

Agrobacterium tumefaciens vector를 利用한 양황철의 形質轉換^{1*}

孫碩奎² · 玄正悟²

Transformation of *Populus nigra* × *P. maximowiczii* Using *Agrobacterium tumefaciens* vectors^{1*}

Suk Gyu Son² and Jung Oh Hyun²

要 約

Promoter가 없는 외래유전자를 이용하여 形質轉換시키고자 할 때의 最適條件 및 효율적인 形質轉換體의 검정방법을 究明하고자 山林廳 林木育種研究所에 식재된 잡종 포플러 양황철 62-9클론을 사용하여 재분화를 유도하고, 器內 形質轉換實驗을 실시하였다.

器內에서 식물체 재분화 유도를 위해서는 배지조성과 호르몬 농도의 조합이 가장 영향을 많이 끼치는 요인이었다. 여러 조합으로 엽조직(5×5mm leaf strip)을 시료로 하여 MS 기본배지에 0, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0mg/ℓ NAA, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0mg/ℓ BAP를 혼합 처리하여 배양한 결과, 0.1mg/ℓ NAA, 0.5mg/ℓ BAP를 첨가한 호르몬 조합에서 줄기 분화율 및 explant당 분화된 부정줄기수가 상대적인 비율 94%(11.4개)로서 가장 높았다. 따라서 形質轉換된 葉組織을 재분화 시킬 때 이 조건을 줄기분화유도 배지(SIM; shoot-inducing medium)로 사용하였다.

선발유전자에 의한 抗生劑의 選拔濃度を 알기 위해 pBI121로 形質轉換 실험을 한 결과, cocultivation 한 후 100mg/ℓ Km(kanamycin) 또는 60mg/ℓ G418(geneticin)이 첨가된 SIM 3 배지에서 2주가 경과하면서 육안으로 形質轉換된 부정아를 관찰할 수 있었고, 이 부정아를 SIM 3로 옮긴지 6주 후에는 0.5-1cm 크기의 부정줄기로 자랐다. 그러나 對照 葉組織은 부정아형성이 거의 되지 않아, 선발유전자의 抗生劑 選拔濃度は 이 조건이 최적임을 알 수 있었다. 또한 形質轉換體의 재분화율을 높이기 위해 5-azacytidine을 처리한 결과, 抗生劑 선발배지하에서 재분화율을 5.7%에서 26.7%까지 높일 수 있었다.

Fluorometric 및 histochemical assay 방법으로 GUS 유전자의 活性을 검정한 결과 vector system 간에 形質轉換率이 서로 다름을 확인할 수 있었다. LBA4404/pBI121을 vector로 사용한 양황철의 器內 形質轉換 실험에서는 낮은 形質轉換率(5.7%)을 보였다. 그러나 보다 感染性이 높은 super virulence 유전자를 포함하는 pEHA101을 helper plasmid로 하여 실험한 결과 形質轉換率이 35.9%로 pAL4404보다 훨씬 효과적인 것으로 나타났다. 따라서 promoter가 없는 외래유전자를 이용하여 promoter tagging을 하고자 할 때 形質轉換 실험에는 helper plasmid로써 pEHA101을 이용하는 것이 적합한 것으로 판명되었다.

ABSTRACT

This study was conducted to find the optimum transformation condition using *Agrobacterium* harboring promoterless GUS gene.

¹ 接受 1997年 11月 10日 Receive on November 10, 1997.

² 서울대학교 산림자원학과 Department of Forest Resources, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea.

* 이 논문은 1994-1996년도 과학기술처 특정과제개발사업에 의하여 수행된 연구결과의 일부임.

The optimal medium for shoot induction from leaves of *Populus nigra* × *P. maximowiczii* was MS medium supplemented with 0.1mg/ℓ NAA, 0.5mg/ℓ BAP(94% regeneration frequency and 11.5 average number of shoot)

According to the test using pBI121, the concentration of antibiotics for selection marker gene was 100mg/ℓ kanamycin or 60mg/ℓ geneticin in the SIM(shoot inducing medium) 3. Two weeks later, callus was induced in the SIM 3 and this callus grew up to 0.5-1cm shoots after 6 weeks in the new SIM 3. And the treatment with methylation inhibitor(5-azacytidine) led to a dramatic increase in foreign gene expression rate from 5.7% to 26.7%.

The vector systems showed different transformation efficiencies based on the fluorometric and histochemical GUS assay. In this study the vector systems used for transformation seemed to affect transformation frequency, in which pEHA101 yielded more transformants(35.9%) than LBA4404/pBI121 did(5.7%). This result indicated that pEHA101 was effective to insert the promoterless foreign gene into a poplar genome.

Key words : *Populus*, transformation, GUS gene, GUS assay.

