

Bialaphos 저항성 유전자 *bar*를 이용한 형질전환 더덕개발

조광수 · 장정은¹ · 류종석² · 권무식*

성균관대학교 생명자원과학대학 유전공학과, 농촌진흥청 고령지농업시험장

Development of Transgenic Plant (*Codonopsis lanceolata* Trautv.) Harboring a Bialaphos Resistance Gene, *bar*

CHO, Kwang Soo · JANG, Jeung Eun¹ · RYOU, Chongsuk² · KWON, Moosik*

Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon, 440-746, Korea; and

¹National Alpine Agricultural Experiment Station, RDA, Pyeongchang, 232-950, Korea,

²Department of Genetics & Molecular Biology, Wayne State University, Detroit, MI 48201, U.S.A.

ABSTRACT *Codonopsis lanceolata* ("Deoduck" in Korea) is a perennial herb, and belongs to family, Campanulaceae. Its taproot is used a good source of a wild vegetable as well as an herbaceous medicine. In this study, to develop a bialaphos-resistant transgenic *Codonopsis*, seed germination mechanism and somatic embryogenesis of the plant were investigated, and *Agrobacterium*-mediated transformation with *bar* gene encoding phosphinothricin acetyltransferase (PAT) was performed. Attempt were made to regenerate plant from cells via somatic embryogenesis. When the cotyledons, nodes and leaf disks were cultured on MS medium containing 2,4-D and zeatin, embryogenic calli were induced. Upon transferring the somatic embryos to N6 solid medium without plant growth regulators, they developed into plantlets under continuous illumination. All plants were dead on MS basal medium containing 10 mg/L phosphinothricin (PPT) and Basta, respectively. The explants did not produce calli in the medium containing 200 mg/L kanamycin. The explants were cocultured with *Agrobacterium tumefaciens* for 2 days, and transformants were selected in MS basal medium containing 1.0 mg/L 2,4-D, 100 mg/L kanamycin and 500 mg/L carbenicillin. After the selection, embryogenic calli were induced and then somatic embryos were produced by subsequent subculturing. The somatic embryos were germinated on N6 basal medium containing 200 mg/L kanamycin and 500 mg/L carbenicillin. PCR analysis showed that *npIII* and *bar* genes were introduced in the Deoduck transformants. After the confirmation of *bar* gene expression in RNA and protein level, the transgenic Deoduck will be used to study the genetics of filial generation with the herbicide control gene, *bar*.

Key words: *Bar* gene, herbicide resistant plant, transgenic *Codonopsis*,

서 론

더덕 (*Codonopsis lanceolata* Trautv.)은 초롱꽃과 (Campanulaceae)에 속하는 다년생 초본식물로 원산지는 아

시아 중동부이며 한국, 중국, 일본 등에 약 35종이 자생하는 것으로 알려져 있다. 우리 나라에는 전국의 산지, 특히 강원, 경북지방에 많이 분포하고 있으며 일명 사삼(沙蔘)이라고 불리기도 한다. 뿌리에는 saponine과 riboflavin이 다른 채소 보다 많은 양이 함유되어 있어 강장, 해열, 거담 등 한약재로 널리 이용되고 있다. 더덕은 파종 후 수확까지 2~3년의 재배 기간이 필요하며 제초에 많은 노동력이 소요되어 경종 방법에 의한 잡초방제 기술 연구가 수행되고 있으며, 최근에는 동

*Corresponding author. Tel 0331-290-7871, 7877
E-mail mskwon@yurim.skku.ac.kr

식물에 무해한 환경친화성 제초제 개발에 중점을 두어 생물학적 방제, 제초제 내성 작물의 개발 등이 이루어지고 있다.

농업 유전공학을 통한 제초제 저항성 작물개발은 제초제에 대한 표적효소의 감도나 양을 변화시키거나 제초제를 불활성화 시키는 방법 등의 방향으로 연구되어 왔다. 첫번째의 경우는 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthetase (EPSPS) 효소를 과잉생산하는 방법이고, 두 번째의 방법은 비선택성 제초제인 Basta의 주성분인 bialaphos의 phosphinothricin (PPT)을 불활성화시키는 방법이다.

이러한 PPT에 대한 내성을 나타내는 *bar* 유전자는 *Streptomyces hygroscopicus* SF1293에서 분리되었는데 *bar* 유전자는 phosphinothricin acetyltransferase (PAT)를 암호화하고 있으며 PPT를 아세틸화하여 불활성화 시킴으로서 제초제 저항성을 나타내게 된다 (Takeshi et al. 1986; Thompson et al. 1987; White et al. 1990). *Bar* 유전자를 식물에 형질전환한 제초제 저항성 형질전환 식물체는 지금까지 감자 (Eliseu et al. 1994; Choi et al. 1996), 밀 (Nehra et al. 1994; Vasil et al. 1992), 담배 (Viegas et al. 1993), 보리 (Spencer et al. 1990; Zhao et al. 1993), 쌀 (Keertis et al. 1993; Toki et al. 1992), 페추니아 (Aeom, et al. 1996), 유채 (Block et al. 1989) 등에서 많은 연구성과를 나타내고 있다.

