

Particle Bombardment 방법을 이용한 인공 씨감자의 형질전환

최경화 · 전재흥 · 김현순 · 정영희 · 임용표¹ · 정 혁*

한국과학기술연구원 생명공학연구소 식물조직배양 R.U., ¹충남대학교 농과대학 원예학과

Genetic Transformation of Intact Potato Microtuber by Particle Bombardment

CHOI, Kyung Hwa · JEON, Jae Heung · KIM, Hyun Soon · JOUNG, Young Hee · LIM¹, Yong Pyo · JOUNG*, Hyouk

Plant Tissue Culture Research Unit, KRIBB, Taejon, 305-600, Korea: and

¹Department of Horticulture, Chungnam National Univ., Taejon, 305-764, Korea. *Corresponding author.

In vitro grown microtubers of potato (cv Jaju) were used for introduction of herbicide resistance gene using bombardment with DNA-coated particles. The apical shoot-tip area of newly sprouted microtubers were intensively bombarded. After bombardment, microtubers were germinated and transplanted in a greenhouse. Northern blot analysis indicated that *bar* gene was expressed in two plantlets. After 5 weeks of growing, commercial herbicide Basta was sprayed to screen the resistant plants. All untransformed potato plants died after 7 days while two transgenic plants survived.

Key words: transgenic plants

유용한 유전자를 유전공학적인 기법을 통해 식물에 도입시켜서 작물의 품종을 개량하기 위해서는 효과적인 형질전환 방법과 재분화 체계가 매우 중요한 요인으로 작용한다. 외부 유전자를 식물체에 삽입시키기 위해서는 *Agrobacterium* 을 이용하는 방법이 가장 보편적으로 이용되고 있으나 이 방법은 쌍자엽식물과 극소수의 단자엽 식물(Hernalsteens et al., 1984)에만 적용될 뿐 주요 식량자원인 밀, 벼, 옥수수 와 같은 단자엽식물에는 적용이 매우 어렵다. 이를 극복하기 위하여 protoplast uptake (Uchimiya et al., 1986), microinjection (Crossway et al., 1985), electroporation (Hosoyama et al., 1995), pollen uptake (Luo et al., 1988), liposome fusion (Fralely et al., 1982) 등을 이용하여 유전자를 직접 식물체에 도입시키는 방법들이 시도되었다. 그러나 이러한 방법들도 재분화 과정을 거쳐야만 형질전환체를 얻을 수가 있으므로 재분화가 잘 안되는 작물에는 적용할 수 없는 문제점도 가지고 있다. Sanford 등(1987)에 의하여 처음 시도된 biolistic 방법은 코팅시킨 DNA를 초고속 사출에 의하여 식물세포에 도입시킬 수 있는 방법으로서 쌍자엽식물 과 단자엽식물에 모두 이용할 수 있는 장점이 있다. Particle bombardment 방법을 이용하여 *uidA*와 *hph* 유전자를 벼의 배발생 배양 세포에 형질전환시키거나(Zhang et al., 1996), 난의 원피체 분열조직에 NPT II 유전자와 papaya ringspot

virus coat protein 유전자를 형질전환시킨 경우도 있다 (Kuehnle et al., 1992). 또한 작물의 육종을 위하여 영양 번식 작물인 포도의 배양 세포와 고구마의 잎과 엽병같은 재료에 다양한 유전자를 직접 투입, 발현시켜 형질전환체를 만들어 내는 연구들이 활발히 수행되고 있다(Prakash et al., 1992; Kikkert et al., 1996).

감자는 세계 4대 식량자원이며 우리 나라에서도 소비가 급격히 증가하고 있는 중요한 작물이지만 유전적으로 매우 복잡한 구조를 가지고 있어서 기존의 육종 방법에 의하여 신품종을 육성해 내기가 매우 어렵다. 그러나 근래 들어서 급속히 발달한 유전공학 기술을 이용하여 유용한 형질이 도입된 신품종 창성이 단시간 내에 가능하게 되었으며 감자의 형질전환에는 *Agrobacterium*을 이용하는 방법을 주로 이용하고 있다. 그 동안 Desiree, Russet Burbank, Superior, Bintje, Mantiqueira, Maris Piper, Pentland Dell, Maris Bard, Golden Wonder (Wenzler et al., 1989; Sheerman et al., 1988) 등의 재분화가 비교적 쉬운 품종을 대상으로 하여 많은 형질전환 연구가 수행되었지만 막상 재분화가 힘든 품종의 형질전환에 관한 연구는 보고된 바 없다. 본 연구는 *in vivo* 상태로 온전한 조직이나 기관에 외부유전자를 직접 삽입시킬 수 있는 유일한 방법인 particle bombardment 기법을 이용하여 재분화가 잘 안되는 것으로 알려져있는 대부분의