緒 論

과거로부터 현재에 이르기까지 임목육종을 위한 다양한 육종방법들이 이용되고 있다. 그러나 농작물과는 다르게 임목은 세대간의 길이가 길어 육종에 장기간이 소요되고, 成熟木의 크기가 커서 다루기 곤란하다는 점이다. 이와 같은 문제점을 극복하기 위한 한가지 방법으로 외래 유전자 도입을 통한 形質轉換 기술을 임목육종에도 적용할 수 있다(Fillatti 등, 1987; Walter 등, 1994). 나아가 외래유전자와 식물체 genome간의 相互調節機能에 대한 연구를 통해 실제적으로 이용될 수 있는 形質轉換 식물체의 생산도 가능하며, 이를 위해서는 形質轉換體에 대한 再分化條件의 체계화가 선결되어야 한다(Echt 등, 1994).

임목을 대상으로한 形質轉換體 再分化 연구는 포플러를 model system으로 하여 시작되었으며(Parson 등, 1986; Fillatti 등, 1987; Pythoud 등, 1987), 形質轉換된 細胞로부터 완전한 植物體를 유도하는데 성공하였다. 이후 形質轉換 對象樹種의 범위도 점차 확대되고 있으며, 조직배양시 영향을 미치는 외적요인분석(De Block, 1990), 배지와 生長調節物質의 적정조건 규명(Glenn 등, 1994), 器內 및 器外 방법의 차이(Chung 등, 1994)와 營養要求物質이나 pH등 菌株培養方法의 차이에 따른 분석(Confalonieri 등, 1994) 등이 이루어졌다. 그러나 形質轉換식물체는 성장상태가 비정상적일 경우가 많고, 일정 기간 경과후 삽입된 외래유전자가 소실되는 등 실용화에 있어

많은 문제점이 나타나고 있다(Ahuja, 1996). 따라서 최근에는 분자생물학 기술의 발달에 따라 식물체 내로 도입된 유전자의 發現樣相에 대한 연구가 주로 이루어져 形質轉換體를 실용화하기 위한 연구가 활발히 수행되고 있다(Chun과 Klopfenstein, 1995). 이러한 연구는 두 가지 방향으로 이루어지고 있는데, 하나는 形質轉換體에서의 도입유전자 發現樣相 조사를 통해 유전자 發現機作을 연구하는 것이고, 다른 하나는 식물체의 발달단계에 의해서 조절되거나 組織特異的인 發現을 유도하는 promoter에 대한 연구이다(Subramaniam 등, 1993; Ellis, 1994). 이런 연구를 위해 많이 사용되는 방법중 하나는, 식물의 상처부위를 통해 감염되는 *Agrobacterium*의 특성을 이용하는 것이다. *Agrobacterium*내의 T-DNA라는 부위는 식물체 genome 속으로 전이되어 식물체 유전자의 일부처럼 자연스럽게 위치하게 되는데, 이렇게 외래유전자가 삽입된 부위를 분리, 탐색하는 방법이 gene tagging이다. 따라서 promoter가 없는 외래유전자를 이용하여 식물체를 形質轉換시킨후 이 形質轉換體로부터 외래유전자의 삽입위치에 대한 연구를 통해 안정적인 形質轉換體의 생산에 기여할 수 있을 것이다.

본 연구는, *Agrobacterium*을 이용하여 양황철을 形質轉換 시키고 이 形質轉換體를 검정하는 조건들을 최적화 함으로써, promoter가 없는 외래유전자를 사용하여 形質轉換시킬 때 사용할 수 있는 체계적인 방법을 제시하는데 있다.

材料 및 方法

1. 共試 材料 및 植物體 再分化條件 說明

본 실험의 공시재료로 산림청 임목육종연구소에서 육성된 양황철(*Populus nigra* × *P. maximowiczii*) 62-9 clone의 葉組織을 채취하여 사용하였다. 葉組織의 멸균소독을 위해 20% (v/v) 표백제(유한락스)에 5분, 70% 에탄올에 1분, 다시 무균상내에서 20% (v/v) 표백제(유한락스)에 5분간 침적한 뒤 멸균수로 3-4회 세척하여 조직배양 시료로 사용하였다.

形質轉換된 식물체를 얻기 위한 줄기재분화배지(SIM: shoot inducing medium)와 callus 유도배지(CIM: callus inducing medium)를 구명하

기 위하여 NAA(naphthaleneacetic acid)와 BAP(6-benzyladenine)를 농도조합별로 MS 기본배지에 첨가하여 적정 호르몬 농도를 조사하였다(0.01, 0.1, 0.5, 1.0mg/l NAA, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0mg/l BAP),(Table 1).