더덕의 종자발아에 관한 연구로는 GA₃ 100 ppm 침지처리하여, 15~20°C의 암조건에 치상하였을 때 종자 발아율을 향상시킬 수 있었던 것으로 보고하였다 (Chang, 1988). 또한 *Gentiana triflorad* 와 *Gentiana axillariflora* 작물의 종자발아 촉진방법으로는 GA₃ 30~100ppm에서 발아율이 증가되었고 5°C에 4주간 저온처리 후 GA₃의 처리가 더욱 효과적이라고 보고되었다 (Kim et al. 1988). 더덕의 조직배양기술로는 엽육절편을 2,4-D 1 mg/L와 BA 1mg/L를 첨가한 Murashige & Skoog (MS) 배지에서 많았으나 원형질체 나출(裸出)은 Naphthyloxyacetic acid (NAA) 1 mg/L와 Benzylaminopurine (BA) 1 mg/L를 첨가한 배지가 효율적이다 (Ahn et al. 1986). 또한 자엽을 2,4-D 1.0 mg/L, 6% sucrose를 첨가한 MS배지에 치상하였을 때 체세포배 발생을 유도할 수 있었고 이렇게 유기된 체세포배를 MS기본배지에 치상하여 정상 식물체로 재분화시킬 수 있었다 (Min et al. 1992).

더덕의 형질전환 연구로는 reporter gene인 β -glucuronidase (GUS) 유전자의 형질전환이 연구되었는데, 이 유전자를 포함하고 있는 pBI121 binary vector를 도입한 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404와 자엽절편을 1 mg/L BA가 첨가된 MS배지에서 48시간 동안 공존배양 후 절단면 부근으로부터 부정아를 획득하여 재분화시킬 수 있었으며, Southern 및 GUS 조직화학 반응을 통하여 형질전환된 개체를 확인하였다 (Choi et al. 1994). 이후 체세포배의 자엽을 *Agrobacterium tumefaciens*와 공존배양한 후 이차체세포배를 얻는 방법으로 형질전환이 이루어졌다 (Choi et al. 1996).

본 연구는 제초제 저항성 더덕을 개발하고자 하여, 더덕의

기내 발아 촉진 방법과 식물체 재분화에 관한 기술 연구를 수행하였고, *Agrobacterium*을 매개로 한 형질전환을 수행하여 bialaphos에 저항성을 가진 더덕을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

시료

본 연구에 사용된 더덕 (*Codonopsis lanceolata* Trautv.)은 고령지농업시험장 전신포에서 생육중인 더덕으로부터 종자를 수확하여 4°C에서 30일간 저온처리 후 기내에서 무균배양하여 사용하였다. 제초제 저항성을 나타내는 *bar* 유전자는 식물 발현 벡터인 pGA vector series에 삽입되어 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 도입된 균주를 사용하였으며 pGA-*Bar*의 모식도는 figure 1과 같다.

종자발아, 캘러스 형성

더덕 종자를 4°C에서 30일간 저온처리한 후 70% EtOH에 1분간 침지 후, 멸균수로 3번 수세하여 MS배지에 파종하였다. 이때 Gibberellic acid (GA₃)의 농도는 각각 1, 2, 3, 4, 5 mg/L로 하였으며 6-Benzylaminopurine (BA)농도는 1, 2, 3, 4, 5 mg/L를 GA₃ 5 mg/L와 단독 또는 혼합처리하였다. 발아 온도는 15±2°C와 25±2°C로 하였으며 광의 유무에 따라 발아율을 조사하였다.

배발생 캘러스에 미치는 식물 성장조절제의 영향을 조사하기 위하여 자엽, 줄기, 뿌리, 잎 등을 2,4-D 1, 2 mg/L, zeatin 1, 2 mg/L, GA₃ 1 mg/L을 단독 또는 혼합 처리하여 캘러스 형성을, 배발생 캘러스 형성을, 그리고 생체중 등을 조사하였다. 배지는 MS salt에 vitamin mixture와 sucrose (30 g/L)를 첨가한 배지 (pH 5.8)를 사용하였다.

형질전환체 선발시 선발마커의 농도를 결정하기 위해 PPT와 Basta의 농도에 따른 생존율을 조사하였다. PPT는 1, 5, 10 mg/L을, Basta는 1, 2, 5, 10, 20, 40 mg/L을 MS배지에 첨가한 후, 무균발아한 식물을 페트리디쉬 당 10개체씩 2반복으로 치상하여 25±2°C에서 30일간 광배양후 생존율을 조사하였

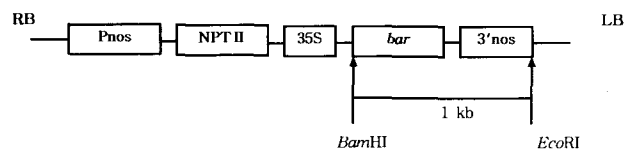


Figure 1. A Schematic diagram of the plant expression vector, pGA-*Bar*, for the transformation of *Codonopsis*. RB : right border, LB : left border, 35S : 35S cauliflower mosaic virus promoter, Pnos and 3'nos : the promoter and the terminator of nopaline synthase (NOS) gene.