유색계통 감자품종중 자주감자 품종으로부터 형질전환체를 획득하는 것을 목표로 하여 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

식물체의 잎으로부터 재분화율을 관찰하기 위하여 2-3주 동안 배양된 감자(*Solanum tuberosum* L.) Desiree와 자주 품종의 기내 줄기로부터 채취한 잎을 재료로 하여 실험을 수행하였다. 1 cm²로 자른 감자잎 30 절편을 기존의 *Agrobacterium*에 의한 형질전환시 사용하는 재분화 배지 (MS + NAA 0.01 mg/L + GA₃ 0.1 mg/L + zeatin 2 mg/L + kanamycin 100 mg/L + carbenicillin 500 mg/L)에서 6주간 배양하여 shoot를 형성시켰다.

Particle bombardment에 이용하기 위한 소괴경재료는 표피에 자주색을 띄고 있는 자주감자를 선정하였으며 기내에서 수확된 후 발아직전 상태인 20개의 인공씨감자를 사용하였다(Figure 3A).

DNA 코팅 및 bombardment

본 연구를 수행하기 위하여 사용된 플라스미드는 Basta에 저항성을 지니는 *bar* 유전자로서(Lim et al., 1995) 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 농도로 조절하였다. 전처리과정을 거친 후 50% glycerol에 저장시킨 tungsten microcarriers(직경 1.1 μm)(M-17, Bio-Rad) 3 mg에 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DNA와 2.5 M CaCl₂, 0.1 M spermidine을 혼합하여 DNA를 코팅시켰다. 코팅된 DNA입자를 직경이 8 mm인 실리콘 carrier disk ((주)바이오니아) 위에 6 μL 를 도말, 건조시킴으로서 약 0.8 μg 의 DNA와 0.5 mg의 텅스텐 입자가 한번에 투입될 수 있도록 하였다. 준비된 실리콘 carrier disk를 particle bombardment (Gene Gun II™, (주) 바이오니아)에 장착시키고 발아 직전의 인공 씨감자를 배양접시위에 올려놓았다. 그 후 시료와 유전자와의 거리를 4 cm로 조절할 수 있는 아크릴 스페이스를 덮은 다음 헬륨 가스의 압력을 20 kg/cm²로, 아크릴 스페이스내의 진공압을 55 cmHg로 조절하고 인공씨감자의 정단면조직위를 표적으로 맞춘 후 particle bombardment를 작동시켜 유전자를 투입시켰다. 유전자가 투입된 인공씨감자는 온도 23°C, 조도 4000 lux인 배양실로 옮겨서 발아를 유도하였다.

형질전환체 선발

유전자를 도입시킨 후 0.5-1 cm로 발아된 인공씨감자를 온실에 옮겨 심고 5주간 생육시켜서 건강한 식물체를 얻었다. 생육된 식물체의 잎으로부터 Ultraspec™-II RNA

isolation kit (Biotech Lab., Inc.)를 이용하여 분리한 총 RNA 30 μg 을 formaldehyde가 함유된 1% agarose gel에서 4 V/cm 로 전기영동한 후 nylon membrane에서 blot 시키고 DIG probe로 *bar* 유전자의 northern 분석을 실시하였다. 제초제는 일반 농약 상회에서 시판하는 Basta액제를 사용하였고 농도는 농가에서 사용하는 것과 같은 3 L/ha로 조절하였으며 제초제를 살포하고 매일 관찰하면서 내성 정도를 조사하였다.

결과 및 고찰

기존의 *Agrobacterium* 방식에 의한 감자의 형질전환 연구시 품종에 따른 재분화도의 차이를 알아보기 위해 재분화가 용이한 Desiree와 어려운 자주감자 두 품종의 잎절편을 시료로 하여 그 차이점을 비교하였다. 배양후 6주가 지나도록 자주 품종은 전혀 재분화되지 않는 반면 Desiree 품종은 96% 정도의 높은 재분화율을 나타냈으며 시료당 재분화된 shoot의 수도 5개 정도였고 길이 또한 1.7 cm 정도였다(Table 1).

Table 1. The regeneration of shoots from leaf explants of two cultivars of *Solanum tuberosum* in culture on MS medium.

Cultivar	No. of explants	% of regeneration	No. of shoots/explant	Length of shoots (cm)
Jaju	30	0	0	0
Desiree	30	96	5.0 ± 3.2 ^a	1.7 ± 1.4

^aMean ± standard deviation.

