

옥수수 전위유전자 *Ac* 및 *Ds*의 2배체종 감자 Genome 내로의 도입

김화영* · 임용표¹

강릉대학교 생명과학대학 원예학과, ¹충남대학교 농과대학 원예학과

Introduction of Maize Transposable Elements, *Ac* and *Ds* into the Genome of a Diploid Potato Species

KIM, Hwa Yeong* and LIM, Yong Pyo¹

Department of Horticulture, Kangnung National University, Kangnung, 210-702, Korea

¹Department of Horticulture, Chungnam National University, Taejon, 305-764, Korea

ABSTRACT Two maize transposable elements, immobilized *Ac* (*iAc*) and *Ds*, have been introduced into the genome of a diploid potato clone (*Solanum tuberosum* Group Phureja clone 1.22). The *iAc* is a modified *Ac* that is supposed to be unable to transpose but is expected to *trans*-activate the transposition of a *Ds* that is unable to transpose by itself. When the leaf and stem explants of *in vitro* shoots of the clone 1.22 were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* strains harboring binary vectors containing the *iAc* and the *Ds*, calli were formed from the explants on media containing 50 mg/L of kanamycin, and shoots were regenerated from the calli. The regenerated shoots formed roots when cultured on media containing 100 mg/L of kanamycin, whereas untransformed shoots did not form roots on the same media. The PCR amplification of the DNA's from the transgenic plants confirmed that the *iAc* and the *Ds* elements were introduced into the potato genome of 1.22.

Key words: Gene cloning, *solanum tuberosum*, transformation, transposon tagging

서 론

현재 가장 많이 이용되고 있는 감자의 재배종 (*Solanum tuberosum* Group Tuberosum)은 4배체종으로서 남미의 고산지대에서 재배되고 있는 *S. tuberosum* Group Andigena의 일부가 유럽으로 전래되어 적응된 것으로 알려져 있으며, 결과적으로 유전적 다양성이 제한되어 새로운 특성이 도입된 신품종의 육성이 매우 어려운 것으로 인식되고 있다 (Mok 1985). 반면에 감자의 야생근연종은 종류가 매우 다양하여 풍부한 유전자원으로서의 이용이 가능하다 (Hawkes 1958). 그러나, 대부분의 야생근연종은 2배체종이므로 4배체 재배종의 반수체 (2배체)를 유도하여 2배체 야생근연종과의 교잡에 이용하고 있으며 (Hougas and Peloquin 1960), 교잡 결과 생산

되는 식물체는 2배체일 뿐만 아니라 야생근연종의 유용형질과 열악형질을 함께 지니고 있으므로 야생근연종의 유용형질만이 도입된 4배체 계통을 얻기 위해서는 다시 복잡한 육종적 조작이 추가로 수행되어야 한다. 이에 반하여 야생근연종의 유용유전자가 cloning될 경우 형질전환에 의하여 상대적으로 적은 노력과 시간으로 야생근연종의 유용형질을 4배체 재배종에 도입할 수 있다.

옥수수의 전위유전자는 염색체상의 위치 이동이 자체적으로 가능한 autonomous element와 자체이동은 불가능하나 autonomous element의 작용에 의해서 이동이 가능한 nonautonomous element로 구분되며, Activator/Dissociation (*Ac/Ds*) system의 경우 *Ac*는 자체이동이 가능하나, *Ds*는 *Ac*의 작용에 의해서만이 이동이 가능하다 (Fedoroff 1984). *Ac*나 *Ds*는 염색체상의 이동이 가능하므로 유전자의 삽입돌연변이의 유발이 가능하며, *Ac*나 *Ds*가 삽입된 유전자

*Corresponding author. Tel 0391-640-2354

E-mail hwakim@knusun.kangnung.ac.kr

를 보유하는 개체가 획득될 경우 cloning된 *Ac*나 *Ds*를 probe로 이용하여 유전자를 cloning할 수 있다. 이와 같은 전위유전자 표지에 의한 유전자 cloning 기술은 *bronze-1*, *al*, *cl*, *opaque-2*, *brittle-1* 등 다수의 옥수수 유전자 cloning에 이용되었다 (Cone et al. 1986; Federoff et al. 1984; O'Reilly et al. 1985; Schmidt et al. 1987; Sullivan et al. 1991). 그러나, 전위유전자 표지를 이용한 유전자 cloning은 전위유전자의 존재 구명 및 cloning이 되어 있지 않은 식물에서는 이용이 불가능하였다. 따라서, 옥수수의 전위유전자를 각종 고등식물에 도입하여 이용하려는 연구가 많이 수행되고 있으며, *Ac*의 경우 담배 (Baker et al. 1986), *Arabidopsis*와 당근 (Van Sluys et al. 1987), 토마토 (Yoder et al. 1988), 감자 (Knapp et al. 1988), 대두 (Zhou and Atherly 1990), 벼 (Izawa et al. 1991), 페튜니아 (Kim et al. 1993), 서양고추냉이 (Bae et al. 1994) 등에 도입되어 있다.

