

토마토의 형질전환 신초 유기

류수경¹, 박영두¹, 설일환², 최근원^{1*}

¹경희대학교 원예학과, ²경북대학교 농업과학기술연구소

Induction of Transgenic Shoots in Tomato

Ryu, Soo-Kyung¹, Park, Young-Doo¹, Sul, Ill-Whan², Choi, Geun-won^{1*}

¹Dept. of Horticulture, Kyunghee University, Suwon 449-701, Korea

²Institute of Agricultural Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

*corresponding author

ABSTRACT This study was conducted to provide useful information for improvement on the efficiency of transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The result from the sensitivity test of cotyledon explants of tomato to kanamycin suggested that 50mg/L could be a proper concentration for selection media. Two hundred mg/L of cefotaxime was selected as a proper concentration to remove *Agrobacteria* from media without any negative effect on explants. Both callus formation and shoot regeneration from cotyledon explants of tomato were significantly suppressed by the cocultivation with *Agrobacterium*. Three days of cocultivation was effective on callus formation and shoot regeneration in all of tomato cultivars tested. Confirmation of transformation for regenerated shoots was carried out by histochemical GUS assay and PCR analysis using NPTII primer, and transgenic shoots were obtained from all of 3 tomato cultivars tested.

Additional key words: antibiotic, PCR

서 언

최근에 개발된 유전공학기법들중 *Agrobacterium*를 이용한 형질전환 기법은 원하는 유전자를 직접 대상 식물체에 도입시킴으로서 교잡육종으로는 극복할 수 없었던 변이작성의 한계를 뛰어 넘을 수 있어 많은 육종가들이 이의 활용에 관하여 활발히 연구하고 있다. *Agrobacterium*를 이용한 형질전환은 *Agrobacterium*가 식물의 상처 부위를 통해서 자신의 DNA일부(T-DNA)를 기주식물의 핵내 DNA에 삽입함으로써 이루어지며 안정적 도입이 많이 이루어지는 것이 특징이다. 최근 들어서는 다양한 작물에 재조합 저항성 유전자(Choi 등, 1996), 내바이러스성 유전자(Abel 등, 1986; Harrison 등, 1987) 등의 유용유전자를 도입하여 신품종을 육성하려는 연구들이 활발히 시도되고 있으나 여전히 작물에 따른 효율적인 형질전환 체계의 확립 및 이의 실용화 연구를 필요로 하고 있는 실정이다.

본 실험은 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 효율적인 형질전환 체계를 확립하기 위한 기초작업으로 1) 토마토의 항생제에 대한 감응성을 검정하여 선발 배지에 사용되는 항생제의 적정 수준을 결정하고, 2) 적정 공동배양기간을 구명하며, 3) PCR을 이용한 효율적인 형질전환 검정방법을 제시하고자 수행되었다.

재료 및 방법

공시된 토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill.)는 홍농종묘의 '서광'과 '영광', 중앙종묘의 '광수' 3품종으로서 종자를 70% ethanol에 5분간 담근 후 다시 2% sodium hypochloride로 15분간 소독후 8.0g/L agar를 첨가한 MS배지(pH

5.7)에 파종하여 배양실에서 12일간 키운 후 그 자엽을 실험 재료로 사용하였다.

Agrobacterium tumefaciens line은 LBA4404였고 binary vector로는 selection marker로 kanamycin 저항성 유전자인 neomycin phosphotransferase II(NPTII)와 reporter gene으로 β -glucuronidase(GUS)유전자를 지닌 pBI121을 사용하였다. Kanamycin이 함유된 고체 LB 배지에서 배양, 증식된 colony는 액체배지로 옮겨 배양되었다. 배양후 원심분리된 균은 액체 LB 배지로 세척한 후 접종에 사용하였다.

토마토 자엽절편체의 항생제 감응성 검정실험은 무균 배양된 '서광'의 자엽을 kanamycin과 cefotaxime이 각각 0, 10, 25, 50, 100mg/L와 0, 100, 200, 400mg/L의 농도로 첨가된 MS 배지에 치상한 후 매주 절편체의 상태를 관찰하면서 생존 개체수와 발근 개체수를 조사하였다. 그리고 cefotaxime의 *Agrobacterium*에 대한 유효 살균 농도를 결정하기 위한

예비실험으로 토마토 절편체를 준비된 *Agrobacterium tumefaciens* 용액에 접종시킨 후 cefotaxime이 0, 100, 200, 400mg/L로 처리된 MS 배지에 치상하여 *Agrobacterium*의 번식유무를 조사하였다.

공동배양 기간이 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 공시된 '서광', '영광', '광수' 토마토 자엽절편체를 *Agrobacterium tumefaciens* 용액에 10여초 침지후 건조시킨 다음 zeatin 3.0mg/L와 IAA 0.02mg/L가 첨가된 MS 배지에 치상하여 암상태의 배양실에서 1, 3, 5일간 공동배양하였다. 공동배양한 절편체들은 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 MS 액체배지로 세척한 후 건조하여, cefotaxime 200 mg/L와 kanamycin 50mg/L가 함유된 MS 배지에서 배양하였다. 배양 3주 후 2차 선발 배지로 옮겨 주면서, callus 형성 절편체수와 신초 재분화 절편체수를 조사하였다.