2. 使用 菌株

양황철나무의 최적 形質轉換 조건을 규명하기 위하여 본 실험에 사용한 *Agrobacterium tumefaciens* host strain은 LBA4404와 EHA101이며, binary vector는 pBI121(Hood 등, 1986; 1987)을 이용하였고(Table 2, Fig. 1(a)), promoter tagging을 위한 binary vector는 pOST2002(Park 등, 1993)를 사용하였다(Fig. 1(b)).

Table 1. The composition of plant tissue culture media used in this study.

Medium Composition	CIM*	SIM**1	SIM 2	SIM 3
Salts and vitamins	MS	MS	MS	MS
MES g/ℓ	0.5	0.5	0.5	0.5
Sucrose g/ℓ	20	20	20	20
2,4-D mg/ℓ	0.5	—	—	—
NAA mg/ℓ	—	0.1	0.1	0.1
BAP mg/ℓ	—	0.5	0.5	0.5
Vancomycin mg/ℓ	—	—	500	500
G418 mg/ℓ	—	—	—	60

All the media were solidified with 0.8% Phytoagar™

* CIM: callus-inducing medium, ** SIM: shoot-inducing medium

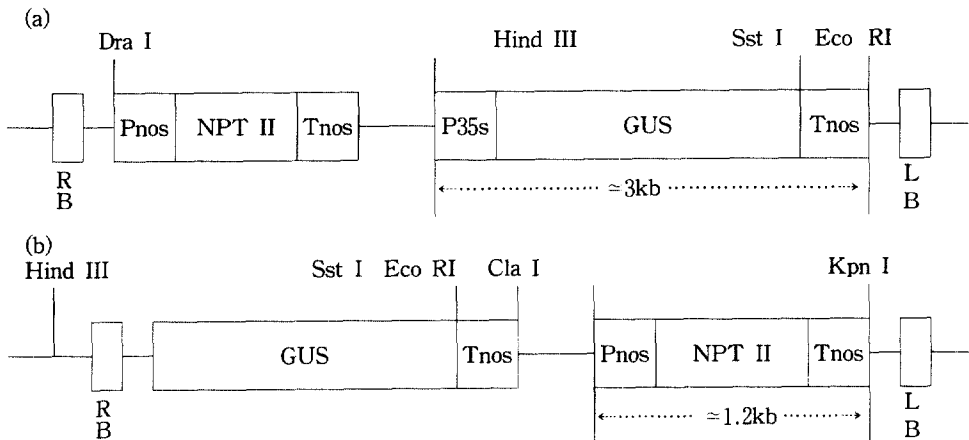


Fig. 1. Schematic representation of the T-DNA region of the *Agrobacterium* binary vectors (Hood, *et al.* 1986, 1987; Park, *et al.* 1993)

(a): pBI121 (15 kb) (b): pOST2002 (28 kb)

RB; right border LB; left border Pnos; nos Promoter Tnos; nos Terminator

NPT II; neomycin phosphotransferase II

P35S; Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter

GUS; β -glucuronidase

Table 2. *Agrobacterium tumefaciens* strains used for the transformation of *Populus nigra* × *P. maximowiczii*.

<i>Agrobacterium tumefaciens</i> host strain	Oncogenic parent	Helper plasmid	Selection marker
LBA 4404	Ach5	pAL 4404	streptomycin
C58C1	Bo542	pEHA 101	kanamycin

3. 抗生劑 耐性調查

양황철나무 葉組織의 耐性程度를 조사하기 위하여 binary vector인 pBI121을 가진 *Agrobacterium tumefaciens* 菌株에 接種된 葉組織과 對照 葉組織을 callus 유도배지(CIM, callus inducing medium)에 각각 배양하여 callus 성장상태를 관찰하였다. 배지에 첨가한 항생제의 농도는 0-200 mg/ℓ의 Km(kanamycin) 및 0-100mg/ℓ의 G418 (geneticin)이었다.

4. 양황철 葉組織 形質轉換

먼저 葉組織(5×5mm leaf strip)을 고체 CIM 배지에서 3일간 preculture하였다. 抗生劑가 첨가된 LB(Luria Broth) 배지에서 24-48시간 동안 자란 菌株培養液 5ml를 액체 CIM배지 100ml에 섞어 넣고 preculture한 葉組織을 10분간 浸漬하여 菌株를 接種하였다. 接種한 葉組織을 고체 SIM 1 배지로 옮겨 48시간 동안 共助培養(cocultivation)하였다. Cocultivation한 葉組織을 액체 SIM 2 배지로 2-3회 씻고 vancomycin 500mg이 첨가된 고체 SIM 3 배지에 2-3회 옮겨 조직외부

의 *Agrobacterium*을 사멸시키면서 완전한 植物體로 유도하였으며 2주 간격으로 繼代培養을 실시하였다.