다. 또한 자엽, 잎, 줄기, 뿌리를 약 1 cm² 정도로 절단하여 kanamycin 10, 20, 50, 100, 200, 400 mg/L과 2,4-D 1 mg/L이 포함된 MS배지에 치상하여 25°C에서 30일 동안 암 배양 후 캘러스 형성을 조사하였다.

제초제 저항성 유전자의 형질전환

형질전환은 자엽, 잎, 줄기, 뿌리를 약 1 cm²로 절단한 후 leaf disk transformation을 수행하였다. pGA-*Bar*를 가지는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 10 ml의 YEP 배지에 접종하여 28°C에서 24시간 배양한 후 다시 새로운 10 ml의 YEP 배지에 접종하여 최적의 생장을 유도하도록 28°C에서 48시간 동안 현탁배양하였다. 한편, 기내에서 30일간 성숙시킨 자엽, 뿌리, 줄기, 잎 등을 1 cm² 정도의 크기로 절단하고, 이들을 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 배양액에 1분간 배양하여 감염시킨 후 filter paper에 5분간 두어 건조하였다. 그리고 2,4-D와 zeatin 1, 2 mg/L이 조합처리된 MS배지에 치상하여 25°C에서 2일간 암배양을 통해 *Agrobacterium*이 감염할 수 있도록 하였다. 이후 kanamycin 100 mg/L과 carbenicillin 500 mg/L이 포함된 선발배지에서 형질전환체를 선발하였다 (An et al. 1988).

형질전환체의 검정

선발배지를 통하여 얻어진 잠정적 형질전환체 내에 kanamycin 유전자 및 *bar* 유전자가 존재하는지 여부를 확인하기 위하여 polymerase chain reaction (PCR)를 수행하였다. 형질전환 식물체의 genomic DNA는 배지에서 선발된 배발생 캘러스 100~200 mg을 시료로 하여 Theresa 등의 방법을 이용하여 분리하였고 (Theresa et al. 1995), mRNA는 Dynabeads mRNA DIRECT kit (DYNAL, USA)를 사용하여 분리하였다. PCR은 *Taq* DNA polymerase reaction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.6, 40 mM KCl, 0.01% BSA)에 Mg²⁺을 1.5 mM, primers를 각각 200 nM, 각 200 μM의 dNTPs, 주형 DNA를 5 ng 그리고 *Taq* polymerase 2 units을 혼합한 후 mineral oil을 첨가하여 수행하였다. NPT-II 유전자의 증폭을 위하여 5'-CTGAATGAAGTGCAGGACGAGG-3' (NPT II-F)와 5'-GCCAACGCTATGTCCTGATAGC-3' (NPT II-R)를, 제초제 저항성 유전자인 *bar* 유전자를 증폭하기 위하여 5'-GGATCCATGAGCCCAGAA-3' (*Bar*-F, 18mer)와 5'-TCAGATCTCGGTGACGGCA-3' (*Bar*-R, 20mer)를 primer로 사용하였다. PCR 조건은 NPT II의 경우 97°C에서 7분간 변성 후 denaturation 온도를 94°C에서 30초, annealing 온도를 53°C에서 45초, extension 온도를 72°C에서 30초로 하여 30회 수행하고 마지막 충분한 PCR 산물을 얻기 위해 72°C에서 7분간 extension을 수행하였다. *Bar* 유전자 증폭을 위한 PCR의 경우에는 denaturation

온도를 94°C에서 60초, annealing 온도를 55°C에서 120초, extension 온도를 72°C에서 120초로 하여 30회 수행하였다. PCR 수행 후 산물을 absolute ethanol로 침전시킨 후 10 mM TE buffer (pH 8.0)에 녹인 후 0.8% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

결과 및 고찰

배발생 캘러스 형성 및 재분화

배발생 캘러스를 유도하기 위하여 더덕의 자엽, 줄기, 잎과 뿌리를 2,4-D, GA₃, zeatin을 단독 또는 혼합처리한 결과는 figure 2와 같다. 체세포 배발생 캘러스는 흰색의 부드러운 형태를 이루고 있고 비배발생 캘러스는 어두운 갈색의 캘러스 형태를 나타내어 연속적인 계대배양시 갈변하여 고사하게 되므로 구별이 가능하였다. 각 explant들은 치상 후 2주부터 절단면 부위에 캘러스 형성이 시작되었고 배발생과 비배발생 캘러스를 구분하여 조사하였다. 체세포배는 식물조직배양의 과정중 배와 유사한 구조체가 형성되어 실제 배발생 경로와 같은 경로를 거쳐 식물체로 분화할 수 있다. 더덕의 경우는 자엽으로부터 체세포배 발생을 유도하고 이를 MS배지에 치상하여 완전한 식물체로 재분화 시켰는데 (Min et al. 1992) 주로 자엽 절편이 이용되었다. 당근의 경우 체세포배의 유도는 2,4-D가 포함된 배지에서 배양하여 유도하였으며, 또한 BA나 Kinetin과 같은 cytokinin을 이용하면 촉진 효과가 나타나지 않지만 10⁻⁷M의 zeatin을 이용하면 뚜렷한 촉진 효과를 나타내었다 (Fujimura et al. 1975). 본 실험에서도 자엽의 경우는 거의 모든 처리에서 90%이상의 높은 캘러스 형성을 나타내었으며, 자엽, 줄기 잎 등에서 2,4-D와 zeatin을 혼

