

담배 (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4) 잎절편의 기관분화에 대한 항생제 carbenicillin의 auxin 유사효과

배창휴 · 양덕춘¹ · 이효연^{2*}

순천대학교 농업과학연구소, ¹한국인삼연구소, ²순천대학교 농업생명과학대학

Auxin-like Effect of the Antibiotic Carbenicillin on Organogenesis of Leaf Discs of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4)

BAE, Chang-Hyu · YANG, Deok Chun¹ · LEE, Hyo-Yeon^{2*}

Research Institute of Agricultural Science, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea

¹Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejeon, 305-345, Korea

²College of Agricultural Lifescience, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea

ABSTRACT Effect of the antibiotic carbenicillin on callus and shoot formation from the leaf disc culture of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4) was examined. The number of shoot induced from the leaf explants was decreased as the amount of carbenicillin increased from 250 mg/L to 2,000 mg/L on MS medium containing 0.5 mg/L of BAP or kinetin. In addition, calli formation from the leaf explants was increased by the treatment of 250 mg/L ~ 500 mg/L carbenicillin with or without 0.5 mg/L of 2,4-D or NAA. However, the fresh weight of 4-week-cultured explants was decreased with increasing carbenicillin from 250 mg/L to 2,000 mg/L on MS medium containing 0.5 mg/L of 2,4-D or NAA. These results indicate that carbenicillin has an auxin-like effect, such as promoting callus formation and inhibiting shoot induction. It leads to the conclusion that the auxin-like property should be taken into account for the production of transgenic plants via *Agrobacterium*-mediated transformation.

Key words: Auxin, cytokinin, leaf explant, shoot number

서 론

외래 유전자를 식물에 효율적으로 도입하기 위해서는 적합한 형질전환계와 효과적인 재분화계가 검토되어야 한다. 지금까지 외래 유전자를 식물에 도입하는 방법으로는 *Agrobacterium* 감염법, particle bombardment법, 전기충격에 의한 protoplast 도입법 등이 알려져 있다. 이중 *Agrobacterium* 감염법은 비교적 손쉽고 도입된 유전자가 후대에도 안정하게 발현되기 때문에 많은 연구자들이 이용하고 있다. 그러나 이 방법에 있

어서 *Agrobacterium* 감염 후에 균을 제거하기 위해서 배지 내에 첨가된 항생제인 carbenicillin 또는 cefotaxime은 치상 조직으로부터 식물체 재분화에 크게 영향을 미치는 것으로 보인다. 이와같이 carbenicillin이 첨가된 배지에서 식물체 재분화 조건이 바뀌는 것은 carbenicillin의 화학구조가 auxin인 2,4-D, NAA의 구조 (Figure 1)와 비슷하기 때문에 배지 내에서 auxin의 효과를 나타내고, 결과적으로 배지 내의 생장 조절제의 균형이 맞지 않아 신초분화가 억제되거나 뿌리 발생이 조장되는 것으로 보고되고 있다 (Lin et al 1995; Nauerby et al. 1997). 따라서 형질전환 후 carbenicillin의 영향을 고려하지 않고 조직배양계에서 결정한 신초 재분화 농도를 그대로 적용할 경우 식물체 재분화율이 급격히 감소하게 된다. 이와 유사한 연구는 감자 (Park et al. 1995), 금어초

*Corresponding author. Tel 0661-750-3286

E-mail hyoyeon@suncheon.suncheon.ac.kr

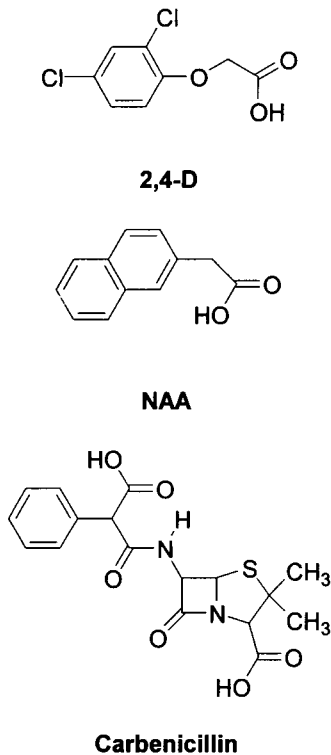


Figure 1. Structural formula of 2,4-D, NAA and carbenicillin.