형질전환 여부검정은 공동배양후 재분화된 신초를 0.1M NaH₂PO₄ (pH 7.0), 10mM EDTA(pH 7.0), 0.5mM K Ferricyanide(pH 7.0), 0.5mM K Ferrocyanide(pH 7.0), 0.1% Triton X-100, 1.0mM X-glucuronic acid로 조성된 GUS분석용액에 침지하여 37°C에서 하룻동안 반응시킨 후 절이된 GUS유전자의 발현여부를 판단하였다. 또한 재분화신초의 DNA를 CTAB법에 따라 추출하여 공동배양하지 않은 대조군 신초 및 pBI121 plasmid의 DNA와 함께 NPTII primer를 사용하여 PCR 반응을 실시함으로써 NPTII 유전자의 전이 여부를 검정하였다. PCR 반응조건은 주형 DNA 25ng, NPT II primer 25pmole, Taq DNA polymerase 0.25unit, dNTP 0.05mM, MgCl₂ 1.5mM 그리고 멸균수를 첨가하여 최종 반응용액이 50 μ l가 되게 하였다. PCR cycle은 95°C에서 5분간 denature시킨 후, 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분으로 40 cycle을 실시하였으며, 마지막으로 72°C에서 10분간 extension 하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.4% agarose gel 상에서 100V로 3시간 동안 전개시켜 분석하였다.

결과 및 고찰

파종후 2주된 '서광' 토마토의 자엽 절

Table 1. Effects of kanamycin and cefotaxime on survival and root regeneration ratio of cotyledon explants of 'Suekwang' tomato

Antibiotic	Antibiotic concentration (mg/L)	Survival ratio (%) (survival explants /total explants ² × 100)	Root regeneration ratio (%) (rooted explants /total explants ² × 100)
Kanamycin	0	100	100
	10	90	50
	25	70	0
	50	0	0
	100	0	0
Cefotaxime	0	100	30
	100	100	100
	200	100	100
	400	0	0

²Total explants were 30 per each treatment.

Table 2. Effects of co-cultivation duration with *Agrobacterium* on induction of callus and subsequent regeneration of adventitious shoots from cotyledon explants of 'Suekwang', 'Kwangsoo' and 'Yungkwang' tomato

Cultivar	Co-cultivation duration (days)	Callus formation ratio ^y (%)	Shoot formation ratio ^y (%)		
			Regenerated shoot failed to grow	Regenerated shoot with leaf	Total shoot regenerated
Suekwang	control ^z	93	0	63	63
	1	15	7	0	7
	3	24	7	10	17
	5	11	6	7	13
Kwangsoo	control	100	0	57	57
	1	0	7	0	7
	3	20	3	14	17
	5	17	0	7	7
Yungkwang	control	93	0	47	47
	1	10	0	0	0
	3	10	3	7	10
	5	22	7	3	10

^zNon-inoculated explants with *Agrobacterium*.

^yTotal explants were 30 per each treatment.

편체를 이용한 kanamycin과 cefotaxime에 대한 감응성 검정 결과는 Table 1과 같다. Kanamycin의 농도가 50mg/L 이상인 처리구에서는 토마토 절편체가 생존할 수 없었다. Kanamycin은 식물체의 재분화를 억제하며, 처리농도가 높을 경우 식물체가 민감하게 반응하여 고사하는 것으로 알려져 있는데 본 실험의 결과로 토마토의 형질전환체 선발을 위한 배지내의 kanamycin농도는 50mg/L가 적정한 것으로 판단되었다. Cefotaxime에 대한 토마토 자엽 절편체의 성장 및 재분화 반응은 200mg/L의 농도까지는 촉진적인 영향을 주었으나 400mg/L에서는 절편체가 모두 말라 죽는 결과를 보였다(Table 1). 배양 4주 후의 뿌리 재분화 정도는 대조구보다 오히려 cefotaxime 처리구에서 월등한 것이 관찰되었다. 한편 *Agrobacterium*의 제거에 필요한 cefotaxime의 유효 살균 농도 결정을 위한 예비실험에서 200mg/L 처리로 *Agrobacterium*의 뚜렷한 번식 억제 효과가 관측되어 200mg/L의 농도가 토마토 형질전환체 적합할 것으로 판단되었다. 본 선정 농도는 Pechan (1989)이 제시한 cefotaxime 농도와는 차이가 있어 작물 및 *Agrobacterium*계통에 따라 적정농도의 선정은 달라질 수 있을 것으로 사료된다.