*Ac*의 활성은 식물의 종에 따라 다르며, 옥수수에서는 *Ac*의 copy 수가 증가할수록 *Ac*의 이동 빈도가 감소하나 (McClintock 1948; 1951), 담배의 경우는 반대의 경향으로서 *Ac*의 copy 수가 증가됨에 따라 *Ac*의 이동 빈도가 증가한다 (Jones et al. 1989). *Ac*의 이동 빈도의 증가는 전위유전자 표지를 이용한 유전자 cloning에 있어 *Ac*가 삽입된 목표 유전자의 식별 확률을 감소시키므로 문제가 되며, *Ac*의 이동에 필요한 element 양끝의 11 bp 역반복말단 염기배열의 일부 또는 전부를 제거하여 이동은 불가능하나 *Ds*의 이동에 필요한 전위효소의 생산은 가능한 immobilized *Ac* (*iAc*)를 만들어 *iAc*와 *Ds*를 genome에 도입함으로써 유전자를 *Ds*로 표지하는 방법이 시도되고 있다 (Bancroft et al. 1992; Hehl and Baker 1989). 따라서, 본 연구는 전위유전자 표지를 이용한 2배체 야생근연종 감자의 유용유전자 cloning 체계 개발을 목표로 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 의해 *iAc*와 *Ds*를 2배체 근연종 감자 genome에 도입하고자 수행되었다.

재료 및 방법

감자 계통 및 식물재료

감자 계통은 2배체 근연종 (*Solanum tuberosum* Group Phureja)으로서 잎, 줄기, 배축, 괴경 등의 색소형성 변화에 의하여 변이체의 추적이 용이한 1.22 계통을 이용하였으며, 경단배양에 의해 양성된 기내배양신초를 식물재료로 사용하였다. 기내배양신초는 sucrose 30 g/L 및 한천 10 g/L가 첨가된 Murashige-Skoog (MS) 배지를 이용하여 22°C, 16시간 일장의 배양실에서 계대배양하여 사용하였다.

Agrobacterium 계통 및 vector 플라스미드

Agrobacterium 계통은 *A. tumefaciens* LBA4404에 binary vector인 pEND4K (Klee et al. 1985)와 pEND4K에 옥수수 전위유전자 *iAc* 또는 *Ds*가 삽입된 TAcD1, TAcD3, TDs 등의 재조합 플라스미드 vector가 도입된 4개 계통으로서 YEP 배지 (Bacto peptone 10 g/L, yeast extract 10 g/L, NaCl 5 g/L, 한천 15 g/L)에 kanamycin 100 mg/L와 streptomycin 20 mg/L를 첨가하여 유지·선발하였다. pEND4K는 왼쪽과 오른쪽 T-DNA border 염기배열 사이에 kanamycin 저항성 유전자 neomycin phosphotransferase II (*npt II*)가 삽입되어 있다. TAcD1은 *Ac*의 왼쪽 역반복말단 염기배열 2 bp와 오른쪽 역반복말단 염기배열 전부가 제거된 *iAc* (AcD1)가 삽입되어 있으며, TAcD3은 *Ac*의 오른쪽 역반복말단 염기배열 전부가 제거된 *iAc* (AcD3)가, TDs는 *wx-m1* (Wessler et al. 1986) 유래 *Ds*가 삽입되어 있다. 형질전환을 위한 신초 절편 접종용 *Agrobacterium*은 kanamycin 100 mg/L와 streptomycin 20 mg/L를 첨가한 YEP 액체배지를 이용하여 28°C에서 하룻밤 동안 진탕배양한 것을 사용하였다.