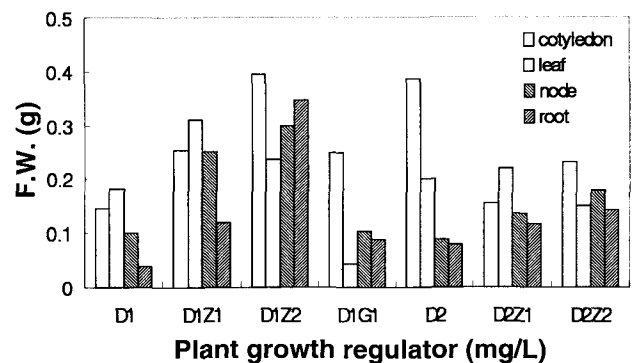


Figure 2. Effects of plant growth regulators on fresh weight of callus from different explants of *Codonopsis lanceolata*. D1 : MS0^f + 1.0 mg/L 2,4-D, D1Z1 : MS0 + 1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L Zeatin, D1Z2 : MS0 + 1.0 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L Zeatin, D1G1 : MS0 + 1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L GA₃, D2 : MS0 + 2.0 mg/L 2,4-D, D2Z1 : MS0 + 2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L Zeatin, D2Z2 : MS0 + 2.0 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L Zeatin. MS0 : MS basal medium, F.W. : Fresh weight.

용처리 하였을 때 약 50%의 체세포배 발생 캘러스를 형성하였다. 또한 계속적인 계대배양시 체세포배를 유기할 수 있었고 체세포배의 발아시 많은 수의 자엽이 나타났다. 이는 0.5~2%의 Sucrose농도에서 2개의 자엽배가 형성되지만 3% 이상의 농도에서는 다자엽배의 형성율이 높아진다는 보고 (Soh, 1993)와 일치하였다. 또한 자엽뿐만 아니라 줄기와 잎에서도 체세포배를 유기하여 식물체를 재분화 시킬 수 있었으나 뿌리는 배발생 캘러스를 형성하지 못하였다. 이렇게 치상 부위별, 캘러스 유기율과 배발생 캘러스 형성율이 다르게 나타났다. 이것은 잎의 부위별 특성에 기인한다는 보고 (Pedroso and Pais, 1993)와 동일하여 캘러스 발생은 explants의 생리적 요인으로 판단된다. 유기된 배발생 캘러스를 1주 간격으로 계대배양하였을 때 배발생 캘러스 표면에 체세포배가 발생하였으며 (Figure 3A) 심장형, 구형 등 다양한 형태의 체세포배가 유기되었다. 이들 체세포배를 호르몬이 첨가되지 않은 N6 배지에 치상하여 연속광에서 발아시켜 (Figure 3B) 완전한 식물체로 재분화시킬 수 있었다 (Figure 3C).

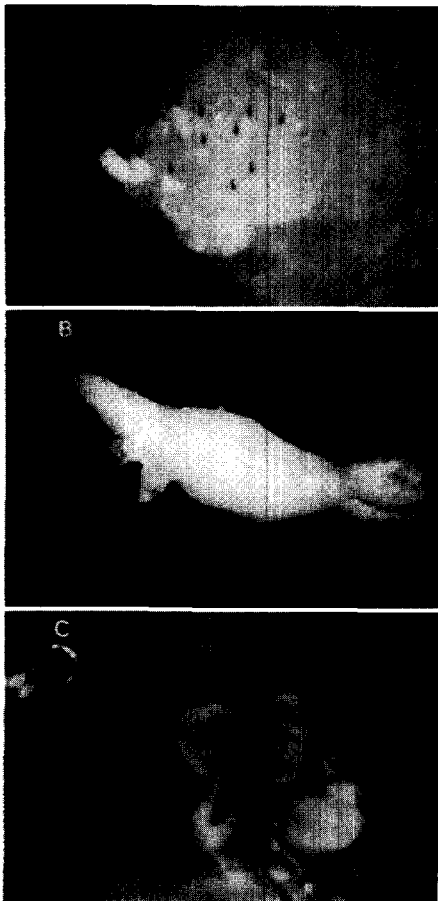


Figure 3. Somatic embryogenesis of *Codonopsis lanceolata*.; (A) Somatic embryo formation on surface of embryogenic callus after 5 weeks in culture (arrows indicate somatic embryos). (B) Germination of somatic embryo on N6 medium. (C) Somatic embryo-derived plantlets on N6 medium under continuous illumination.