5. 形質轉換 植物體의 檢定

形質轉換 여부를 검정하기 위하여 抗生劑를 첨가한 선발배지에서 배양된 形質轉換 植物體들을 대상으로 GUS 활성반응을 보이는 植物體를 형광 분석방법(Fluorometric assay, Scott 등, 1988)과 조직화학적 방법(Histochemical assay, Jefferson, 1987)의 두 가지 방법을 사용하여 최종선발하였다.

1) 螢光分析法(Fluorometric assay)

조직배양을 통한 形質轉換 방법에 의하여 얻어진 재분화 植物體를 GUS extraction buffer로 마쇄한 후 12,000xg에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 여기에 GUS 螢光分析 buffer를 첨가한 다음 37°C에서 15시간 반응시켰다. 반응액에 0.2M Na₂CO₃를 첨가하여 반응을 종결시킨 후, fluorometer(TKO-100 mini fluorometer, Hoefer Scientific Co.)를 이용하여 GUS 유전자의 發現을 간접적으로 추정하였다.

螢光分析에 사용된 시약 및 용액의 조성은 Table 3과 같다.

2) 組織化學的 分析(Histochemical assay)

위 螢光分析에 의하여 대조구에 비해 높은 GUS 활성을 보이는 재분화植物體를 선발하고 그 조직을 1ml 반응용액 (15mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-Gluc), 0.5mM po-

Table 3. The buffer composition used in Fluorometric GUS assay.

Fluorometric GUS assay solution	Composition of solution		
* 200mM sodium phosphate	mixture of 0.2M NaH ₂ PO ₄ (39ml) and 0.2M Na ₂ HPO ₄ (61ml), pH 7.0		
* GUS extraction buffer	200 mM NaPO ₄ , 0.5 M EDTA, Triton X-100 Sarcosyl β-mercaptoethanol	pH 7.0 pH 7.0	25.0 ml 2.0 ml 0.1 ml 0.1 g 69.75μℓ
* 1mM 4-methyl umbelliferon (4-MU)	GUS extraction buffer containing 1mM 4-methyl umbelliferyl glucuronide (4-MUG)		
* GUS Fluorometric buffer			
* 0.2M Na ₂ CO ₃			

tassium ferricyanide, 0.5mM potassium ferocyanide, 0.1M NaPO₄ (pH 7.0), 10mM dithiothreitol)에 담구어 37°C에서 약 12시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 조직을 인산 緩衝液(pH 7.0)으로 세척한 다음 5% glutaraldehyde로 실온에서 2시간 동안 고정한 후 해부현미경으로 관찰하였다.

3) PCR방법에 의한 확인

위 두가지 방법의 GUS assay를 통하여 검정한 재분화식물체의 形質轉換 여부를 PCR 방법으로 확증하기 위하여 Jefferson 등(1986)에 의해서 보고된 GUS 및 NPT II DNA sequence에 근거하여 PCR primer를 제작하여 PCR을 수행하였고, PCR 반응은 Williams(1989)의 방법을 변형하여 사용하였다(Table 4). 식물체의 genomic DNA는 Edwards 등(1991)의 방법을 응용하여 분리하였다. 먼저 마쇄한 葉組織을 1.5ml Eppendorf tube에 반쯤 넣고 DNA 추출용 buffer 500 μ l를 넣어서 골고루 섞은후 5mM의 potassium acetate 500 μ l을 넣어 흔들고 이를 65°C에서 15분간 incubation하였다. 다시 10분간 cooling한 후 상온, 13,000xg에서 15분간 원심분리하여 상등액을 추출하였다. 추출한 상등액의 1배 vol.의 chloroform : isoamyl alcohol(24 : 1) 600 μ l를 첨가한 다음 4°C, 13,000xg에서 15분간 원심분리하여 다시 상등액을 추출하였다. 추출한 상등액의 1/5 vol.의 10M ammonium acetate와 1 vol.의 차가운 isopropanol을 넣은후 다시 4°C, 13,000xg에서 15분간 원심분리하여 DNA 침전을 유도하였다.

結果 및 考察

1. 양황철 組織培養 및 재분화 유도

양황철나무의 葉組織을 배양한 결과, MS배지

에 0.1(mg/l)NAA와 0.5(mg/l) BAP를 첨가한 조합에서 가장 높은 줄기형성율(94%)을 얻었다.

2. 器內에서의 抗生劑 耐性調查

Fig. 2와 3은 形質轉換 실험에서 선발표지로 이용되는 NPT II 유전자의 發現에 의한 양황철의 Km(kanamycin)과 G418(geneticin) 내성정도의 조사결과이다. Kanamycin의 경우 100mg/l 농도 이상의 배지에서 對照 식물체는 반응을 보이지 않은 것으로 보아 양황철의 kanamycin 耐性 선발조건으로는 100mg/l의 농도가 적합한 것으로 생각되며 이는 다른 *Populus*속 수종의 경우와 일치한다(De Block, 1990; Confalonieri 등, 1994; Yingchuan 등, 1993). 현재까지 보고된 *Populus*속 수종의 kanamycin에 대한 耐性濃도를 보면 40-100mg/l로 수종 및 클론간에 차이가 심한 것으로 알려져 있다(Chun 등, 1988; Riemenschneider, 1990).