자주 품종은 배양 2주까지는 절단면에서 약간의 자주색 캘러스가 형성되다가 그 이후로는 변화가 없고 배양기간이 길어질수록 고사하거나 노란색으로 탈색되는 잎절편수가 점점 증가하였다. 그에 비하여 Desiree 품종은 배양 1주일 후부터 캘러스가 잎절단면에서 형성되기 시작하였고 2주 후부터는 캘러스로부터 multiple shoots가 형성되어 왕성하게 재분화 되었다(Figure 1).

자주감자처럼 재분화가 잘안되는 품종은 *Agrobacterium*을 이용하여 형질전환 시킬 수 없다. 그러므로 외부 유전자를 물리적인 힘에 의하여 직접 세포속에 삽입시킬 수 있는 particle bombardment 방법을 사용하였다. 본 실험에서는 발아 직전의 인공씨감자를 재료로 사용하였는데(Figure 3A) 인공씨감자의 눈이 정단면에 모여 있는 건강한 인공씨감자만을 선발하였다. 정단면에 모여 있는 씨눈을 표적으로 하여 *bar* 유전자를 투입시키고 온실에 심기에 적당한 상태까지 발아시킨 다음(Figure 3B) 온실에 옮겨 심었다. 온실에서 생육되는 식물체로부터 RNA를 추출하여 northern 분석을 실

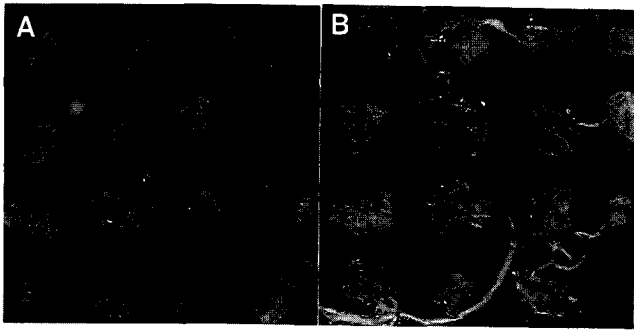


Figure 1. The comparison of regenerated shoots from leaf explants of *Solanum tuberosum* cvs Jaju (A) and Desiree (B). A, No shoot regenerated from leaf explants of Jaju and leaves turned white upon prolonged incubation; B, Shoots regenerated from leaf explants of Desiree under the same culture conditions.

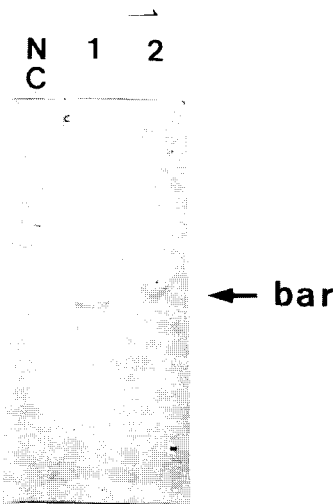


Figure 2. Northern blot analysis of the *bar* gene in transformed potato plants. Thirty microgram of total RNA was hybridized with DIG labelled *bar* gene. NC, Nontransgenic potato: Lanes 1-2, Transgenic potatoes cv Jaju.

