

Agrobacterium tumefaciens에 의한 양황철나무의 形質轉換 要因^{1*}

朴龍求² · 申東源² · 金貞姬²

Factors Effecting Agrobacterium Mediated Transformation and Regeneration of *Populus nigra* × *P. maximowiczii*^{1*}

Young Goo Park², Dong Won Shin² and Joung Hee Kim²

要 約

우리나라에서 育成한 交雜種인 양황철나무에 대해 *A. tumefaciens* strain 6044(pGA472)에 대한 感染力을 調査하였다. 침으로 刺戟한 양황철나무 잎에서 callus유발은 MS-2,4-D 0.5 mg/l - BA 0.1 mg/l 배지에서 높게 나타났으며, 줄기는 MS-2,4-D 0.01 mg/l - BA 0.2 mg/l 배지에서 많이 발생하였다. 形質轉換에 使用한 *A. tumefaciens* strain 6044는 AB 액체배지에서 OD 0.5 일때 접종하였는데 이때 박테리아의 濃度는 1ml당 4×10^8 개 었다. 器內培養한 양황철나무잎에 대한 kanamycin 感受性を 調査한 結果 10 mg/l에서 심한 生長 障礙 現象을 나타내어 植物體 再分化가 일어나지 않았다.

침으로 자극한 양황철나무 잎은 *A. tumefaciens* 6044와 共培養한후 carbenicillin 300 mg/l와 cefotaxime 200 mg/l에서 葉표면에 붙어 있는 박테리아를 제거하였다. 共培養한 잎은 kanamycin 10 mg/l가 첨가된 培地에서 再分化되었으며, 줄기 再分化率은 약 10%에 달했다.

ABSTRACT

We have demonstrated expression of bacterial genes transferred into cells of *Populus nigra* × *P. maximowiczii* by *A. tumefaciens* strain 6044 (pGA 472). We determined the optimum concentration of kanamycin sulfate for effective selection of punctured leaf transformed using *Agrobacterium* binary vector pGA 472 containing a neomycine phosphotransferase gene (NPT-II) which confers kanamycin resistance. The combination of cefotaxime (200mg/l) and carbenicillin (300mg/l) showed good performance of discarding *Agrobacterium* from inoculated punctured leaf. A relatively low concentration (10mg/l) of kanamycin sulfate inhibited callus and shoots induction from punctured leaf.

Number of shoots regenerated from co-cultured punctured leaf was 3.0 on MS basal medium supplemented with 10 mg/l kanamycin sulfate, while that of not co-cultured punctured leaf was none. The regeneration rate was 10% from the punctured leaf co-cultured on MS medium with 10 mg/l kanamycin. Regenerated shoots are developing from micropropagation for Southern blot analysis and inheritance of the kanamycin resistance trait (NPT-II).

Key words : Gene transformation, NPT-II gene, *Agrobacterium tumefaciens*, *Populus nigra* × *P. maximowiczii*, punctured leaf.

¹ 接受 1990年 4月 27日 Received on April 27, 1990.

² 慶北大學校 林學科 Dept. of Forestry, Kyungpook National Univ., Taegu 702-701, Korea.

* 本研究은 1989年度 文教部 學術振興財團 支授 研究費로 遂行된 것임.

緒 論

植物에 있어서 形質轉換法은 많은 研究가 이루어지고 있으나 아직 確立되지 못하고 있다. 形質導入을 위해서는 우선 필요한 遺傳子를 단리해야 하며, 단리된 遺傳子를 形質轉換을 원하는 細胞속으로 導入시켜야 하고, 導入된 細胞를 再生시키는 일련의 過程이 필요하다. 원하는 遺傳子가 단리되어 있다고 할지라도 形質轉換 植物細胞에 導入하기 위한 方法이 必要하다. 導入方法으로는 物理的인 方法과 生物的인 方法이 報告된 바 있다. 物理的인 方法으로는 electrophoration법, ethylen-glycol법과 particle gun법등이 있으며, 生物的 方法으로는 virus사용법, Agrobacteria를 利用한 方法등이 있다. 이 중에 electrophoration 법과 Agrobacteria법이 가장 많이 利用되고 있다(旭正, 1989).