(Holford and Newbury 1992), 애기장대 (Patton and Meinke 1988), 포도 (Colby and Meredith 1990), *Datura innoxia* (Horsch and King 1983) 등의 식물에서 보고되었다. 또한 carbenicillin의 auxin 유사효과는 동일 식물체 내의 기관 부위에 따라서도 다르게 나타나고 있으므로 (미발표자료), 효율적인 형질전환을 위해서는 각 식물체의 조직부위에 따른 식물체 재분화 과정에서 carbenicillin과 성장조절제의 상호작용에 대한 영향을 다양하게 검토할 필요가 있다. 본 연구의 실험재료인 담배 (*Nicotiana tabacum*)는 형질전환 연구에 있어서 널리 이용되는 모델식물로 알려져 왔고, 담배의 품종에 따라서는 carbenicillin에 대한 auxin의 효과가 인정되었다는 보고도 있다 (Lin et al. 1995; Nauerby et al. 1997; Pollock et al. 1983). 또한 실제 배양 중에 사용되고 있는 성장조절제의 종류 및 조합에 따른 carbenicillin의 영향에 대한 상세한 관찰은 부족한 실정이다. 그러므로, 본 연구는 담배의 carbenicillin 첨가에 따른 성장조절제의 영향을 조사하여 효율 높은 형질전환 배양계를 개발하는 데 있어 기초자료를 얻을 목적으로 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 배양

담배 (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4) 종자를 2% sodium

hypochlorite 용액에서 15분간 표면소독하여 멸균수에서 4회 수세하였다. 소독한 종자는 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지를 사용한 한천배지에 파종하여 10주째 식물체의 2~4엽의 엽신부위를 직경 4 mm의 코르크 보러로 채취하여 치상하였다. 배지는 MS 기본배지 성분에 3% sugar, 0.8% 한천을 첨가하였고, pH 5.8로 적정하였다. 본 실험의 모든 배양은 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 연속광 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 조건에서 실시하였다.

Carbenicillin 농도에 따른 잎조직의 auxin 효과

성장조절제가 첨가되지 않고 carbenicillin 0, 250, 500, 1000, 2000 mg/L가 첨가된 MS 배지에 직경 4 mm의 잎절편을 치상하고 배양 4주 후에 캘러스 형성 유무를 관찰하였다.

캘러스 증식에 대한 auxin류와 carbenicillin 농도별 혼합처리 효과

MS 기본배지에 NAA와 2,4-D를 각각 0.5 mg/L 첨가한 후, carbenicillin 0, 250, 500, 1000, 2000 mg/L의 농도로 처리한 배지에 상기와 동일하게 엽조직을 치상하였다. 배양 4주 후에 치상된 조직으로부터 캘러스의 생중량을 조사하였다.

신초분화에 미치는 cytokinin류와 carbenicillin 농도별 혼합처리 효과

MS 기본배지에 BAP와 kinetin을 각각 0.5 mg/L 첨가한 후 carbenicillin 0, 250, 500, 1000, 2000 mg/L 농도가 포함된 배지에 엽조직을 치상하고, 배양 4주 후에 분화된 길이 2 mm 이상의 신초 수를 조사하였다.

신초분화에 대한 carbenicillin과 BAP의 농도별 혼합 및 단독처리 효과

*Agrobacterium*법을 이용하여 식물에 형질전환을 시도할 경우 담배를 포함한 대부분의 식물에서 균을 제거하기 위하여 500 mg/L의 carbenicillin을 주로 사용하고 있다. 그러므로 BAP 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L가 포함된 MS 배지에 500 mg/L의 carbenicillin을 첨가 또는 무첨가 한 후, 배양 4주 후 신초 수와 생중량을 조사하였다.

