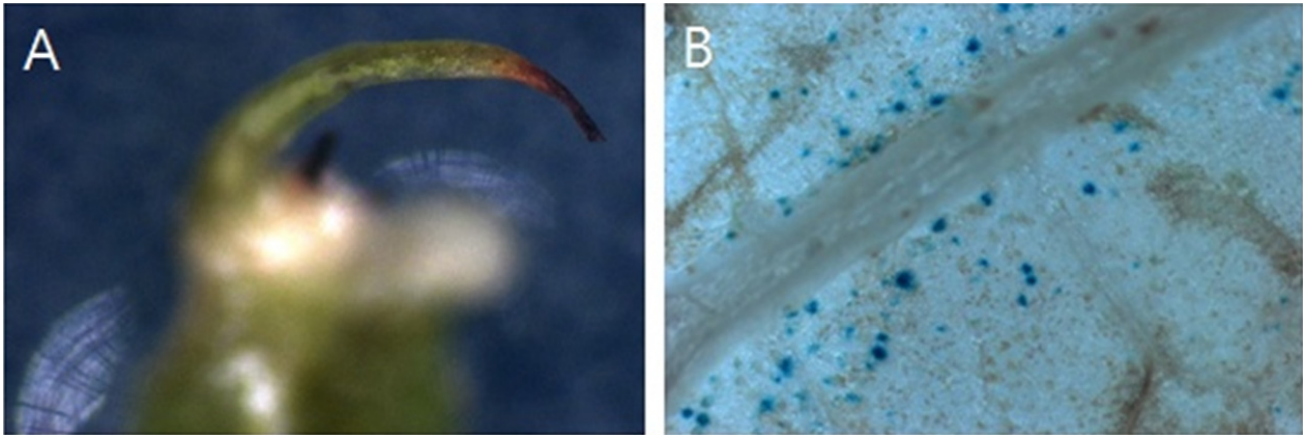


Fig. 3 Leaf of 'Campbell Early' transformed with *Agrobacterium tumefaciens* A. *mPAPI-D* expression can be observed in regeneration shoot of transformed 'Campbell Early' B. Leaf explants of 'Campbell Early' transformed with *Agrobacterium* containing GUS reporter gene

에 삽입되어 형질전환이 가능하다는 고무적인 결과를 보여주고 있다. 본 연구에서 *Agrobacterium*과 공동 배양한 포도 품종의 수와 절편체의 수에 있어서 정확한 빈도 측정을 위해서는 더 많은 배양재료를 사용해야 할 것으로 판단된다. 지금까지 포도의 재분화 체계 구축에 관한 국내 연구는 '알덴', '탐나라', '자랑', 대목인 'Kober 5BB'에서 연구 진행 중이며 본 연구실에서는 '리자마트'와 '캠벨얼리'의 재분화 체계를 구축하였다. 포도는 사과나 배와 같은 다른 과수에 비해서 재분화율이 높지 않으며 잎 절편체 보다는 주로 잎자루에서 재분화되는 신초의 비율이 높다. 국내에서 *Agrobacterium* 공동배양법을 이용한 포도의 형질전환에 대한 결과는 '리자마트'에서 GUS transient expression이 보고되었지만(Kim et al. 2011) 형질전환체 생산에 대한 연구결과는 없으며 본 연구에서는 포도 도입 품종인 캠벨얼리에서 형질전환 조건을 구명하였고 이러한 결과들은 조직배양 기법을 이용한 포도의 형질전환 효율 향상에도 매우 유익하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

포도(*Vitis labrusca* L.)와 같은 영양번식 작물에서 성공적인 유전자 도입을 위해서는 효율적인 재분화 방법과 형질전환 체계 구축이 중요하다. 본 연구는 식물생장조절 물질에 따른 두 가지 종류의 배지를 사용해서 포도의 신초 재분화 체계를 구축하였다. IBA 0.1 mg/L와 TDZ 2 mg/L, IBA 0.1 mg/L와 TDZ 2 mg/L의 조합에 Linsmaier and Skoog (LS) vitamin을 따로 첨가한 Murashige and Skoog (MS) 배지에서 '캠벨얼리', '탐나라', '흑구슬', '흑보석'의 재분화율을 조사하였더니 IBA 0.1 mg/L와 TDZ 2 mg/L를 첨가한 배지에서 '캠벨얼리'의 재분화율이 5%로 나왔다. '캠벨얼리'

와 공동배양한 *Agrobacterium* strain은 CaMV 35S promoter와 GUS reporter 유전자, kanamycin에 저항성을 갖는 유전자가 있는 PBI121 vector가 도입된 LBA 4404와 안토시아닌 생합성을 조절하는 유전자로 알려진 *mPAPI-D* 유전자를 가지고 있는 pB7WG2D vector가 도입된 GV3101이다. 포도와 같은 과수에서 형질전환체를 선발하는 방법으로 항생제 및 제초제 저항성을 대신할 수 있는 방법은 분자유종에 있어 매우 중요하다. *mPAPI-D* 유전자가 도입된 '캠벨얼리'의 재분화된 신초는 붉은색으로 쉽게 식별이 될 수 있는데 이는 안토시아닌의 축적 때문이다. 이러한 연구 결과는 앞으로 '캠벨얼리'의 형질전환 효율 향상에 있어 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

사 사

이 논문은 2013년 농촌진흥청 원예연구사업(PJ006793 2013)의 지원에 의해 수행하였습니다.

References

- Belarmino MM, Mill M (2000) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a phalaenopsis orchid. 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
- Chee R, Pool RM (1987) Improved inorganic media constituents for in vitro shoot multiplication of *Vitis*. Scientia Hort 32:85-95
- 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
- Goussard PG (1982) Morphological responses of shoot apices of grapevine cultured *in vitro* effects of cytokinins in routine subculturing. *Vitis* 21:293-298
- 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 separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid *Nature* 303:179-180
- Huetteman CA, Preece JE (1993) Thidiazuron: A potent cytokine for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 33:105-119
- 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 antifungal proteins in tobacco. *Plant J* 8:101-113
- Jefferson RA, Kavanaugh TA, Bevan NH (1987) GUS fusions: β -glucuronidase 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 GUS 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
- Kim SH, Kim JH, Kim KO, Do KR, Shin IS, Cho KH, Hwang HS (2011) GUS gene expression and plant regeneration via co-culturing with *Agrobacterium* in grapevine (*Vitis vinifera*). *J Plant Biotechnol* 38:308-314
- Kwon YJ, Lee CH, Hyung NI (2000) Effects of medium composition and culture condition on plant regeneration via organogenesis of Kyoho grape. *J Kor Soc Hort Sci* 41:276-280
- Lee CH (2007) Grape genetic transformation. In: Han JH et al. (eds) *Plant genetic transformation*, Jungmunkag, Korea pp:391-403.
- Lee N, Wetzstein HY (1990) In vitro propagation of muscadine grape by axillary shoot proliferation. *J Amer Soc Hort Sci* 115:324-329
- 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
- Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 18:100-127
- 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.
- 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 an epiphytic 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.
- 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
- Smith RH, Hood EE (1995) Review and interpretation: *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. *Crop Sci* 301-309
- Sudarsono, Goldy RG (1991) Growth regulator and axillary bud position effects on in vitro establishment of *Vitis rotundifolia*. *Hort Science* 26:304-307
- 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 *np1III* and antimicrobial peptide genes. *Plant Cell Rep* 22:252-260