electrophoration법은 動物細胞에서 開發된 方法으로 植物에서는 細胞壁의 問題가 있으며, Agrobacteria는 雙子葉植物에 감염하면 腫瘍을 일으키는 細菌으로 이 plasmid 一部가 宿主植物細胞의 染色體 DNA에 들어가는 性質을 가지고 있다. 이 特殊한 性質을 利用하여 植物細胞의 染色體 DNA에 들어가는 部分에 導入하려는 遺傳子를 붙여 형질전환 植物體를 만들어 낸다. 그러므로 이 도입 방법에서는 식물세포에 있는 세포벽의 존재를 별로 의식할 필요가 없어서 植物 특히, 쌍자엽 植物에서 가장 많이 사용하는 방법이 되었다.

chimeric 選拔遺傳子를 가진 *A. tumefaciens* (Horsh *et al.*, 1985)를 가지고 쌍자엽 植物을 形質轉換 한 예는 *Brassica napus* (Radke *et al.*, 1988; Moloney *et al.*, 1989), *Medicago sativa* (Deak *et al.*, 1986), 담배 (An, 1986; Hernandez *et al.*, 1989)와 *Apium graveolens* (Catlin *et al.*, 1988)에서 報告된 바 있다.

林木의 경우에도 *A. tumefaciens*를 이용하여 포플러속 (Fillatti *et al.*, 1987; Parsons, 1986; Chun *et al.*, 1988), *Pinus taeda* (Sederoff *et al.*, 1986), 미송 (Dandekar *et al.*, 1987) 등에서 形질전환 된 植物體를 誘發시켰다. 본 研究는 交雜種인 양황철나무에 대해 *A.*

tumefaciens strain 6044(pGA 472 binary vector; An *et al.*, 1985)를 사용하여 形質轉換 條件을 조사한 것이다. 본 연구의 시료로 사용한 양황철나무는 양버들(*P. nigra*)과 황철나무(*P. maximowiczii*)의 交雜種으로 1983년 林木育種研究所에서 開發된 樹種이다. 이 樹種은 적지에 있어서 生長과 수형은 우수하나 耐病蟲性이 약하며 앞으로 내병충성에 대한 抵抗性 形質의 育成이 필요한 樹種이다 (山林廳, 1988). 본 연구의 結果는 양황철나무에 대한 耐蟲, 耐病性 遺傳子導入에 基礎資料를 提供할 수 있을 것으로 期待된다.

材料 및 方法

植物材料: 器內에서 大量으로 增殖된 양황철나무 줄기는 MS(Murashige and Skoog, 1962) 基本培地에 BA 0.2mg/l와 2,4-D 0.01mg/l를 添加한 培地에서 增殖시켰다 (Park and Son, 1988). 增殖된 個體의 잎을 *A. tumefaciens* strain 6044와 共培養하는 試料로 사용하였다.

A. tumefaciens strain 6044(pGA472): wild type인 A281에 binary vector인 pGA 472를 삽입한 계통이다 (An *et al.*, 1985). pGA 472는 nopaline合成 統制地域(nos)과 Tn5 neomycin phosphotransferase(npt)에 連結된 地域에 植物 kanamycin 耐性 標識遺傳子를 가지고 있으며, ColEI 反復地域(ori), 박테리아파지 람다 cos지역을 가지고 있어서, 이것들이 전부 nopaline Ti