Agrobacterium 감염조직으로부터 기관분화에 대한 carbenicillin과 BAP의 효과

형질전환에 사용된 T-DNA vector는 binary vector인 pGPTV-HB (Lee et al. 1998)로서 T-DNA 내부에 hygromycin phosphotransferase (Hyg^R)와 phosphinothricin

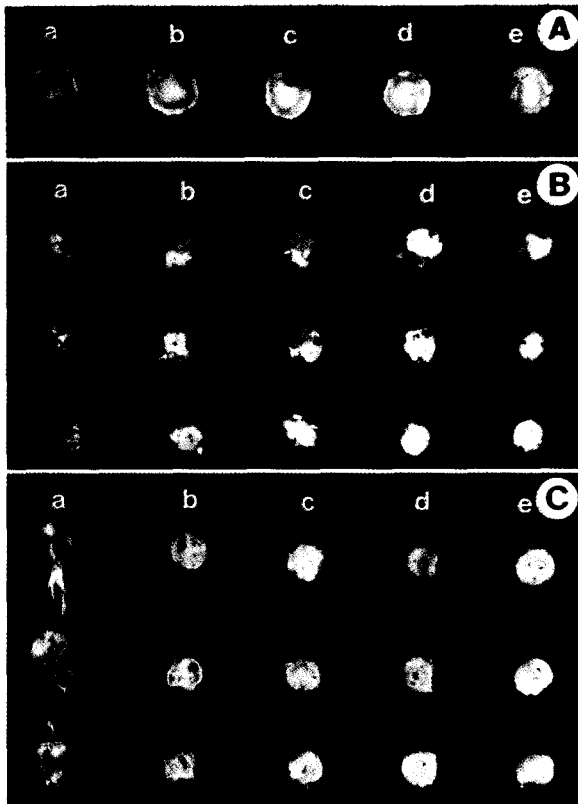


Figure 2. Effect of different concentrations of carbenicillin on callus induction of tobacco leaf discs cultured on MS media with or without 0.5 mg/L 2,4-D and NAA for 4 weeks. A, MS medium containing carbenicillin (a: 0 mg/L, b: 250 mg/L, c: 500 mg/L, d: 1000 mg/L, e: 2000 mg/L); B, MS medium containing 0.5 mg/L 2,4-D and carbenicillin (a: 0 mg/L, b: 250 mg/L, c: 500 mg/L, d: 1000 mg/L, e: 2000 mg/L); C, MS medium containing 0.5 mg/L NAA and carbenicillin (a: 0 mg/L, b: 250 mg/L, c: 500 mg/L, d: 1000 mg/L, e: 2000 mg/L).

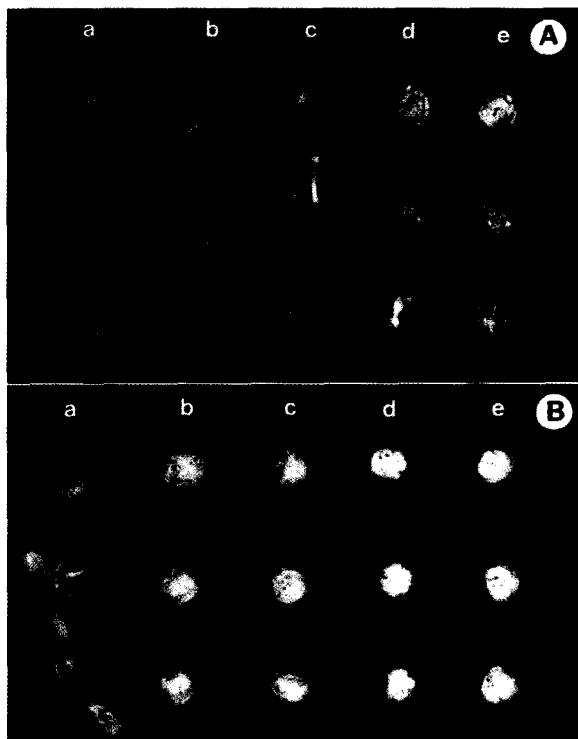


Figure 3. Effect of different concentrations of carbenicillin on shoot induction of tobacco leaf discs cultured on MS media containing BAP and kinetin for 4 weeks. A, MS medium containing 0.5 mg/L BAP and carbenicillin (a: 0 mg/L, b: 250 mg/L, c: 500 mg/L, d: 1000 mg/L, e: 2000 mg/L); B, MS medium containing 0.5 mg/L kinetin and carbenicillin (a: 0 mg/L, b: 250 mg/L, c: 500 mg/L, d: 1000 mg/L, e: 2000 mg/L).