G418 (geneticin)은 화학구조상 Km과 비슷하나 Km보다 강력한 것으로 알려져 있는데 hybrid poplar(*Populus alba* × *P. grandidentata*)의 현탁 배양된 세포를 形質轉換할 때 효과적이라 하며 최적농도는 40mg/l라고 보고되어 있다(Howe 등, 1994).

본 실험에서 양황철 葉組織을 대상으로 G418의 耐性を 조사한 결과 60mg/l 농도가 선발농도로 적합한 것으로 나타났다(Fig. 3).

3. pBI 121을 이용한 양황철 形質轉換

양황철나무를 器內 形質轉換시킬 때 적합한 배지 조건을 알기 위하여 pBI121을 사용하여 形質轉換 실험을 하였다. 葉組織과 菌株를 共助培養한 후 2주가 경과하면서 G418이 첨가된 SIM 3 배지에서 부정아를 육안으로 관찰할 수 있었으며, 이를 SIM 3 배지로 계대배양하여 6주 후에는 0.5-1cm 크기의 부정줄기로 자랐다.

Table 4. Thermocycle used for the amplification of GUS and NPT II gene

Step	*Denaturation time (sec)	Primer **annealing time(sec)	Primer ***extension time(sec)	No. of cycles
1	60	40	120	2
2	40	40	100	18
3	30	30	120	18
4	30	30	150	12
5	0	0	300	1

* Denaturation temp. : 92°C, ** Annealing temp. : 52°C, *** Extension temp. : 72°C

LBA 4404/pBI 121로 양황철을 形質轉換한 결과 선발배지에 치상된 87개의 잎 조각(leaf segments)에서 5개(5.7%)의 leaf segments만이 부정줄기를 형성하였으며, pEHA101을 이용하였을 때는 39개의 잎조각(leaf segments)에서 14개(35.9%)의 leaf segments가 부정줄기를 형성하였다. 이 결과로부터 vector system의 형질전환율을 상대적으로 비교할 수 있었다. 즉 낮은 形質轉換率(5.7%)을 보인 전자에서는 helper plasmid인 pAL4404의 낮은 효율에 기인하는 것이며, super virulence를 지니는 pEHA101을 helper plasmid로 사용하였을 경우, 6배이상 많은 leaf segments가 선발배지하에서 부정줄기를 형성하고 있어 helper plasmid에 의해 상대적으로 形質轉換率(5.7%)이 달라진다는 것을 증명하고 있다. 이러한 결과는 *Populus*屬 수종을 대상으로 한 形質轉換 실험결과와 일치하는 것으로(Chun 등, 1988; Hood 등, 1993; Confalonieri 등, 1994) 양황철 promoter tagging을 위한 helper plasmid로는 pEHA101이 적합함이 판명되었다(Table 5).

재분화된 식물체의 形質轉換 여부를 확인하기 위하여 부정줄기를 형성하는 잎조각과 그렇지 못하는 잎조각을 모두 형광분석법을 실시하여 fluorometer상에 나타나는 상대적수치로 GUS 유전자의 산물을 검정하였다. Table 3의 螢光分析 buffer를 사용하여 측정된 4-MU의 농도로부터 酵素 β-glucuronidase의 양을 수치에 따라 간접적으로 추정하고, 부정줄기를 형성하지 못하는 leaf segments 비해 3배이상의 수치를 보이는 leaf segments를 대상으로 조직화학적 검정법을 수행한 결과 강한 청색반응을 나타내어 形質轉換되었음을 확인할 수 있었다. 한편, fluorometer로 측정할 때 形質轉換 되지 않은 대조구에서도

Table 5. Effects of different regeneration ratio according to the *A. tumefaciens* host strains

	EHA101/ pBI121	LBA4404/ pBI121
No. of leaf segments inoculated (A)	39	87
No. of leaf segments producing shoots (B)	14	5
No. of regenerations under the selection medium (B/A %)	35.9	5.7

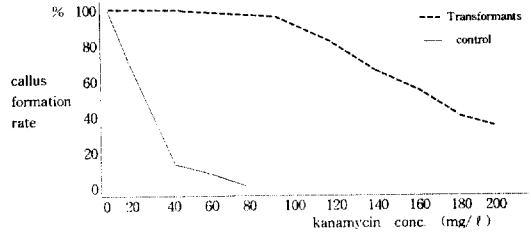


Fig. 2. Callus formation rate in various kanamycin concentrations.