Kanamycin, phosphinothricin 및 Basta의 농도에 따른 캘러스 형성 및 생육

형질전환체의 선발 표지로 이용될 수 있는 PPT, Basta와 kanamycine의 농도를 결정하기 위해 농도별 식물체의 생존율과 캘러스 형성율을 조사하였다. PPT는 식물체내의 glutamine synthetase의 inhibitor로 작용하여 식물체를 고사시키는 물질로서 더덕의 경우 1 mg/L을 첨가하였을 때 40%, 5 mg/L을 첨가하였을 때 7%의 생존율을 나타내었고 10 mg/L 이상의 농도에서는 모두 갈변고사 하였다 (Figure 4A). Basta는 실제 포장에서 살포하는 농약으로 주성분인 PPT와 계면활성제 등이 포함되어 있다. Basta를 1, 2 mg/L 첨가한 MS배지에서는 100%의 생존율을 나타내었고, 5 mg/L에서는 33.3%의 생존율을 나타내었고, 10 mg/L 이상의 농도에서는 모두 갈변하여 고사하였다 (Figure 4B). 한편 NPT- II 유전자는 kanamycin, 또는 gentamycin (G418)과 같은 aminoglycoside 항생제를 특이적으로 인산화하는 효소로 항생제에 내

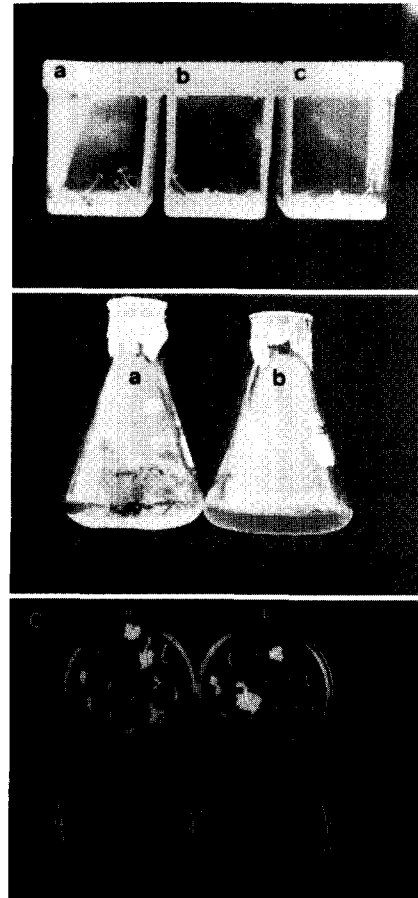


Figure 4. Effects of PPT and Basta concentration on growth of *Codonopsis lanceolata* (A, B) and callus formation of node according to kanamycin (Km) concentrations (C). (A) a : 1.0 mg/L PPT, b : 5.0 mg/L PPT, c : 10 mg/L PPT in MS basal medium; (B) a : MS basal medium, b : 40 mg/L Basta; (C) a : 20 mg/L Km, b : 50 mg/L Km, c : 100 mg/L Km, d : 200 mg/L Km in MS basal medium containing 1.0 mg/L 2,4-D.

성을 부여하게 된다. 일반적으로 형질전환에 사용되는 식물체, 부위 및 발달시기에 따라 kanamycin에 내성을 가지게 되는데 감자의 경우 50 mg/L의 농도에서 약간의 캘러스를 형성한다 (Choi et al. 1996). 더덕의 경우에도 식물체의 배양부위에 따라 다르게 나타났는데 잎, 줄기, 뿌리는 100 mg/L에서 모두 캘러스를 형성하지 않았지만 자엽은 10%의 캘러스 형성을 나타내어 200 mg/L 이상의 kanamycin 농도를 사용하여 형질전환체를 선발하여야 할 것으로 생각된다 (Figure 4C). 제조제 살포로 형질전환체를 선발하는 과정은 다른 선발표지보다 용이하여 새로운 선발표지로 이용되고 있다 (Dennehey et al. 1994). 본 연구에서도 1차 선발을 kanamycin으로 하고 이후 N6배지에서 체세포배를 발아시킨 후 Basta 또는 PPT가 포함된 배지에서 다시 선발함으로써 효과적으로 형질전환체를 선발할 수 있었다.

형질전환 식물체의 검정

형질전환은 공존배양 방법으로 수행하였다 (Figure 5A). 그 후 2,4-D와 zeatin이 혼합처리된 선발배지에서 배발생 캘러스를 유도하고, 이들을 1주 간격으로 계대배양하여 체세포배를 얻은 후 체세포배를 kanamycin 100 mg/L와 carbenicillin 500 mg/L가 포함된 N6배지에서 재분화시켰다 (Figure 5B). 재분화가 진행중인 배발생 캘러스로부터 DNA를 분리하여 *bar* 유전자 삽입여부를 확인하였다. 선발된 배발생 캘러스 12개 lines으로부터 DNA를 분리하여 NPT-II와 *bar* primers를 이용하여 PCR을 수행하였다 (Figure 6). Figure 6A에서와 같이 non-transformant (lane 1)에서는 DNA band가 나타나지 않았고, lane 2의 positive control과 12개의 잠정적인 형질전환체에서 약 500 bp의 DNA 절편이 증폭되어 NPT-II 유전자가 식물체에 삽입되었음을 간접적으로 확인할 수 있었다. *Bar* 유전자는 제조제 Basta에 내성을 나타내는 유전자로 최근에는 kanamycin 저항성 유전자보다 실험적인 면에서 편리하여