신초 절편의 형질전환 처리 및 배양

형질전환 처리용 식물재료는 계대배양배지 치상 후 3~4주 경과된 기내배양신초의 잎과 줄기였으며, 잎은 작은 것은 선단부와 기부를 절단·제거하여 사용하였고, 큰 것은 5 x 3 mm 정도로 절단하여 사용하였다. 줄기는 3~5 mm 길이로 절단하여 사용하였다. 신초 절편의 형질전환 처리 및 배양 방법은 Visser 등 (1989)의 방법을 사용하였으며, NH₄NO₃ 80 mg/L, CaCl₂ 14.7 mg/L, NAA 10 mg/L 및 BAP 10 mg/L를 첨가한 MS 액체배지에 치상하여 하룻밤 동안 부유배양한 잎과 줄기 절편을 하룻밤 동안 진탕배양된 *Agrobacterium* 용액에 침지처리한 후 sucrose 1.0 g/L, mannitol 4.0 g/L, BAP 2.25 mg/L 및 IAA 0.175 mg/L가 첨가된 한천 농도 1.8%의 MS 배지 (M379)에 치상하여 2일간 배양하였다. M379 배지에서 배양된 절편들은 *Agrobacterium*의 성장억제를 위해 cefotaxime 200 mg/L가 첨가된 M379 배지로 옮겨 5~7일간 배양한 후, 신초의 재분화를 위하여 sucrose 15 g/L, BAP 2.25 mg/L, GA₃ 5.0 mg/L, cefotaxime 200 mg/L 및 kanamycin 50 mg/L가 첨가된 MS 배지 (M384)로 옮겨 배양하였으며, 3~4주 간격으로 신선한 M384 배지로 옮겨주었다. 신초 절편의 배양조건은 22°C, 16시간 일장이었다.

재분화 신초의 kanamycin 저항성 검정

신초 절편의 형질전환 처리 및 배양에 의해 획득된 재분화 신초는 *Agrobacterium* 제거를 위하여 cefotaxime 200 mg/L, sucrose 30 g/L 및 한천 10 g/L가 첨가된 MS 배지에서 4주간 계대배양한 다음, 1~2개의 마디를 포함하도록 절단된 신초를 sucrose 30 g/L, GA₃ 0.2 mg/L 및 kinetin 0.1 mg/L가 첨가된

MS 액체배지에서 2주간 진탕배양하여 증식하였다. 증식된 신탄는 kanamycin 저항성 검정 및 발근을 위하여 신탄의 정단 부위를 2~3 cm 크기로 잘라 kanamycin 100 mg/L, sucrose 10 g/L, thiamine-HCl 1.0 mg/L, nicotinic acid 0.5 mg/L, pyridoxine-HCl 0.5 mg/L, CaCl₂ · 2H₂O 1.98 mg/L 및 한천 9 g/L가 첨가된 1/2 염농도의 MS 배지 (발근배지)에 치상하여 발근 여부를 조사하였다. 발근된 신탄는 배양실에서 약 2 개월간 순화시킨 후, 온실로 옮겨 식물체를 양성하였다.

형질전환 식물의 iAc 및 Ds 도입 여부 검정

형질전환 처리에 의해 획득된 식물들의 iAc 및 Ds 도입 여부를 검정하고자 양성된 식물체의 잎으로부터 DNA를 추출하여 분석하였다. DNA 추출은 Dellaporta 등 (1983)의 식물 DNA 간이추출법을 사용하였으며, DNA 분석은 polymerase chain reaction (PCR) 분석법을 이용하였다. PCR 분석에 사용된 primer들은 iAc 및 Ds 특이적 oligonucleotide들이었으며, iAc primer 1은 *Ac* 염기배열 (Müller-Neumann et al. 1984)의 1650~1675 bp에 해당하는 5'-TCAAGGAAGC ATGCT ACAGCTAGTGC-3'을, primer 2는 2224~2247 bp의 염기배열에 상보적인 5'-GTTGCAAAGGATGGCT TGGCT GTA-3'을 사용하였다. *Ds* primer 1은 *Ds* 염기배열 (Wessler et al. 1986)의 19~44 bp에 해당하는 5'-GAAACGGTATT TATTCGGTAATCAGT-3'을, primer 2는 379~400 bp의 염기배열에 상보적인 5'-AAGTGA TAATCTGAGCT GTTAG-3'을 사용하였다. PCR 기종은 EquiBio (Belgium)의 ThermoJet thermocycler이었으며, PCR 반응액의 구성은 *Taq* polymerase 2.5 units, dNTP 200 mM, primer 100 pM과 2.0 µg의 식물 DNA를 사용하였다. PCR 반응은 94°C에서 2분간 처리한 후, 94°C/15초 → 55°C/30초 → 72°C/90초의 처리를 1 cycle로 하여 45회 반복하였으며, DNA 증폭이 끝난 후 72°C에서 3분간 안정화시켜 4°C에서 유지되도록 하였다. PCR 반응 결과는 반응당 12 µl를 agarose gel 전기영동에 의해 분석하였다.