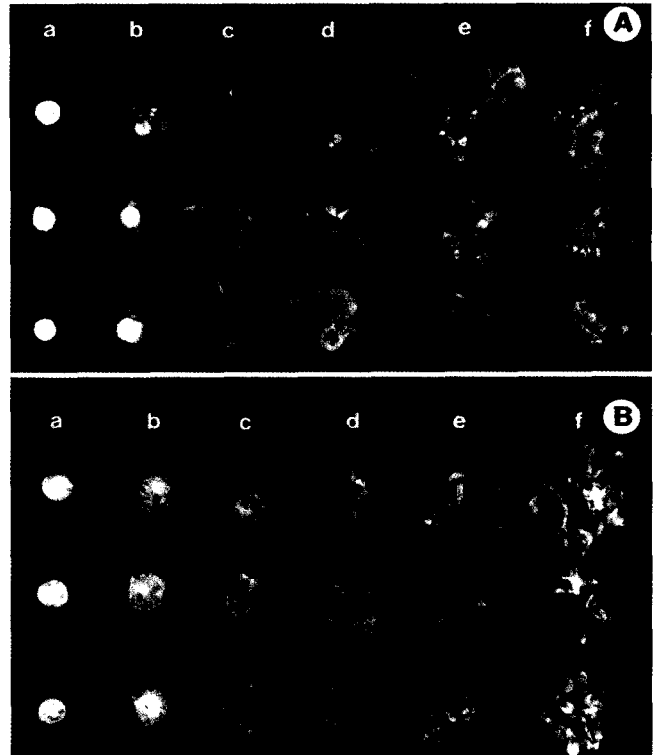


Figure 4. Shoot induction from tobacco leaf discs cultured on MS media containing different concentrations of BAP with or without carbenicillin for 4 weeks. A, MS medium containing BAP (a: 0 mg/L, b: 0.1 mg/L, c: 0.25 mg/L, d: 0.5 mg/L, e: 1.0 mg/L, f: 2.0 mg/L); B, MS medium containing 500 mg/L carbenicillin and BAP (a: 0 mg/L, b: 0.1 mg/L, c: 0.25 mg/L, d: 0.5 mg/L, e: 1.0 mg/L, f: 2.0 mg/L).

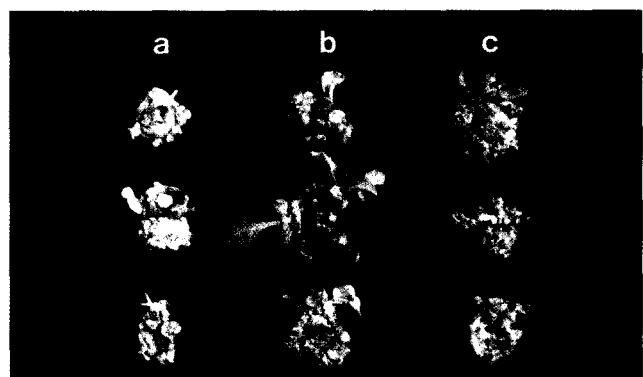


Figure 5. Shoot induction from tobacco leaf discs after cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens* EHA101. Leaf discs were cultured on MS medium containing 500 mg/L carbenicillin and different concentrations of BAP (a: 0.5 mg/L, b: 2.0 mg/L, c: 4.0 mg/L) for 5 weeks after preculture. *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 carrying a plasmid pGPTV-HB harboring hygromycin resistance (Hyg^R) and bialaphos resistance (Bar^R) genes.