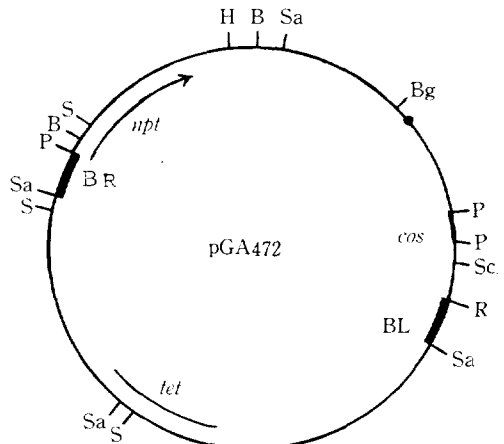


Fig. 1. Map of the pGA 472 plasmid used in the transformation of *Populus nigra* x *P. maximowiczii* (An, 1985).

Table 1. Composition of AB medium for *Agrobacterium tumefaciens* 6044 (An, 1987).

Composition	
20x AB salt (per liter)	: 20g NH ₄ Cl, 6g MgSO ₄ ·7H ₂ O, 3g KCl, 0.2g CaCl ₂ , 50mg FeSO ₄ ·7H ₂ O
20x AB buffer (per liter)	: 60g K ₂ HPO ₄ , 23g NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O
Glucose solution (per liter)	: 5g glucose
Making method	
Autoclave all three solutions separately and then mix 50ml 20x AB salt, 50ml 20x AB buffer, 900ml glucose solution to make 1 liter.	

-plasmid pTiT37의 DNA border와 連結되어 있는 binary vector이다 (그림 1).

*A. tumefaciens*의 植物體內 接種: *A. tumefaciens* strain 6044는 1.5%의 AB배지(표 1; An, 1987)에 kanamycin 25mg/l와 tetracycline 5mg/l를 添加하여 28±2°C 恒溫器에서 接種하였다. 接種 24시간 후부터 42시간 까지 2시간 마다 박테리아 生長을 觀察하여 接種 適正 濃도를 調査하였다.

(1) 박테리아를 除去하기 위한 抗生劑 種類 및 濃度

A. tumefaciens strain 6044를 葉組織에 形質轉換 시킨후 葉표면에 붙어 있는 餘분의 박테리아를 除去하는 最適濃도를 조사하기 위하여 AB 액체배지에 carbenicillin과 cefotaxime을 單獨 및 複合處理하여 28±2°C의 恒溫室에서 24시간 培養한후 박테리아의 繁殖與否를 調査하였다.

(2) 침으로 刺戟한 양황철나무의 kanamycin 濃度別 反應

양황철나무의 기내배양묘의 葉表面을 침으로 刺戟한후 kanamycin 濃度別에 따른 反應을 調査하기 위해 callus 誘發培地(MS-2,4-D 0.5 mg/l-BA 0.1mg/l)와 줄기유도배지(MS-2,4-D 0.01-BA 0.2mg/l)에 共培養한 20일후에 callus와 줄기발생양상을 調査하였다.

(3) 일과의 共培養

OD 0.5에 도달한 박테리아 培養液 10ml를 팔콘 페트리 디쉬에 넣고 이 속에 침으로 葉표면을 상처를 낸 양황철나무잎 (Park and Son, 1988)을 같이 넣어 25±2°C 항온기 속에서 48시간 동안 共배양 하였다.

(4) *A. tumefaciens* 接種 후 耐性個體 選拔

共培養한후 葉표면에 붙어있는 박테리아를 MS 액체배지로 洗滌한후 박테리아 제거에 效果가 좋은 cabenicillin 과 cefotaxime混合溶液 및 形質轉換된 細胞를 選拔하기 위한 kanamycin적정농도를 配合한 寒天培地에서 形質轉換 個體를 選拔하였다. 共培養한 葉조직에서 박테리아가 계속 밖으로 나오기 때문에 4일 마다 같은 배지로 계대배양하였으며, 共培養 50일 후에 葉조직에서 個體發生數를 調査하였다.