결 과

신탄 절편의 캘러스 형성 및 신탄 재분화 능력

기내배양신탄의 잎과 줄기 절편 배양에 따른 1.22의 캘러스 형성 및 신탄 재분화 능력을 구명하기 위하여 *Agrobacterium*을 접종하지 않은 기내배양신탄의 잎과 줄기 절편을 항생제가 첨가되지 않은 배지를 이용하여 Visser 등 (1989)의 방법에 따라 배양한 결과, figure 1-A와 같이 모든 절편들이 캘러스를 형성하였으며, 일부 절편들은 신탄를 형성하였다. 따라서, 신탄 재분화율을 조사한 결과, 잎 절편은 15.8%

줄기 절편은 24.4%의 재분화율을 보였다 (Table 1). 그러나, 배지에 50 mg/L의 kanamycin을 첨가할 경우 배양초기에는 캘러스를 형성하였으나, 시간이 경과함에 따라 치상된 절편 모두 생장이 중지되었다 (Figure 1-B). 따라서, Visser 등 (1989)의 방법을 이용하여 1.22 기내배양신탄의 잎과 줄기 절편을 배양할 경우 캘러스 형성 및 신탄 재분화가 가능하며, 배지에 50 mg/L의 kanamycin을 첨가할 경우 캘러스 및 신탄 형성 능력을 상실하는 것으로 판단되었다.

신탄 절편의 형질전환 처리 및 배양 결과

배지에 50 mg/L의 kanamycin을 첨가할 경우 1.22의 잎과 줄기 절편은 캘러스 형성 및 신탄 재분화 능력을 상실한다 (Figure 1-B). 그러나, kanamycin 저항성 유전자 NPT II를 보유하는 pEND4K, TAcD1, TAcD3, TDs 등의 binary vector 및 재조합 vector 플라스미드를 보유하는 *Agrobacterium* 계통들로 형질전환 처리된 잎과 줄기 절편의 경우는 Figure 2와 같이 50 mg/L의 kanamycin이 첨가된 배지에서도 캘러스 형성 및 신탄 재분화가 가능하였다. 그러나, Table 2와 같이 신탄 절편의 채취 기관에 따라 캘러스 형성율이 차이를 나타내어 잎 절편의 경우 37.6%의 캘러스 형성율을 보인 반면 줄기 절편은 16%로서 잎 절편보다 저조하였으며, 서로 다른 vector 플라스미드를 보유하는 *Agrobacterium* 계통들에 따라서도 캘러스 형성율이 차이가 있었다. 한편, 신탄 재분화 반응은 TAcD1과 TDs 보유 *Agrobacterium* 계통들로 처리된 잎 절편들만이 신탄를 형성하였으며, 줄기 절편의 경

Table 1. Shoot regeneration response of the leaf and stem explants of the potato clone 1.22 cultured on media without antibiotics.

| No. of explants cultured | | No. of explants with shoots regenerated (%) | |
|--------------------------|------|---|-----------|
| Leaf | Stem | Leaf | Stem |
| 19 | 41 | 3 (15.8) | 10 (24.4) |

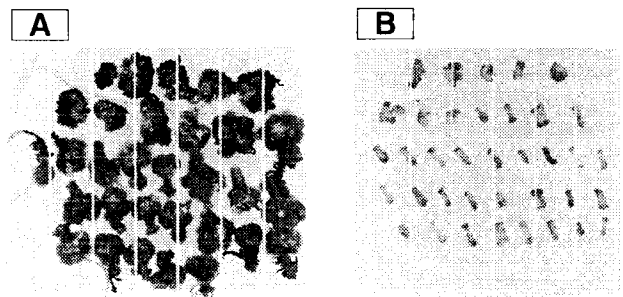


Figure 1. Callus and shoot formation responses of the leaf and stem explants of the potato clone 1.22. (A) Culture on media without antibiotics; (B) Culture on media with antibiotics.

우는 신초가 분화된 절편이 없었다 (Figure 2, Table 2).

재분화 신초의 kanamycin 저항성

형질전환 처리에 의해 재분화된 신초의 *Agrobacterium*을 제거하기 위하여 재분화 신초를 잘라 cefotaxime 200 mg/L가 첨가된 MS 배지에서 4주간 계대배양한 결과, cefotaxime이 첨가되지 않은 배지에서도 *Agrobacterium*의 colony 형성

이 발견되지 않았다. 따라서, 계대배양된 재분화 신초를 1~2개의 마디를 포함하는 절편으로 잘라서 sucrose 30 g/L, GA₃ 0.2 mg/L 및 kinetin 0.1 mg/L가 첨가된 MS 액체배지를 이용하여 2주간 진탕배양한 결과, 신초의 증식이 가능하였다 (Figure 3-A). 증식배양된 재분화 신초의 kanamycin 저항성 검정 및 발근을 위하여 신초의 정단부위를 2~3 cm 크기로 잘라 100 mg/L의 kanamycin이 첨가된 발근배지에 치상하여 발근 여부를 조사한 결과, 형질전환 처리되지 않은 신초는 뿌리를 형성하지 못하고 생장이 정지된 반면에 형질전환 처리에 의해 재분화된 신초는 발근이 되어 정상적으로 성장하였다 (Figure 3-B). 따라서, 형질전환 처리에 의해 재분화된 신초의 경우 NPT II 유전자가 도입되어 발현되는 것으로 판단되었으며, iAc와 Ds도 도입되었을 것으로 추측되었다. 이와 같이 발근된 신초를 배양실에서 순화시킨 후 온실로 옮겨 식물체를 양성한 결과, figure 3-C와 같이 정상적인 생육 상태의 식물체를 획득하였다.