acetyl transferase (Bar) 유전자를 포함하고 있으며 T-DNA 외부에 spectinomycin 저항성 유전자를 가지고 있다. *Agrobacterium tumefaciens*의 균주는 EHA101로 pGPTV-HB를 형질전환시켜 사용하였다. 형질전환은 Bac 등 (1994)과 Horsch 등 (1985)의 방법을 참고하여 채취한 잎절편을 BAP 0.25, 0.5, 2.0, 4.0 mg/L로 첨가한 MS 배지 상에서 24시간 동안 preculture 하였다. 이 잎절편을 *Agrobacterium*균으로 3분간 감염시킨 후 여과지에서 건조시켰다. 감염·건조시킨 시료는 preculture 배지 상에서 36시간 공조배양 하였다. 공조배양한 잎절편은 상기 여러 농도의 BAP와 500 mg/L carbenicillin을 각각 혼합첨가한 MS배지에 치상하여 배양 5주 후에 분화된 2 mm 이상 되는 신초수와 생중량을 조사하였다. 또한 제초제 저항성 유전자의 도입여부를 확인하기 위해서 재분화된 유식물체를 선발, bialaphos 20 mg/L가 포함된 MS 배지에 유식물체를 이식하여 식물체의 고사여부를 관찰하였다.

결과 및 고찰

Carbenicillin 농도에 따른 잎조직의 auxin 효과

생장조절제가 포함되지 않고 여러 농도의 carbenicillin만 첨가된 MS 기본배지에서 잎절편을 치상한 결과, carbenicillin이 첨가되지 않은 잎절편에서는 절단부위에서 뚜렷한 캘러스 형성이 관찰되지 않았으나 250 mg/L~1000 mg/L 농도가 첨가된 배지에서는 캘러스의 형성이 관찰되었다. 그러나, 2000 mg/L의 농도에서는 잎절편이 가벼운 갈변을 보였다 (Figure 2A). 또한 치상한 엽조직의 생중량은 carbenicillin의 농도가 250 mg/L, 500 mg/L일 때 각각 80.6 ± 2.3 mg, 71.3 ± 2.6 mg으로 무처리구의 50.7 ± 2.3 mg 보다 증가폭이 큰 반면, 1000 mg/L 이상의 고농도 처리구에서는 각각 56.1 ± 3.5 mg, 55.8 ± 2.2 mg으로 그 증가폭이 경미하였다 (Table 1). 이와같이 일정한 범위 농도에서 carbenicillin이 첨가된 배지에서 캘러스 형성이 관찰되는 것은 carbenicillin이 항생제 이외에 auxin 효과를 가지고 있다는 것을 보여준 것이며, 또한 2000 mg/L의 고농도에서 조직이 갈변되기 시작한 것은 고농도의 auxin 첨가에서 나타난 것과 유사하며 강한 항생제의 작용으로 조직세포에 피해를 준 것으로 보인다.

캘러스 증식에 대한 auxin류와 carbenicillin 농도별 혼합처리 효과

Carbenicillin이 미세하게 캘러스 형성을 촉진하였기 때문에 auxin과 혼용하여 캘러스 형성효과를 검토하였다. MS 배지에 0.5 mg/L 2,4-D 또는 0.5 mg/L NAA와 여러 농도의 carbenicillin을 첨가한 결과, 2,4-D 처리구에서는 250 mg/L,

Table 1. Effect of carbenicillin on fresh weight of tobacco leaf discs cultured on MS medium with and without 0.5 mg/L of 2,4-D or NAA.

Carbenicillin (mg/L)	Fresh weight/explant (mg) ^a		
	Hormone free	2,4-D	NAA
0	50.7 ± 2.3	163.4 ± 22.3	173.1 ± 17.0
250	80.6 ± 2.4	163.6 ± 23.4	114.2 ± 3.8
500	71.3 ± 2.6	142.0 ± 17.6	109.2 ± 8.5
1000	56.1 ± 3.5	99.3 ± 18.2	95.0 ± 6.0
2000	55.8 ± 2.2	72.7 ± 3.3	75.7 ± 3.1

^aFresh weight per explant was obtained as the average of explants from 10 tobacco leaf discs incubated on MS medium containing 2,4-D or NAA and different concentrations of carbenicillin for 4 weeks.