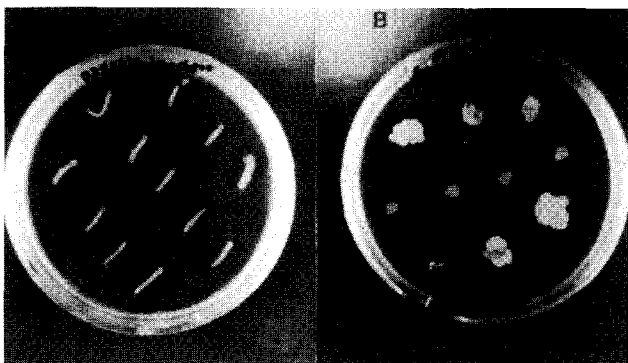


Figure 5. Transformation of *Codonopsis lanceolata*. (A) Co-cultivation for 2 days with *Agrobacterium tumefaciens*; harboring *bar* gene; (B) Callus induction on MS basal medium containing 1.0 mg/L 2,4-D, 100 mg/L kanamycin and 500 mg/L carbenicillin after 3 week cultivation.

새로운 선발표지로 이용되기도 하고 있다. 본 실험에서 사용한 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과, Figure 6B에서와 같이 12개의 잠정적인 형질전환체에서 약 700 bp가 증폭되어 식물체에 *bar* 유전자가 삽입되었음을 간접적으로 확인할 수 있었다. 식물체 내에 도입된 유전자의 copy 수 등을 확인하기 위해서는 Southern blot 등의 과정이 필요하며, 식물체에 도입된 *bar* 유전자가 안정적으로 발현되는지 여부를 확인하기 위한 작업으로서 RNA 수준에서의 발현여부 확인을 위한 Northern blot 및 *bar* 유전자의 산물인 PAT 효소의 활성여부를 확인하기 위한 TLC를 이용한 phosphinothricin acetyltransferase activity 측정 과정이 필요하다고 사료된다. 그리고 도입한 유전자 및 형질이 후대에 안정적으로 유전되는지 여부를 확인하는 작업이 진행되어야 할 것이다.

식물체 내에 도입된 외래 유전자의 발현 정도가 낮은 것은 도입된 유전자가 대부분 미생물에서 기원해서 식물과는 다른 codon usage의 선호도 및 G+C 비율을 가지기 때문인 것으로 보고되고 있다 (Perlak et al. 1991). 또 외래 유전자의 내에 존재하는 A+T의 연속적인 염기 배열이 식물에서의 polyadenylation signal 과 유사하여 mRNA를 불안정하게 하기도 하는 것으로 보고되고 있다 (Perlak et al. 1991). 식물

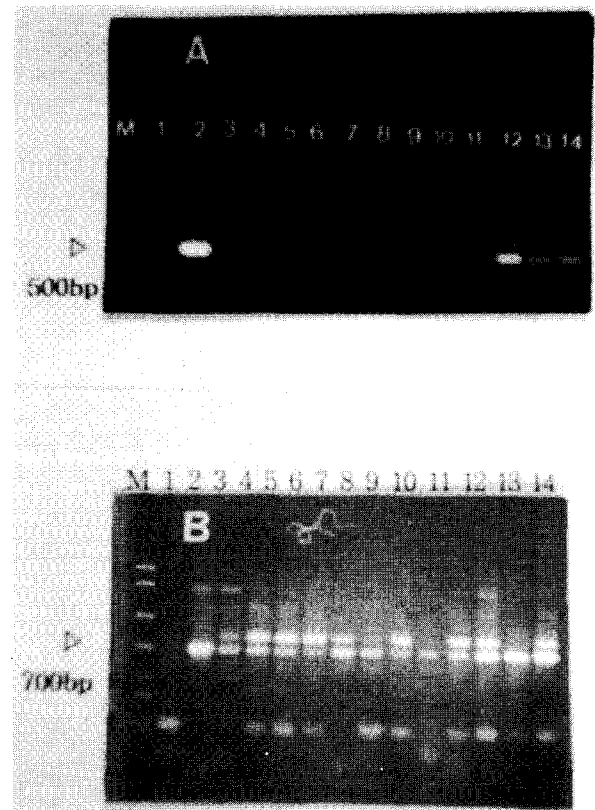


Figure 6. Electrophoresis patterns of PCR products from non-transgenic and transgenic callus of *Codonopsis lanceolata*. (A) PCR products using the primers for NPT II; (B) PCR products using the primers for *bar* gene. M: Marker KB (Bioneer, Korea), lane 1: non-transformant, lane 2: positive Control (pGA-Bar), lanes 3~14: putative transformants

내에 존재하는 transgene silence system도 형질전환 식물에서 외래 유전자의 효율적 발현을 어렵게 하는 요인으로 보고되고 있다 (Matzke and Matzke, 1995). 이러한 단점을 극복하고자 현재에는 유전자의 염기 서열을 아미노산의 변화 없이 식물의 codon usage 선호도에 맞게 치환하는 유전자의 합성 및 재조합의 과정을 수행하여 형질전환을 수행하고 있으며, 도입하려는 유전자의 활성부위만을 선별하여 그 부위에 해당 하는 유전자만을 형질전환함으로써 유전자의 발현을 안정적으로 유도하려는 노력도 계속되고 있다 (Agaisse and Lereclus, 1995).