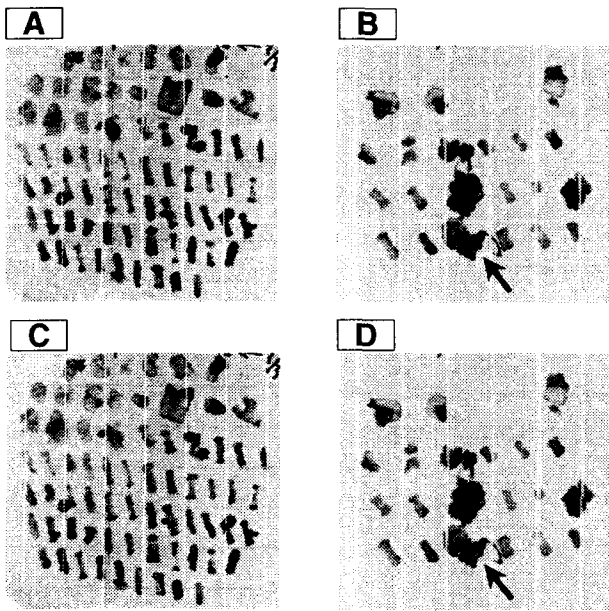


Figure 2. Callus and shoot formation responses of the leaf and stem explants of the potato clone 1.22 inoculated with the *Agrobacterium tumefaciens* strains harboring the binary vector of pEND4K (A) and the recombinant vector plasmids of TAcD1 (B), TAcD3 (C) and TDs (D). The explants were cultured on media containing 50 mg/L of kanamycin. Arrows indicate the explants with regenerated shoots.

Table 2. Callus and shoot formation responses of the leaf and stem explants of the potato clone 1.22 inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* strains harboring different vector plasmids.

| Vector plasmids | No. of explants cultured | | No. (%) of explants with calli | | No. of explants with shoots(%) | |
|-----------------|--------------------------|------|--------------------------------|-----------|--------------------------------|------|
| | Leaf | Stem | Leaf | Stem | Leaf | Stem |
| pEND4k | 18 | 50 | 8 (44.4) | 11 (22.0) | 0 | 0 |
| TAcD1 | 6 | 16 | 2 (33.3) | 3 (18.8) | 1 | 0 |
| TAcD3 | 37 | 66 | 9 (24.3) | 6 (9.1) | 0 | 0 |
| TDs | 24 | 118 | 13 (54.2) | 20 (16.9) | 1 (4.2) | 0 |
| Total | 85 | 250 | 32 (37.6) | 40 (16.0) | 2 (2.4) | 0 |

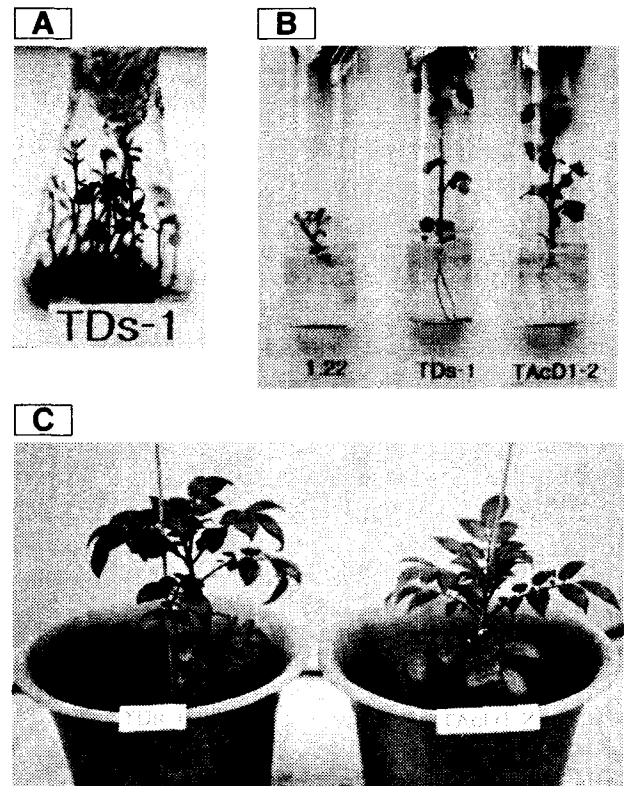


Figure 3. Multiplication and rooting of the transgenic 1.22 potato shoots. (A) Multiplication of the 1.22 shoots regenerated from the leaf explants inoculated with the *Agrobacterium tumefaciens* strain harboring the recombinant vector plasmid of TDs; (B) Rooting responses of the control (1.22) and the transgenic (TDs-1 and TAcD1-2) 1.22 shoots on media containing 100 mg/L of kanamycin; (C) Transgenic 1.22 plants grown from the shoots regenerated from the leaf explants inoculated with the *A. tumefaciens* strains harboring the recombinant vector plasmids of TDs and TAcD1.