結果 및 考察

그림 2는 AB培地에 *A. tumefaciens* strain 6044를 28±2°C 恒溫器에 培養했을때의 時間別로 박테리아의 成長을 測定한 것이다. 培養 30시간에 O.D. 0.5에 到達하였으며, 36시간에서 O.D. 1.0에 到達하였다. 培養 박테리아는 28±2°C에서 32시간 배양한후 4×10⁸/ml의 密度가 되어 600nm에서 OD 0.5-0.6의 濃度에 到達한 것을 植物體

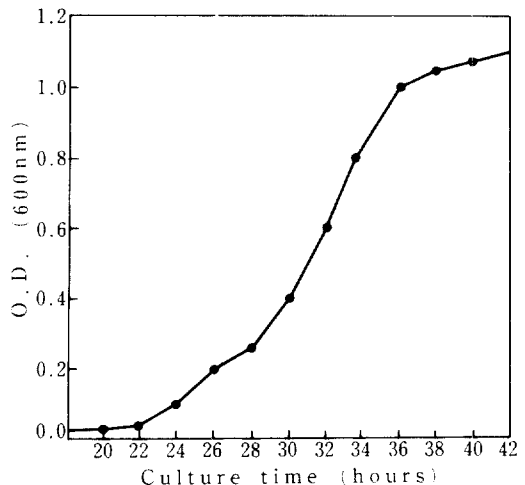


Fig. 2. Growth curve for *Agrobacterium tumefaciens* 6044 (pGA 472) on AB medium.

Table 2. Effect of two antibiotics on the growth of *Agrobacterium tumefaciens* 6044 (pGA 472).

Concentrations of antibiotics(mg/l)		Growth of <i>A. tumefaciens</i>
Carbenicillin	Cefotaxime	
100		++++*
200		+++
300		++
400		-
500		-
	100	++++
	200	++
	300	++
	400	-
	500	-
100	100	+-+
200	100	+-
300	100	+
400	100	-
500	100	-
100	200	+-
200	200	-
300	200	-
400	200	-
500	200	-

* Visual estimation : + + + + : excellent, + + + : good, + + : fair, + : slight, - : negative.

와 共培養에 使用하였다 (그림 2).

형질전환 유전자가 들어있는 運搬體로 使用할 *A. tumefaciens* strain 6044 pGA 472)에 대한 共培養 후 잎표면에 붙어있는 여분의 박테리아를 제거해야 하는데, 이 때에 사용하는 抗生物質 즉 carbenicillin과 cefotaxime 最適處理 濃度를 調査한 것은 표 2와 같다.

AB 액체배지에 carbenicillin 이나 cefotaxime 은 모두 다같이 400mg/l와 500mg/l의 단독처리 시 박테리아가 제거되었으며 複合處理에 있어서는 carbenicillin 400, cefotaxime 100, carbenicillin 500과 cefotaxime 100, carbenicillin 200, 그리고

cefotaxime 200에 carbenicillin 200, 300, 400, 500 mg/l를 添加한 培地에서 완전 제거되었다. 고농도의 항생제를 처리한 경우에는 선발후 植物體 再分化에 問題가 있으므로 되도록 낮은 농도를 사용하는 것이 바람직하다. 본 연구에 사용된 조합은 안정성을 위해 carbenicilline은 300mg/l, cefotaxime은 200mg/l를 添加한 배지에서 박테리아를 제거하였다.

崔(1988)등은 *A. tumefaciens* C₅₈ 系統을 담배 組織에 接種후 여분의 박테리아를 제거하기위해 carbenicillin 200mg/l 이상을 使用하였다. Parsons(1986)등은 A281 과 A348를 1mg/l carbenicillin과 250mg/l cefotaxime을 混合하여 使用하였으며, Dandekar(1987)등은 Douglas-fir 에서 *A. tumefaciens* K12×562E와 K12×167 계통에서 carbenicillin 500mg/l을 처리하여 여분의 박테리아를 제거하였다. Fillatti(1987)등은 포플러에서 Radke(1988)등은 *Brassica napus*에서 carbenicillin 500mg/l, Jordan 과 McHughen (1988)은 아마에서 cefotaxime 250mg/l와 carbenicillin 500mg/l를 混合하여 使用하였다.