토마토 품종에 관계없이 *Agrobacterium*과 공동배양을 하지 않은 무처리구가 공동배양을 한 경우보다 callus 형성, 신초형성을 및 생존율이 월등히 높았으며 1, 3, 5일의 각 공동배양기간에 따른 차이는 현저하지 않았으나 공동배양 3일 처리구에서 신초형성이 가장 많았다(Table 2). 공동배양 기간에 따른 callus 형성율은 '서광'과 '광수'의 경우는 공동배양 3일 처리구가 가장 높았으나 '영광'의 경우는 5일간의 공동배양에서 가장 높았다. 그러나 재분화 신초수 및 생장에 있어선 공시된 3품종 모두 3일간의 공동배양 기간이 가장 좋은 결과를 보였다. 공동배양 3일과 5일 처리구 간에는 생존 재분화 신초수에 있어 커다란 차이가 나타나지는 않았지만 공시된 토마토 세 품종 모두 접종 후 3일 정도 공동배

양하는 것이 적합하다고 판단되는데 이런 결과는 Johanna 등(1989)의 완두 형질전환 실험에서와 일치하는 바이며 Thomzik 과 Hain(1990)도 형질전환체의 재분화 효율이 향상되기 위해 필요한 공동배양 기간은 3일 이하로 본 실험과 일치되는 결과를 나타내었다.

Kanamycin 첨가배지에서 재분화된 신초들 중 X-glucuronic acid와 반응후 푸른 발색을 보여 GUS의 양성 반응을 나타낸 재분화 신초들을 선발하였다. 이들을 대상으로 NPTII primer를 이용한 PCR을 수행한 결과 *Agrobacterium*을 접종하지 않은 대조구 1, 2, 3에서는 DNA band가 생성되지 않은 반면에 GUS 분석을 통해 형질전환체로 여겨졌던 4, 5, 6에서는 NPTII를 갖는 plasmid 대조구와 같이 0.7kb의 NPTII DNA band가 관측되어 공시된 토마토 3품종에서 모두 형질전환 신초의 획득을 확인하였다(Fig. 1). PCR을 이용한 형질전환 검정은 그 간편성으로 인해 많은 연구자들로부터 주목을 받고 있는데 Choi와 Kim(1996)은 저항성 callus의 형질전환을 확인하고자 PCR을 수행하여 GUS primer에 의해 증폭된 1.2Kb의 GUS 유전자 band를 확인한 바 있다.

초 록

본 연구는 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 형질전환의 효율성을 높이기 위한 기초자료를 제공하고자 실시되었다. 선발배지에 사용되는 kanamycin에 대한 토마토 자엽절편체의 감응성 검정결과 50mg/L가 적합한 것으로 제시되었다. 토마토 절편체에는 부정적인 영향을 주지 않고 배지내 *Agrobacterium*의 제거에 적합한 cefotaxime의 농도로는 200mg/L가 선정되었다. *Agrobacterium*과의 공동배양에 의해 자엽절편체로부터의 callus형성과 신초 재분화가 현저히 억제되었으며 공시된 3품종의 토마토의 경우에는 3일간의 공동배양기간이 callus형성과 신초 재분화에 적합한 것으로 판단되었다. 재분화 신초에

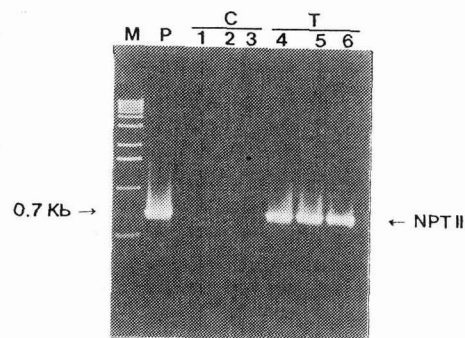


Fig 1. PCR amplification with NPTII primers using non-transformed and transformed tomato explants.

M: 1kb ladder, P: pBI121 plasmid, C: control, T: putative transgenic plants, lanes 1 and 4: cultivar 'Suekwang', lanes 2 and 5: cultivar 'Kwangsoo', lanes 3 and 6: cultivar 'Yungkwang'.

대한 형질전환여부검정은 GUS염색법과 NPTII primer를 이용한 PCR검정을 실시하였으며 공시된 3품종에서 모두 형질전환 신초를 획득하였다.

추가주요어 : 항생제, PCR

인용문헌

- Abel, P. P., R. S. Nelson, D. B. N. Hoffman, S. G. Roger, R. T. Fraley, and R. N. Beachy. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 738- 743.
- Choi, K. H., J. H. Jeon, H. S. Kim., Y. H. Joung, S. J. Cho, Y. P. Lim, and H. Joung. 1996. Development of herbicide resistant transgenic potato. *Korean J. Plant Tiss. Cult.* 23(3):161- 165.
- Choi, S. J. and J. C. Kim. 1996. Transformation of rice suspension-cultures by electroporation. *Korean J. Plant Tiss. Cult.* 23(2): 67-72.
- Harrison, B. D., M. A. Mayo, and D. C. Baulcombe. 1987. Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature* 328: 799-802.
- Johanna, P. K., P. Stabel, and T. Eriksson. 1989. Transformation of pea (*Pisum sativum* L) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 8: 321-324
- Pechan, P. M. 1989. Successful cocultivation of *Brassica napus* microspores and proembryos with *Agrobacterium*. *Plant Cell Reports* 8: 387-390.
- Thomzik, J. E. and R. Hain. 1990. Transgenic *Brassica napus* plants obtained by cocultivation of protoplasts with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 13:145-148.