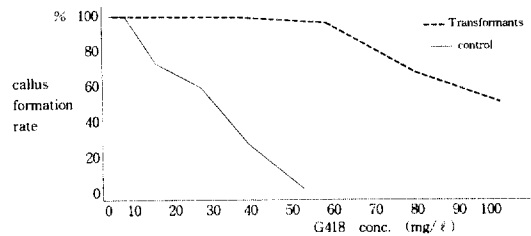


Fig. 3. Callus formation rate in various geneticine concentrations.

GUS와 유사한 활성이 약간 나타났는데 이것은 조직 내에 존재하는 여러 가지 색소들이 산화되면서 나타낸 형광이 fluorometer에 측정되었기 때문인 것으로 생각된다(Scott 등, 1988).

4. 抗生劑 배지에서의 再分化率

*Arabidopsis thaliana*를 대상으로 C-methylation inhibitor인 5-azacytidine과 azathymine을 selection 배지에 초기배양단계에서 전 처리한 결과 azathymine은 재분화율에 거의 영향을 주지 않음에 반해 5-azacytidine 처리는 항생제 처리후의 재분화율을 크게 증가시킨 것으로 보고된 바 있다(Mandal 등, 1995). 따라서 본 실험에서 methylation inhibitor인 5-azacytidine을 처리한 경우 대조구에 비해 항생제 처리후의 재분화율이 5배 정도 높아지는 것은 위의 내용과 일치한다(Table 6). 따라서 이러한 높은 재분화율은 5-azacytidine에 의한 transgene inactivation을 blocking함으로써 외부로부터 식물체내로 도입된 유전자의 정상적인 發現에 도움을 준다는 가설(Confalonieri 등, 1994)을 뒷받침하고 있다.

5. PCR방법에 의한 形質轉換 검정

PCR을 이용한 形質轉換體의 검정은 기존의 방사성 동위원소를 이용한 Southern blotting보

Table 6. Effects of 5-Azacytidine on leaf regeneration of *P. nigra* × *P. maximowiczii* transformed with *A. tumefaciens* LBA 4404/pBI121.

	5-Azacytidine*	Control
No. of leaf segments inoculated (A)	45	87
No. of leaf segments producing calli	18	21
No. of leaf segments producing shoots (B)	12	5
No. of regenerations under the selection medium (B/A %)	26.7	5.7

* After 1 week incubation on SIM3 medium, leaf segments were transferred onto fresh SIM3 medium supplemented with 3.0mg/L of 5-azacytidine. The leaf segments were incubated for 3 days on the SIM and then transferred back to the same medium for shoot regeneration

다는 손쉽게 DNA level에서의 검정이 가능한 이점이 있어 현재 널리 이용되고 있는 방법이다. PCR을 이용하여 검정한 결과, 形質轉換이 되지 않은 對照의 식물체와는 달리 形質轉換된 식물체의 경우는 약 1.2kb 크기의 GUS 유전자 fragment와 약 0.7kb 크기의 NPT II 유전자 fragment가 증폭되어 나타나고 있어 形質轉換 여부를 확인할 수 있었다.

6. pOST 2002를 이용한 양황철 形質轉換 및 GUS assay

양황철나무의 組織 및 器官特異的 (tissue- and organ-specific) promoter를 tagging하기 위한 전 단계 과정으로 유전자 fusion vector인 pOST2002를 이용하여 形質轉換을 시도하였다. 앞서 pBI121로 실시한 실험결과를 토대로 EHA101/pOST2002를 사용하여 5-azacytidine을 처리한 결과 cocultivation 6주후에 SIM 3 배지에서 재분화한 植物體 545개체를 얻었다. 이들에 대해 螢光分析을 실시한 결과, 3개체만이 對照에 비해 약 3배 이상의 높은 수치를 보였는데, 상당수의 나머지 개체들은 삼입된 외래유전자가 식물체의 발현기작을 받지 못하는 상태에 있다고 생각된다. 이 3개체를 대상으로 PCR방법으로 분석한 결과는 Fig. 4와 같으며, 組織化學的 分析을 실시하였는 바, 3개체 모두 靑色 反應을 보이는 조직을

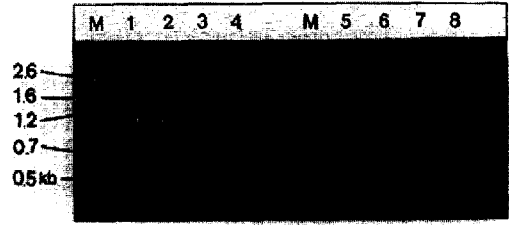


Fig. 4. PCR analysis for the GUS and NPT II gene from *Populus. nigra* × *P. maximowiczii* leaf segment cocultivated with EHA101/pOST2002.