양활철나무의 器內培養에 대한 kanamycin 感受性を 조사한 結果 callus 誘發이나 줄기發生에서 같은 反應을 나타냈다 (표 3). 즉 kanamycin 無處理, 0.1mg/l, 1.0mg/l처리구에서는 比較區와 別차이 없이 callus 및 줄기발생이 나타났으나 10.0mg/l이상의 kanamycin濃度에서는 전혀 反應을 보이지않았다. 形質轉換을 위한 kanamycin 耐性 選拔 濃度는 10.0mg/l 以上에서 可能함을 알수 있었다.

崔(1988)등은 담배조직에서 kanamycin 50μg/l, 아마(Jordan & McHughen, 1988)에서 100 mg/l를, *Brassica napus*(Radke et al., 1988)에서는 10mg/l의 kanamycin을 첨가한 배지에서 形

Table 3. Callus (MS-2, 4-D 0.5 + BA 0.1mg/l) and shoots (MS-2, 4-D 0.01 + BA 0.2mg/l) induction derived from punctured leaf explants on regeneration media containing various concentrations of kanamycin sulfate after incubation for 20 days.

Concentration of kanamycin(mg/l)	0.0	0.1	1.0	10.0	30.0	50.0	70.0	100.0	150.0	200.0
Callus induction	++++*	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-
Shoot induction	++++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-

* Visual estimation : + + + +, excellent ; + + +, good ; -, negative.

Table 4. Callus growth from co-cultivated and control (not co-cultivated) leaf explants of *P. nigra* x *P. maximowiczii* cultivated on callus induced medium (2,4-D 0.5+BAP 0.1mg/l) with or without a selective antibiotic kanamycin sulfate after incubation for 50 days.

Concentration of kanamycin	0.0	10.0
Co-cultivated	++++*	++
Not co-cultivated	++++	-

* Visual estimated: + + + +, excellent: + +, good: -, negative

質轉換 개체를 選拔하였다. 포플러의 경우 60mg/l를 選拔培地에 使用하였다 (Chun *et al.*, 1988; Fillatti *et al.*, 1987). 이것은 본 연구에서 사용한 濃度인 kanamycin 10mg/l보다 훨씬 높은 농도이다. 선발시 사용한 抗生劑의 濃度가 높을 수

Table 5. Number of shoots regenerated from co-cultivated and control (not co-cultivated) leaf explants of *P. nigra* x *P. maximowiczii* cultivated on shoot-regenerated medium (MS+2,4-D 0.01+BA 0.2mg/l) with or without the selective antibiotic kanamycin sulfate after incubation for 50 days.

Concentration of kanamycin (mg/l)	Number of shoots	
	Co-cultivated	Not co-cultivated
0.0	30.0±10.0*	178.0±5.0
10.0	3.0±0.0	-

* Each value represents the mean ± SE of 5 replications.

록 細胞生長에 影響을 미치므로 되도록 낮은 濃度의 抗生劑를 使用하여 선발하는 것이 좋다는 報告도 있다 (崔 등, 1988).