지난 80년대 초부터 시작되어 현재까지 많은 작물의 형질 개량이 이루어져 왔으며, 이미 바이러스 저항성 (Lee et al. 1996; Tumer et al. 1987), 해충 저항성 (Barton et al. 1987; Cho, 1995; Perlak et al. 1990; Salm et al. 1994; Vaeck et al. 1987) 식물 등이 개발되었다. 이중 제초제 저항성에 관한 연구가 가장 많이 연구되고 있으며, 1996년에는 FDA, USDA, EPA 등의 공공기관의 승인으로 미국의 Monsanto 사가 개발한 제초제 저항성 콩 (Round-UP™ soybean)이 상품으로 시판되고 있으며 옥수수, 밀, 쌀 등도 이미 개발을 마친 상태이다. 그러므로 우리 나라에서 널리 재배되는 식용 작물의 형질 전환에 대한 연구 및 형질전환 식물의 도입 유전자의 발현에 관한 연구는 현재 매우 필요한 것으로 사료된다. 본 연구에서는 우리 나라에서 재배되는 더덕의 기내 종자 발아 및 재분화 조건을 알아보고 제초제 저항성 더덕 개발에 필요한 연구를 수행하였다. 본 연구를 바탕으로 앞으로 포장 시험 및 후대 검정 등의 과정을 통하여 제초제 내성을 지닌 더덕의 개발이 가능하리라 사료된다.

적 요

본 연구에서는 제초제 저항성 더덕을 개발하고자 하여 제초제 저항성 *bar* 유전자의 형질전환을 수행하였고, 더덕 종자 발아 생리, 체세포배 유도 및 선별배지 농도 등에 대해 조사하였다. 기내종자발아는 GA₃를 첨가한 MS배지에 치상하여 15°C에서 배양하였을 때 광, 암 두 조건 모두에서 90%의 발아율을 나타내었다. 식물체 재분화는 체세포 배발생 경로를 통하여 이루어 졌다. 배발생 켈러스는 자엽, 줄기, 잎을 2,4-D와 Zeatin을 혼용처리하여 유도할 수 있었다. Basta와 PPT는 10 mg/L 이상의 농도에서 식물체가 갈변고사 하였다. Explant는 100 mg/L 이상의 kanamycin에서 켈러스를 형성하지 못하였다. Explant를 제초제 저항성 *bar* 유전자의 식물 형질전환 벡터를 포함하는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404과 2일간 공존 배양한 후, 100 mg/L kanamycin, 500 mg/L carbenicillin과 1.0 mg/L 2,4-D이 포함된 배지에서 형질전환체를 선별하였고, 계대배양으로 배발생 켈러스를 유도하고 체세포배를 얻었다. 체세포배를 200 mg/L kanamycin, 500 mg/L

carbenicillin이 포함된 N6배지에 치상하여 발아시켰다. PCR 수행결과 NPT II와 *bar* 유전자가 증폭되어 나타남으로서 도입된 유전자가 잠정적인 형질전환체 내에 존재함을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통하여 얻어진 *bar* 유전자 형질전환 식물체는 RNA 및 단백질 수준에서의 발현 여부 검정을 거친 후, 제초제 저항성 더덕 생산 및 제초제 저항성 유전자의 후대 유전 양상 분석을 위한 기초 자료로 이용될 수 있을 것이다.

인용문헌

- Aeom, SI, Park SK, LIM YP, Lee CH, Kim HJ, KIM HR, Lee HY (1996) Development of bialaphos-resistant *Petunia hybrida* by introduction of the *bar* gene using *Agrobacterium tumefaciens*. Kor J Plant Tiss Cult 23:177-181
- Agaisse H, Lereclus D (1995) How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? J Bacteriol 177: 6027-6032
- Ahn CS, Chung SJ, Koh GC, Park SH (1986) Isolation and culture of protoplasts from *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC and *Codonopsis lanceolata* (Trautv. J.) J Kor Soc Hort Sci 27:205-212
- An G, Ebert PR, Mitra A, Ha SB (1988) Binary vectors, In Plant Molecular Biology Manual, Publishing staff editions, Kluwer Academic Publishers, Belgium, pp A3:1-19
- Barton KA, Whiteley HR, Yang NS (1987) *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. Plant Physiol 85:1103-1109
- Block MD, De Brouwer D, Paul T (1989) Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* gene in the transgenic plants. Plant Physiol 91:694-701
- Chang JS (1988) Studies on the characteristics and cultivation of seed germination of *Codonopsis lanceolata* in Korea. M.S. thesis, Konkuk University, Seoul, Korea, pp 53
- Cho HS (1995) Transformation of chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) with a Bt insecticidal gene. A.D. thesis, Kyungpook National University, Daegu, Korea, pp 87
- Choi PS, Kim YS, Liu JR, Soh WY (1994) Genetic transformation and plant regeneration of *Codonopsis lanceolata* using *Agrobacterium*. Kor J Plant Tiss Cult 21:315-318
- Choi PS, Min SR, Liu JR, Soh WY (1996) High frequency genetic transformation and plant regeneration using *Agrobacterium tumefaciens* via somatic embryogenesis of *Codonopsis lanceolata*. Kor J Plant Tiss Cult 23:239-242
- Dennehey BK, Petersen WL, Ford-Santino C, Pajean M, Armstrong CL (1994) Comparison of selective agents for use with the selectable marker gene *bar* in maize transformation. Plant Cell