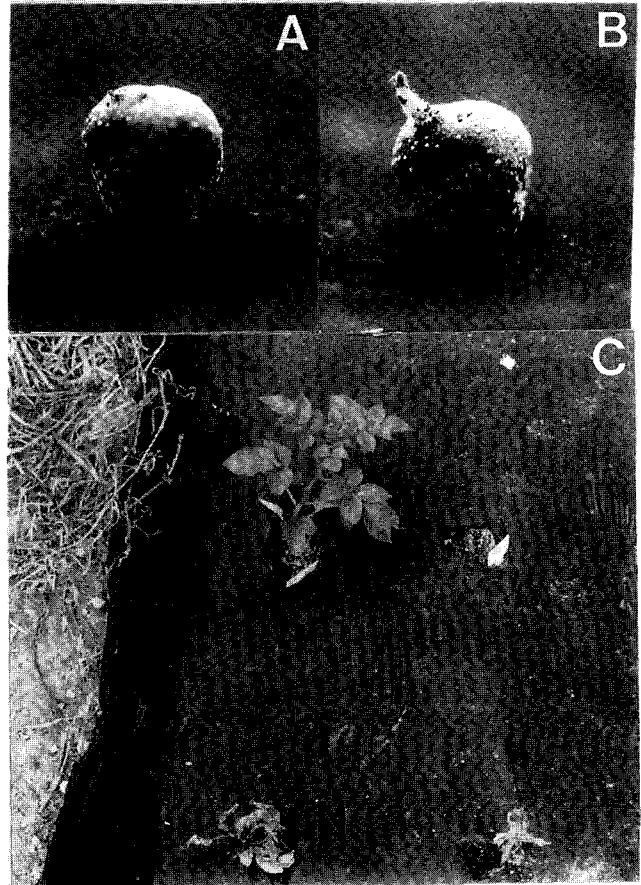


Figure 3. A) Potato microtuber cv Jaju at the time of particle bombardment. B) Sprouted potato microtuber, incubation at 23°C, 4,000 lx after bombardment with 0.8 µg of tungsten particle using the flowing helium device. C) Spraying test of potato plants with Basta. Nontransgenic plants (N) bleached, shrank and showed necrotic lesions within one week of spraying. Transformed (T) plant showed resistance to the herbicide, and it grew vigorously.

시한 결과 유전자가 안정적으로 발현된 2개 자주감자 형질 전환체를 선발할 수 있었다(Figure 2).

포장에서 5주간 생육시킨 식물체에 직접 Basta 농약을 살포하여 형질전환시킨 유전자의 발현 여부를 검정하였다. Basta 농약은 식물의 광호흡이나 암모니아 대사과정중의 glutamine synthetase를 저해하므로써 그 결과 체내에 암모니아가 축적되어 식물체가 고사되는 강력한 비선택성 제초제로서 살포 후 2-5일 정도 지나면 약효가 나타나고 유효 성분은 땅에 떨어지면 곧 분해되므로 이 농약을 사용한 후에 작물을 이식해도 피해가 없는 우수한 제초제이다 (Thompson et al., 1987). 일반 농가에서 적용하는 농도의 농약을 뿌린 2일 후부터 주변 잡초들과 형질전환이 안된 감자 식물체들은 약해를 입기 시작하였고 일주일 후에는 모두 고사하였다(Figure 3C). 반면 형질전환체들은 전혀 약해를 입지 않아서 particle bombardment방법에 의한 형질전환이 성공적으로 이루어졌음이 확인되었다.

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환시 재료식물체의 효과적

인 재분화는 매우 중요하다. 그 이유는 재분화된 많은 식물체 중에서 유전자가 제대로 삽입된 재분화 식물체는 극히 적은 수이기 때문이다. 아마(*Linum udiysyddimum*)를 재료로 하여 *Agrobacterium*을 이용한 GUS 유전자 형질전환 실험의 경우(Dong et al., 1993) 재분화된 236개의 식물체중에서 형질전환이 확인된 shoots의 수는 15개로서 6.4%의 비율에 불과했다. 이 비율을 높이기 위하여 여러가지 실험 방법을 달리하였으나 결국 10%를 넘지 못하였다. 재분화율을 높이기 위하여 배지의 호르몬 조성을 달리하거나 (Komatsuda et al., 1992) 재분화를 저지하는 물질인 에틸렌 억제에 관한 연구들이 진행되고 있다(Palmer, 1992). 감자의 경우도 엽편형질전환법시 10 mg/L의 AgNO₃를 첨가하여 캘러스 형성율을 높여주고 있는데 추후 자주감자와 같은 유색계통 감자의 배지내 첨가물질의 혼용 및 생장호르몬, 유전적 특성 등에 대해서도 더 연구해야 할 필요성이 있는 것

으로 사료된다. De Block (1988)은 Russet Burbank 품종은 다른 품종에 비하여 조직배양시 에틸렌 생산량이 많아서 재분화가 잘 안된다고 보고하였다. 그러므로 형질전환연구시 재분화가 용이한 재료를 선택하는 것이 중요하며 그 외에도 배양환경, 벡터시스템, 형질전환방법, 선발과정 등도 고려해야 할 요인들이다. 재분화가 안되는 품종의 경우 in vivo 상태로 외래 유전자를 도입시킬 수 있는 방법은 particle bombardment 방법이 유일하다. 그러나 이 방법은 형질전환된 부분과 형질전환되지 않은 부분을 갖는 키메라 식물체가 나올 수 있는 단점도 있다. 모두 20개의 particle bombardment 처리개수중 2개에서만 효과적으로 삽입되어 발현되었는데 이는 Desiree 품종처럼 다수줄기가 나오는 품종에 비하여 매우 낮은 효율이지만 정상적으로 재분화가 안되는 붉은 계통의 감자 품종에서는 효과적이었다. 본 실험에서는 reporter gene으로 실용성이 있는 제초제 저항성 유전자를 이용함으로써 직접 포장에서 검정하여 이용할 수 있게 하였다. 외부 유전자가 particle bombardment 방법에 의하여 성공적으로 발현되기 위하여는 여러 가지 요인들이 작용하는데 예를 들면 시료의 생리적 상태, 세포벽의 두께와 견고정도 등 구조적인 문제, 표적 부위의 피해를 최소화시키는 텅스텐 입자들의 효율적인 penetration, bombard한 세포들에서 투입된 외래유전자들의 발현정도 등에 의하여 영향을 받는다. 그러므로 particle bombardment 방법을 이용하여 재분화가 잘 안되는 품종에서 보다 많은 수의 형질전환체를 얻기 위해서는 추후 더 세심한 연구가 이루어져야 할 것이다.