M : pGEM DNA size marker

Lanes 1,2,5 and 6 : transformants

Lanes 3,4,7 and 8 : nontransformants

Lanes 1,2,3 and 4 : detection of GUS

gene (1.2 kb)

Lanes 5,6,7 and 8 : detection of NPT II

gene (0.7 kb)



Fig. 5. The photograph of histochemical assay of GUS gene expression in *Populus. nigra* × *P. maximowiczii* leaf transformed with pOST2002.

갖고 있었다(Fig. 5).

結 論

본 연구는 genome size가 작고, 조직배양 및 形質轉換이 용이하여 林木分子生物學 분야에서 model system으로 각광받고 있는 양황철을 대상으로 재분화를 유도하는 한편, promoter가 없는 외래유전자를 이용하여 形質轉換시키고자 할 때의 最適條件 및 효율적인 形質轉換體의 검정방법을 器內 形質轉換實驗을 통해 究明하고자 실시하였다.

1. 器內에서 양황철 재분화 유도에는 배지조성과

호르몬 농도의 조합이 가장 영향을 많이 끼치는 요인이었다. 여러 조합으로 葉組織(5×5mm leaf strip)을 시료로 하여 MS 기본배지에 0, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0mg/l NAA, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0mg/l BAP를 혼합 처리하여 배양한 결과, 0.1mg/l NAA, 0.5mg/l BAP를 첨가한 호르몬 조합에서 줄기 분화율 및 explant당 분화된 shoot수가 상대적인 비율 94%(11.4개)로서 가장 높았다. 따라서 形質轉換된 葉組織을 재분화 시킬 때 이 조건을 줄기분화유도 배지(SIM; shoot-inducing medium)로 사용하였다.

2. pBI121로 形質轉換 실험을 한 결과 cocultivation한 후 100mg/l Km 또는 60mg/l G418이 첨가된 SIM 3 배지에서 2주가 경과하면서 육안으로 形質轉換된 부정아를 관찰할 수 있었고, 이 부정아를 SIM 3 육진지 6주 후에는 0.5-1cm 크기의 부정줄기로 자랐다. 그러나 對照 葉組織은 부정아의 형성이 전혀되지 않아 promoter가 없는 GUS 및 NPT II 유전자의 形質轉換體의 選拔 條件에서는 이 조건이 최적임을 알 수 있었다. 또한 5-azacytidine을 처리한 결과, 항생제 선발배지하에서 재분화율을 5.7%에서 26.7%까지 높일 수 있었다.
3. 螢光分析法 및 組織化學的 방법으로 GUS 유전자의 活性을 분석한 결과 vector system간에 形質轉換率이 서로 다를 수 있음을 확인할 수 있었다. LBA4404/pBI121을 vector로 사용한 양황철 形質轉換 실험에서는 낮은 形質轉換率(5.7%)을 보였다. 그러나 보다 感染性이 높은 super virulence 유전자를 포함하는 pEHA101을 helper plasmid로 하여 실험한 결과 形質轉換率이 35.9%로 pAL4404보다 훨씬 효과적인 것으로 나타나, 양황철 promoter tagging을 위한 helper plasmid로는 pEHA101이 적합함이 판명되었다.

引用 文 獻

1. Ahuja, M.R. 1996. Transgenes and genetic instability. In: Micropropagation, Genetic Engineering and Molecular Biology of *Populus*. Klopfenstein, N. et al. USDA Publication, Washington(In Press).
2. Chun, Y.W., N.B. Klopfenstein, H.S. Mc-

- Nabb Jr., and R.B. Hall. 1988. Transformation of *Populus* species by an *Agrobacterium* binary vector system. J. Kor. For. Soc. 77 : 199-207.
3. Chun Y.W., and N.B. Klopfenstein. 1995. Organ specific expression of the nos-NPT II gene in transgenic hybrid Poplar. J. Kor. For. Soc. 84 : 77-86.
4. Chung, K.H., J.H. Kim and Y.W. Chun. 1994. Insertion and expression of GUS gene through *in vivo* transformation using adventitious bud regeneration technique of dormant scion in *Populus*. Kor. J. Breed. 26 : 120-128.
5. Confalonieri, M., A. Balestrazzi, and S. Bisoffi. 1994. Genetic transformation of *Populus nigra* by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 13 : 256-261.
6. De Block, M. 1990. Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. Plant Physiol. 93 : 1110-1116.
7. Echt, C. 1994. Report on the Second International Symposium on the Applications of Biotechnology to Tree Culture, Protection, and Utilization and the 1994 TAPPI R&D Biological Sciences Symposium. http://s27-w007.pswfs.gov/Newsletter/tree_biotech.94.html (Internet).
8. Edwards, K., C. Johnston and C. Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. NAR. 19 : 1349.
9. Ellis, D.D., J.A. Rintamaki-Strait, and B.H. McCown. 1994. Expression of introduced genes in trees: practical and environmental considerations. pp.139-146. In 1994 Biological Sciences Symposium, TAPPI Proceedings, TAPPI Press Atlanta, GA. U.S.A.
10. Fillatti, J.J., J. Sellmer, B. McCown, B. Haissig and L. Comai. 1987. *Agrobacterium* mediated gene transformation and regeneration of *Populus*. Mol. Gen. Genet. 206 : 192-199.
11. Glenn, T.H., B. Goldfarb, and S.H. Strauss. 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of hybrid poplar suspension cultures and