표 4는 callus 誘發培地 (MS+2,4-D 0.5mg/l +BA 0.1mg/l)에서 共培養한 후 kanamycin 10

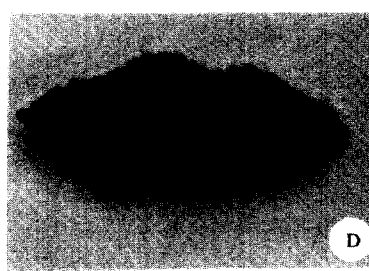
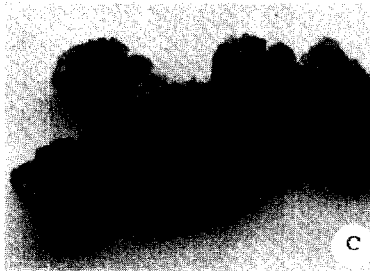
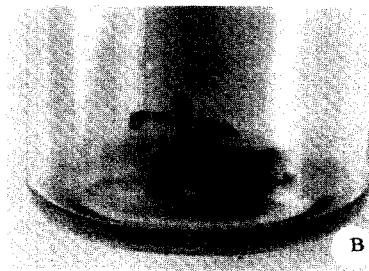
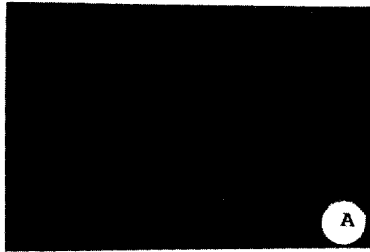


Plate Legend

- Plate A.** Shoots regenerated from punctured leaf of *P. nigra* x *P. maximowiczii* on shoot-regenerated medium (MS+2,4-D 0.01+BA 0.2mg/l) after incubation for 50 days.
- Plate B.** Putative transformed *P. nigra* x *P. maximowiczii* shoot regenerated from punctured leaf on shoot-regenerated medium (MS+2,4-D 0.01+BA 0.2mg/l) with kanamycin sulfate 10mg/l after incubation for 50 days.
- Plate C.** Callus formation from punctured leaf of *P. nigra* x *P. maximowiczii* on callus induced medium (MS+2,4-D 0.5+BA 0.1mg/l) after incubation for 50 days.
- Plate D.** Putative transformed *P. nigra* x *P. maximowiczii* callus from punctured leaf on callus-induced medium (MS+2,4-D 0.5+BA 0.1mg/l) with kanamycin sulfate 10mg/l after incubation for 50 days.

mg/1가 들어있는 배지에서 생긴 callus의 생장을 조사한 결과이다. 共培養한 葉에서는 kanamycin 10.0mg/1를 첨가한 배지에서도 callus가 誘發되어 生長하였으나 共培養하지않은 比較區에서는 callus 誘發도 되지않았다.

표 5는 줄기 誘發培地(MS+2,4-D 0.01mg/1 -BA 0.2mg/1)에서 *A. tumefaciens* strain 6044 와 공배양한 葉과 共培養하지않은 葉을 kanamycin 無處理와 10mg/1를 添加한 배지에 배양하여 接種 50일 이후의 發生한 줄기수를 나타낸 것이다.

共培養하여 내성을 가진 組織에서 나타난 줄기 수는 kanamycin이 없는 배지에서 30개의 줄기가 發生한 것에 비해 非選拔 葉에서는 178개의 많은 수의 줄기를 발생하였다. 10mg/1의 kanamycin이 들어 있는 選拔培地에 接種한 共培養하지않은 非選拔 葉에서는 줄기발생이 전혀없었으나 共培養葉은 10mg/1의 kanamycin이 들어있는 選拔培地에서 3.0개의 줄기가 유도되었다.

Chun(1988) 등은 3개의 포플러 수종에서 *A. tumefaciens* 6044와 6048 系統과 共培養시킨후 kanamycine 60mg/1이 든 再分化 培地에서 한 계통에서만 각각 6개와 3개씩의 줄기를 얻었다. 또한 Fillatti (1987) 등은 C58/587/85의 共培養한 포플러에서 平均 形質轉換率은 3.6%로 나타났다.

본 연구에의 形質轉換率은 이들 kanamycin 10 mg/1가 함유된 배지에서 유도된 줄기를 보다 높은 kanamycin이 들어있는 배지에 生育시킨뒤 재선발하여 NPT-II효소 검정 및 Southern blot과 같은 分子의 水準에서의 形質轉換 結果를 檢定해야 決定 할수있을 것으로 사료된다.