적 요

제초제 저항성 유전자를 코팅시킨 입자를 particle bombardment 기법으로 자주감자 품종의 인공씨감자에 도입시켰다. 발아직전에 있는 인공씨감자의 생장점 부위를 집중적으로 particle bombardment 한 후 발아한 인공씨감자를 온실에 심었다. 온실에서 5주동안 생육시킨 후 northern 분석 결과 유전자가 발현된 2개의 형질전환체를 선발하였고 제초제 살포 실험을 한 결과 형질전환 되지 않은 식물체는 모두 고사하였지만 형질전환된 2개의 자주감자 식물체는 생존하였다.

인용문헌

- Crossway A, Oakes JV, Irvine JM, Ward B, Knauf VC, Schwamaker CK (1985) Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Mol Gen Genet* 202: 179-185
- De Block M (1988) Genotype independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor Appl Genet* 76: 767-774
- Dong JZ, Mchughen A (1993) An improved procedure for production of transgenic flax plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 88: 61-71
- Fraley RJ, Dellaporta SL, Papabadjopoulos D (1982) Liposome-mediated delivery of tobacco mosaic virus RNA into tobacco protoplasts: a sensitive assay for monitoring liposome-protoplast interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 1859-1863
- Hernalsteens JP, Thia-Toong L, Schell J, Montagu M (1984) An *Agrobacterium*-transformed cell culture from the monocot *Asparagus officinalis*. *EMBO J* 3: 3039-3041
- Hosoyama H, Irie K, Abe K, Arai S (1995) Introduction of a chimeric gene encoding an oryza cystatin- β -glucuronidase fusion protein into rice protoplasts and regeneration of transformed plants. *Plant Cell Rep* 15: 174-177
- Kikkert JR, Hebrt-Soule D, Wallace PG, Striem MJ, Reisch BI (1996) Transgenic plantlets of 'Chancellor' grapevine (*Vitis* sp.) from biolistic transformation of embryogenic cell suspensions. *Plant Cell Rep* 15: 311-316
- Komatsuda T, Lee W, Oka S (1992) Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators in soybeans *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Cell Tiss Org Cult* 28: 103-113
- Kuehnle AR, Sugii N (1992) Transformation of *Dendrobium* orchid using particle bombardment of protocorms. *Plant Cell Rep* 11: 484-488
- Lim YP, Kim HR, Park JY, Nam SH, Cho YH (1995) Transformation and genetic analysis of herbicide resistant tobacco and tomato by transformation of modified bar gene using site directed mutagenesis method. *RADJ Agri Sci* 37: 45-53
- Luo Z, Wu R (1988) A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. *Plant Mol Biol Rep* 6: 165-174
- Prakash CS, Varadarajan U (1992) Genetic transformation of sweet potato by particle bombardment. *Plant Cell Rep* 11: 53-57
- Palmer CE (1992) Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate. *Plant Cell Rep* 11: 541-545
- Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N (1987) Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Sci Tech* 5: 27-37
- Sheerman S, Bevan MW (1988) A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors. *Plant Cell Rep* 7: 13-16
- Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Cramer K, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J* 6: 2519-2523
- Uchimiya H, Fushimi T, Hashimoto H, Harada H, Syono K, Sugawara Y (1986) Expression of a foreign gene in callus derived from DNA-

treated protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.). Mol Gen Genet **204**: 204-207
Wenzler H, Mignery G, May G, Park W (1989) A rapid and efficient transformation method for the production of large numbers of transgenic potato plants. Plant Science **63**: 79-85
Zhang S, Chen L, Qu R, Marmey P, Beachy R, Fauquet C (1996)

Regeneration of fertile transgenic indica (group 1) rice plants following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells. Plant Cell Rep **15**: 465-469

(1996년 11월 25일 접수)