형질전환 식물의 iAc 및 Ds 도입 확인

형질전환 처리 획득 식물들의 iAc 및 Ds 도입 여부를 검정하고자 iAc와 Ds의 염기배열에 대해 특이적인 oligonucleotide primer들을 이용하여 형질전환 처리 획득 식물들로부터 추출된 DNA에 대한 PCR 분석을 실시한 결과, iAc의 경우 figure 4와 같이 형질전환 처리 획득 식물 모두 사용된

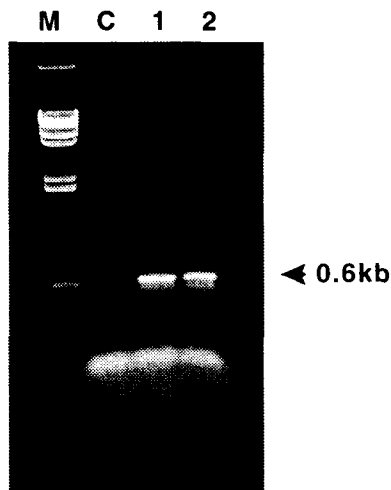


Figure 4. PCR analysis of the 1.22 potato plants transformed with iAc. DNA primers specific for the iAc were used for the PCR reactions. Lane M: DNA size marker. Lane C: PCR products of the DNA extracted from a untransformed 1.22 plant. Lanes 1 and 2: PCR products of the DNA's extracted from the 1.22 plants transformed with the iAc.

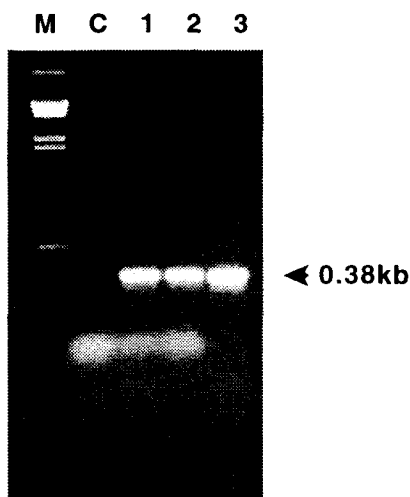


Figure 5. PCR analysis of the 1.22 potato plants transformed with Ds. DNA primers specific for the Ds were used for the PCR reactions. Lane M: DNA size marker. Lane C: PCR products of the DNA extracted from a untransformed 1.22 plant. Lanes 1 and 2: PCR products of the DNA's extracted from the 1.22 plants transformed with the Ds. Lane 3: PCR products of the DNA fragment containing the Ds.

primer들의 iAc 염기배열에 있어서의 위치에 의해 계산된 0.6 kb의 DNA가 형성되어 iAc의 도입이 확인되었다. Ds의 경우 또한 figure 5와 같이 형질전환 처리 획득 식물들의 DNA와 Ds를 포함하는 DNA 단편 모두 0.38 kb의 DNA가 형성되어 Ds가 도입된 것으로 판단되었다.

고 찰

전위유전자 표지를 이용한 2배체 야생근연종 감자의 유용 유전자 cloning 체계 개발을 목표로 옥수수의 전위유전자 Ac를 조작하여 전위효소는 생산하나 이동은 불가능하도록 제작된 iAc와 자체 이동은 불가능하나 iAc의 작용에 의해 이동이 가능한 Ds를 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 의해 2배체 근연종 감자 (*S. tuberosum* Group Phureja) 계통 1.22에 도입하고자 연구를 수행한 결과, iAc와 Ds가 도입된 1.22 형질전환식물들을 획득하였다. Ac는 4565 bp로서 양끝에 11 bp의 역반복말단 염기배열을 지니고 있으며, 이와 같은 11 bp 역반복말단은 Ac 및 Ds의 이동에 필요한 것으로 알려져 있다 (Pohlman et al. 1984). 본 연구 결과 형질전환 식물이 획득된 iAc (AcD1)의 경우 왼쪽 역반복말단의 끝 2 bp와 오른쪽 역반복말단의 4 bp가 제거된 Ac의 경우 전위기능을 상실한 바, AcD1 또한 전위기능이 상실된 것으로 추측한다. 타식물에서 옥수수 전위유전자를 이용하여 cloning된 유전자로서는 페튜니아의 꽃잎 산도 조절유전자 Ph6 (Chuck et al. 1993), *Arabidopsis*의 응성불임성 유전자 MS2 (Aarts et al. 1993), 토마토의 *Cladosporium fulvum* 저항성 유전자 Cf-9 (Jones et al. 1994) 등이 있으며, Cf-9의 경우 Ds 표지에 의해 cloning되었다. 따라서, 본 연구 결과 획득된 iAc (AcD1) 및 Ds 보유 1.22 식물들을 활용할 경우 2배체 야생근연종 감자의 유전자 표지 및 cloning이 가능할 것이다.