引用 文 獻

1. An, G., B.D. Watson, S. Stachel, M.P. Gordon and E.W. Nester. 1985. New cloning vehicles for transformation of higher plants. EMBO J. 4 : 277-284.
2. An, G. 1986. Development of plant promoter expression vectors and their use for analysis of differential activity of nopaline synthase promoter in transformed tobacco cells. Plant Physiol. 81 : 86-91.

3. An, G. 1987. Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis. Methods in Enzymology. 153 : 292-305.
4. 旭正. 1989. 遺傳子導入植物に關する研究の現狀と將來. 植物 遺傳工學. 1 : 15-22.
5. Catlin, B., O. Ochoa, S. McCormic and C.F. Quiros. 1988. Celery transformation by *Agrobacterium tumefaciens* : Cytological and genetic analysis of transgenic plants. Plant Cell Reports. 7 : 100-103.
6. 崔光泰·陽德春. 1988. *Agrobacterium tumefaciens* 및 煙草 crown gall tumor 組織의 生育에 미치는 抗生劑 및 brilliant green의 영향. 韓國組織培養學會誌. 14 : 131-136.
7. Chun, Y.W., N.B. Klopfenstein, H.S. McNabb, Jr., and R.B. Hall. 1988. Transformation of *Populus* species by an *Agrobacterium* binary vector system. Jour. Korean For. Soc. 77 : 199-207.
8. Dandekar, A.M., P.K. Gupta, D.J. Durzan and V. Knauf. 1987. Transformation and foreign gene expression in micropropagated Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). Bio/Technology. 5 : 587-590.
9. Deak, M., G.B. Kiss, G. Koncz and D. Dudits. 1986. Transformation of *Medicago* by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. Plant Cell Reports. 5 : 97-100.
10. Fillatti, J.J., J. Sellmer, B. McCown, B. Haisig and L. Comai. 1987. *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. Mol Gen Genet. 206 : 192-199.
11. Hernandez, G., C. Frank and C. Maura. 1989. The effect of presumptive polyadenylation signals on the expression of the CAT gene in transgenic tobacco. Plant Cell Reports. 8 : 195-198.
12. Horsch, R.B., J.E. Fry, N. Hoffmann, M. Wallroth, D. Eichholtz, S.G. Rogers and R.T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plant. Science. 227 : 1129-1231.
13. Jordan, M.C. and A. McHughen. 1988. Glyphosate tolerant flax plants from *Agrobacterium* mediated gene transfer. Plant Cell Reports.

- 7 : 281-284.
14. Momcney, M.M., J.M. Walker and K.K. Sharma. 1989. High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. Plant Cell Reports. 8 : 238-242.
 15. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-493.
 16. Park, Y.G. and S.H. Son. 1988. In vitro organogenesis and somatic embryogenesis from punctured leaf of *Populus nigra* × *P. maximowiczii*. Plant Cell Tissue & Organ Culture. 15 : 95-105.
 17. Parsons, T.J., V.P. Sinker, R.F. Stettler, E. W. Nester and M.P. Gordon. 1986. Transformation of poplar by *Agrobacterium tumefaciens*. Bio/Technology. 4 : 533-536.
 18. Radke, S.E., B.M. Andrews, M.M. Noloney, M.I.L. Crouch, J.C. Kridl and V.C. Knauf. 1988. Transformation of *Brassica napus* L. using *Agrobacterium tumefaciens* : Developmentally regulated expression of a reintroduced napin gene. Theor Appl Genet. 75 : 685-694.
 19. 山林廳 林木育種研究所. 1988. 新品種解說-遺傳. 育種學的 特性-林木育種研究所. pp 76.
 20. Sederoff, R., A.M. Stomp, W.S. Chilton and L. W. Moore. 1986. Gene transfer into loblolly pine by *Agrobacterium tumefaciens*. Bio/Technology. 4 : 647-649.