- Tiss Org Cult **36**:1-7
- Eliseu S, Figueiredo LFA, Monte-neshich DC** (1994) Transformation of potato (*Solanum tuberosum* cv Mantiqueira) using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of herbicide resistance. Plant Cell Rep **13**:666-670
- Fujimura T, Komamine A** (1975) Effect of various growth regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Plant Sci Lett **5**:359-364
- Keertis SR, Vija KC, Thomas KH** (1993) Use of *bar* as a selectable marker gene and for the production of herbicide-resistant rice plants from protoplasts. Plant Mol Biol **21**:871-884
- Kim IH, Han TJ, Kim WT, Lee KW, Kim JC, Cho SH** (1996) Effect of organic nitrogen sources on seedling growth, and adventitious root formation in leaf explant cultures of *Pimpinella brachycarpa*. Kor J Plant Tiss Cult **23**:323-328
- Lee KW, Park SW, Kim NW, Park EK, Choi WY** (1996) Delay of disease symptom development in transformed tobacco plants with TMV coat protein cDNA. Kor J Plant Tiss Cult **23**:15-20
- Matzke MA, Matzke AJM** (1995) How and why do plants inactivate homologous (trans) genes? Plant Physiol **107**: 679-685
- Min SR, Yang SG, Liu JR, Choi PS, Soh WY** (1992) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue culture of *Codonopsis lanceolata*. Plant Cell Rep **10**:621-623
- Nehra NS, Chobbar RN, Leung N, Caswell K, Mallard C, Steinhauer L, Baga M, Kartha KK** (1994) Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs. Plant Journal **5**:285-297
- Pedroso MC, Pais MS** (1993) Direct embryo formation in leaves of *Camillia japonica* L. Plant Cell Rep **12**:639-643
- Perlak FJ, Deaton RW, Armatrong TA, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Fischhoff DA** (1990) Insect resistant cotton plants. Bio/Technology **8**:939-943
- Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL, Fischhoff DA** (1991) Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. Proc Natl Acad Sci USA **88**: 3324-3328
- Salm T, Bosch D, Honée G, Feng L, Munsterman E, Bakker P, Stiekema WJ, Bert V** (1994) Insect resistance of transgenic plants that express modified *Bacillus thuringiensis cryIAb* and *cryIC* genes: a resistance management strategy. Plant Mol Biol **26**:51-59
- Shin JH, Sohn JK, Kim JC, Park SD** (1996) Effect of GA₃ on seed germination of peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). Kor J Plant Tiss Cult **23**:231-234
- Soh WY** (1993) Developmental and structural diversity of regenerated plants in cell and tissue cultures. In Proc 7th Symposium on Plant Biotechnology, Molecular approach to plant cell differentiation (July 9), pp 1-35.
- Spencer TM, Gordon-Kamm WJ, Daines RJ, Start WG, Lemaux PG** (1990) Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture. Theor Appl Genet **79**:626-631
- Takeshi M, Hirouki A, Satoshi I, Atsuyuki S, Kozo N, Charles JT** (1986) The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus* : Molecular cloning and characterization of the gene cluster. Mol Gen Genet **205**:42-50
- Thersa MF, Julpark C, Tanksley SD** (1995) Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. Plant Mol Biol Rep **13**:207-209
- Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Cramer R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J** (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. The EMBO J **6**:2519-2523
- Toki S, Takamatsu S, Nojiri C, Ooba S, Anzai H, Iwata M, Christensen AH, Quail PH, Uchimiya H** (1992) Expression of a maize ubiquitin gene promoter-*bar* in transgenic rice plants. Plant Physiol **100**:1503-1507
- Tumer NE, O'Connel KM, Nelson RS, Sanders PR, Fraley RT, Shah DM** (1987) Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato plants. The EMBO J **6**:1181-1188.
- Vaeck M, Reynaerts A, Höfte H, Jansens S, De Beuckeleer M, Dean C, Zabeau M, Van Montagu M, Leemans J** (1987) Transgenic plants protected from insect attack. Nature **328**:33-37
- Vasil V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK** (1992) Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. Bio/Technology **10**:667-674
- Viegas PM, Notani NK** (1993) Heritable transformation of tobacco by *Agrobacterium*- mediated transfer of the *Streptomyces*-derived herbicide resistance gene *bar*. J Genet **72**:35-42
- White J, Chang SYP, Bibb MJ** (1990) A cassette containing the *bar* gene of *Streptomyces hygroscopicus*: a selectable marker for plant transformation. Nucl Acids Res **18**:1062
- Wilkison JQ** (1997) Commercialization of genetically engineered plants in the United States ; overview examples and future prospects. Kor J. Plant Tiss Cult **24**:203-212
- Zhao Z, Lowe K, Marsh W** (1993) *Bar* gene as a selection marker for maize transformation. Maize Genetics Cooperation Newsletter. No. 67, pp 54