- regeneration of transformed plants. Plant Cell Tissue Organ Cul. 36 : 59-71.
12. Hood, E.E., B.S. Gelvin, L.S. Melchers, and A. Hoekema. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. Trans. Res. 2 : 208-218.
 13. Hood, E.E., T.F. Robert, and M.D. Chilton. 1987. Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* Strain A281 on Legumes. Plant Physiol. 83 : 529-534.
 14. Hood, E.E., Georgia L. Helmer, Robert T. Fraley and Mary-Dell Chilton. 1986. The Hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. J. Bacteriol. 168 : 1291-1301.
 15. Hood, E.E., W.S. Chilton, M. Chilton, and R.T. Fraley. 1986. T-DNA and Opine Synthetic Loci in Tumors Incited by *Agrobacterium tumefaciens* A281 on Soybean and Alfalfa Plants. J. Bacteriol. 168 : 1283-1290.
 16. Howe, G.T., B. Goldfarb, and S.H. Strauss. 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of hybrid poplar suspension cultures and regeneration of transformed plants. Plant Cell Tissue Organ Cul. 36 : 59-71.
 17. Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants : The GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5 : 387-405.
 18. Jefferson, R.A., S.M. Burgess, and D. Hirsh. 1986. β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83 : 8447-8451.
 19. Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh and M.W. Bevan. 1987. GUS fusions : β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants. EMBO J. 6 : 3901-3907.
 20. Mackay, J., A. Seguin, and M. Lalonde. 1988. Genetic transformation of a *in vitro* clones of *Alnus* and *Betula* by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell. Rep. 7 : 229-232.
 21. Mandal, A., M. Sandgren, K.O. Holmström, P. Gallois, and E.T. Palva. 1995. Identification of *Arabidopsis thaliana* sequences responsive to low temperature and abscisic acid by T-DNA tagging and *in vivo* gene fusion. Plant Mol. Biol. Rep. 13 : 243-254.
 22. Park, Y.S., J.M. Kwak, O.Y. Kwon, Y.S. Kim, D.S. Lee, M.J. Cho, H.H. Lee, and H.G. Nam. 1993. Generation of expressed sequence tags of random root cDNA clones of *Brassica napus* by single-run partial sequencing. Plant Physiol. 103 : 359-370.
 23. Parson, T.J., V.P. Sinkar, E.W. Nesetr, and M.P. Gordon. 1986. Transformation of poplars by *Agrobacterium tumefaciens*. Bio/Tech. 4 : 533-536.
 24. Pythoud, F., V.P. Sinkar, E.W. Nester, and M.P. Gordon. 1987. Increased Variance of *Agrobacterium rhizogenes* conferred by the *vir* region of pTiBo542 : application to genetic engineering of poplar. Bio/Tech. 5 : 1323-1327.
 25. Riemenschneider, D.E., 1990. Susceptibility of intra- and inter-specific hybrid poplars to *Agrobacterium tumefaciens* strain C58. Phytopathol. 80 : 1099-1102.
 26. Scott, R., J. Draper, R. Jefferson, G. Dury, and L. Jacob. 1988. Analysis of gene organization and expression in plants. In J. Draper, R. Scott, P. Armitage, and R. Walden eds. Plant Genetic Transformation and gene Expression. Blackwell, Sci. Pub.
 27. Walter, C., D.R. Smith, M.B. Connett, L. Grace, and D.W. White. 1994. A biolistic approach for the transfer and expression of a *gusA* reporter gene in embryogenic culture of *Pinus radiata*. Plant Cell Rep. 14 : 69-74.
 28. Williams, J.F. 1989. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. Biotech. 7 : 762-768.
 29. Yingchuan, T., L. Taiyuan, M. Keqiang, H. Yifan, L. Ling, W. Xuepin, L. Mengzhu, D. Lianyun, H. Yinong, Y. Jingjun, and D.W. Gabrel. 1993. Insect tolerance of transgenic *Populus nigra* plants transformed with *Bacillus thuringiensis* toxin gene. Chinese J. Biotech. 9 : 219-227.