*Agrobacterium*을 접종하지 않은 1.22의 기내배양신초의 잎과 줄기 절편을 항생제가 첨가되지 않은 배지에서 배양 (일반 배양)할 경우 모든 절편들이 캘러스를 형성하였다 (Figure 1-A). 그러나, pEND4K, TAcD1, TAcD3, TDs 등의 binary vector 및 재조합 vector 플라스미드를 보유하는 *Agrobacterium* 계통들로 접종된 잎과 줄기 절편을 항생제가 첨가된 배지에서 배양 (형질전환 배양)할 경우 잎 절편보다 줄기 절편의 캘러스 형성율이 저조하였다 (Table 2). 더욱이 신초 재분화 반응의 경우 일반 배양에서는 잎 절편의 경우 15.8%, 줄기 절편의 경우 24.4%의 신초 재분화율을 나타내었으나 (Table 1), 형질전환 배양에서는 TAcD1과 TDs 보유 *Agrobacterium* 계통들로 처리된 잎 절편들만이 신초를 형성하였으며, 줄기 절편의 경우는 신초가 분화된 절편이 하나도 없었다. 이와같은 결과는 줄기 절편보다 잎 절편이 1.22 계통의 형질전환 재료로서 적합하며, 줄기 절편에 비하여 잎 절편

이 *Agrobacterium*의 감염에 민감함을 의미하는 것으로 사료된다. 한편, 형질전환배양의 경우 서로 다른 vector 플라스미드를 보유하는 *Agrobacterium* 계통들에 따라서도 캘러스 형성율이 차이가 있었으며 (Table 2), *Agrobacterium* 접종시 *Agrobacterium* 계통에 따른 세균 밀도의 차이에 기인하는 것으로 추정되나, 명확한 원인에 대한 검토가 필요하다.

적 요

전위유전자 표지를 이용한 2배체 야생근연종 감자의 유용 유전자 cloning 체계를 개발하기 위하여 옥수수의 전위유전자 *Ac*를 조작하여 전위효소는 생산하나 이동은 불가능하도록 제작된 immobilized *Ac* (*iAc*)와 자체 이동은 불가능하나 *iAc*의 작용에 의해 이동이 가능한 *Ds*를 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 형질전환에 의해 2배체 근연종 감자 (*Solanum tuberosum* Group Phureja) 계통 1.22에 도입하였다. *iAc* 및 *Ds* 삽입 binary vector들을 보유하는 *Agrobacterium* 계통들로 형질전환 처리된 1.22 기내배양신초의 잎과 줄기 절편의 경우 50 mg/L의 kanamycin이 첨가된 배지에서도 캘러스를 형성하였으며, 잎 절편으로부터 재분화신초가 획득되었다. 형질전환 처리되지 않은 1.22 신초는 100 mg/L의 kanamycin이 첨가된 배지에서 전혀 발근이 되지 않았으나, 형질전환 처리에 의해 획득된 재분화 신초는 동일 배지에서 발근이 되었다. *iAc*와 *Ds*의 염기배열에 대해 특이적인 oligonucleotide primer들을 이용하여 형질전환 처리 획득 식물들로부터 추출된 DNA에 대한 PCR 분석을 실시한 결과, 사용된 primer들의 *iAc*와 *Ds*의 염기배열에 있어서의 위치에 의해 예상되는 크기의 DNA들이 형성되어 *iAc*와 *Ds*의 1.22 genome 내 도입이 확인되었다.

사사 - 본 논문은 한국과학재단의 특정기초 연구과제 (92-2400-15-01-3)의 지원을 받아 수행되었음.

인용문헌

- Aarts MGM, Dirkse WG, Stiekema WJ, Pereira A (1993) Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis*. *Nature* **363**:715-717
- Bae CH, Nou IS, Lim YP, Min KS, Kim DC, Kim HJ, Lee HY (1994) Transformation of maize controlling element *Ac* and *Ds* into *Amaracia rusticana* via *Agrobacterium tumefaciens*. *Kor J Plant Tiss Cult* **21**:319-325
- Baker B, Schell J, Lörz H, Fedoroff N (1986) Transposition of the maize controlling element "*Activator*" in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:4844-4848
- Bancroft I, Bhatt AM, Sjodin C, Scofield S, Jones JDG, Dean C (1992) Development of an efficient two-element transposon tagging system in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **233**:449-461
- Chuck G, Robbins T, Nijjar C, Ralston E, Courtney-Gutterson N (1993) Tagging and cloning of a petunia flower color gene with the maize transposable element *Activator*. *Plant Cell* **5**:371-378
- Cone KC, Burr FA, Burr B (1986) Molecular analysis of the maize anthocyanin regulatory locus *C1*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:9631-9635
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep* **1**:19-21
- Fedoroff NV (1984) Transposable genetic elements in maize. *Scientific American* **250**:85-98
- Fedoroff NV, Furtek DB, Nelson OE (1984) Cloning of the *bronze* locus in maize by a simple and generalizable procedure using the transposable controlling element *Activator* (*Ac*). *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:3825-3829
- Hawkes JG (1958) Significance of wild species and primitive forms for potato breeding. *Euphytica* **7**:257-270
- Hehl R, Baker B (1989) Induced transposition of *Ds* by a stable *Ac* in crosses of transgenic tobacco plants. *Mol Gen Genet* **217**:53-59
- Hougas RW, Peloquin SJ (1960) Crossability of *Solanum tuberosum* haploids with diploid *Solanum* species. *Eur Potato J* **3**:325-330
- Izawa T, Miyazaki C, Yamamoto M, Terada R, Iida S, Shimamoto H (1991) Introduction and transposition of the maize transposable element *Ac* in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet* **227**:391-396
- Jones DA, Thomas CM, Hammond-Kosack KE, Balint-Kurti PJ, Jones JDG (1994) Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* **266**:789-793
- Jones JDG, Carland FM, Maliga P, Dooner HK (1989) Visual detection of transposition of the maize element *Activator* (*Ac*) in tobacco seedlings. *Science* **244**:204-207
- Kim SJ, Cho HJ, Lim YP, Kim BD (1993) Introduction of maize controlling element "*Ac*" into *Petunia hybrida*. *J Kor Soc Hort Sci* **34**:294-300
- Klee HJ, Yanofsky MF, Nester EW (1985) Vectors for transformation of higher plants. *Bio/Technology* **3**:637-642
- Knapp S, Coupland G, Uhrig H, Starlinger P, Salamini F (1988) Transposition of the maize transposable element *Ac* in *Solanum tuberosum*. *Mol Gen Genet* **213**:285-290
- McClintock B (1948) Mutable loci in maize. *Carnegie Inst Washington Yearbook* **46**:155-169
- McClintock B (1951) Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **16**:13-47
- Mok IJ (1985) Potato breeding: The present status and new

- approches. *Kor J Breeding* 17:263-272
- Müler-Neumann M, Yoder JI, Starlinger P** (1984) The DNA sequence of the transposable element *Ac* of *Zea mays* L. *Mol Gen Genet* 198:19-24
- O'Reilly C, Shepherd NS, Pereira A, Schwarz-Sommer Zs, Bertram I, Robertson DS, Peterson PA, Saedler H** (1985) Molecular cloning of the *a1* locus of *Zea mays* using the transposable elements *En* and *Mu1*. *EMBO J* 4:877-882
- Pohlman RF, Fedoroff NV, Messing J** (1984) The nucleotide sequence of the maize controlling element *Activator*. *Cell* 37:635-643
- Schmidt RJ, Burr FA, Burr B** (1987) Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus *opaque-2*. *Science* 238:960-963
- Sullivan TD, Strelow LI, Illingworth CA, Phillips RL, Nelson OE** (1991) Analysis of maize *brittle-1* alleles and a *defective Suppressor-mutator* -induced mutable allele. *Plant Cell* 3:1337-1348
- Van Sluys MA, Tempe J, Fedoroff N** (1987) Studies on the introduction and mobility of the maize *Activator* element in *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota*. *EMBO J* 6:3881-3889
- Visser RGF, Jacobsen E, Hesselting-Meiders A, Schans MJ, Witholt B, Feenstra WJ** (1989) Transformation of homozygous diploid potato with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector system by adventitious shoot regeneration on leaf and stem segments. *Plant Mol Biol* 12:329-337
- Wessler SR, Baran G, Varagona M, Dellaporta L** (1986) Excision of *Ds* produces waxy proteins with a range of enzymatic activities. *EMBO J* 5:2427-2432
- Yoder JI, Palys J, Alpert K, Lassner M** (1988) *Ac* transposition in transgenic tomato plants. *Mol Gen Genet* 213:291-296
- Zhou JH, Atherly AG** (1990) *In situ* detection of transposition of the maize controlling element (*Ac*) in transgenic soybean tissues. *Plant Cell Rep* 8:542-545

(접수일자 1999년 11월 25일)