500 mg/L 농도까지 캘러스의 형성이 촉진되었으나 1000 mg/L 이상의 농도에서는 캘러스 형성이 감소하였다 (Figure 2B). NAA 처리구의 경우 carbenicillin 무첨가구에서는 솜털 모양의 뿌리에 캘러스가 부착되다가 250, 500 mg/L의 carbenicillin이 포함된 배지에서 뿌리는 없어지고 캘러스가 증가하는 경향을 보이다가 1000 mg/L 이상의 고농도에서는 오히려 캘러스의 형성이 억제되었다 (Figure 2C). 반면 생중량은 2,4-D 및 NAA 처리 모두에서 carbenicillin의 농도가 증가할수록 감소하여 형성된 캘러스 양의 증가와 생중량의 증가는 서로 일치하지는 않았다 (Table 1). 이와같이 carbenicillin은 배양중인 담배 조직에서 250 mg/L~500 mg/L 농도 범위에서는 캘러스 형성에 효과적이었으나 고농도의 carbenicillin은 캘러스 형성을 억제하였다. 이러한 캘러스 형성 억제작용은 조직배양시 고농도의 auxin 첨가가 캘러스 형성에 저해를 주는 것과 동시에 조직의 세포분열을 억제하는 작용과 일치하는 것으로 생각된다. 이와 유사한 연구결과는 밀 (Lin et al. 1995; Mathias and Boyd 1986)에서 보고되었다. 또한 250 mg/L 및 500 mg/L 농도의 carbenicillin 첨가 시, 생장조절제 무첨가 배지와 달리 2,4-D 또는 NAA를 첨가한 배지에서 대조구보다 생중량이 감소한 것 (Table 1)은 이미 0.5 mg/L의 auxin을 포함한 상태에서 carbenicillin의 영향이 첨가되어 고농도의 auxin을 첨가한 것과 비슷한 효과를 나타냈기 때문으로 추정된다. 특히 NAA를 첨가한 배지에서 감소폭이 큰 것은 생장조절제 간 탈분화 능력의 차이 및 carbenicillin 무첨가 배지에서 관찰된 부정근 발생이 억제된 것과도 관련이 있다고 볼 수 있다.

신초분화에 미치는 cytokinin류와 carbenicillin 농도별 혼합처리 효과

Carbenicillin과 cytokinin류가 혼합처리된 배지에서 신초 형성에 미치는 영향을 조사한 결과는 table 2와 figure 3과 같다. 배양 4주째 BAP가 포함된 배지에서 carbenicillin 농도에

Table 2. Effect of carbenicillin on shoot induction of tobacco leaf discs cultured on MS medium containing 0.5 mg/L BAP or kinetin.

Carbenicillin (mg/L)	No. of shoots/explant ^a	
	BAP	kinetin
0	15.5 ± 1.1	3.0 ± 0.4
250	6.7 ± 0.9	0.1 ± 0.1
500	4.4 ± 1.2	0
1000	0.7 ± 0.3	0
2000	0	0

^aNumber of shoots per explant was obtained as the average of the regenerated shoots over 2 mm in length from 10 tobacco leaf discs incubated on MS medium containing BAP or kinetin and different concentrations of carbenicillin for 4 weeks.

따른 신초형성을 보면, carbenicillin 농도가 250 mg/L 이상의 농도에서 신초 수가 급격하게 감소하여 1000 mg/L 이상 농도에서는 신초분화가 거의 관찰되지 않았다 (Table 2, Figure 3A). 또한 kinetin과 carbenicillin 혼합 처리구에 있어서도 carbenicillin 250 mg/L 이상 농도에서는 신초가 거의 형성되지 않았다 (Table 2, Figure 3B). 이러한 결과는 carbenicillin의 auxin 효과로 신초분화를 억제한 것으로 보이며, kinetin의 경우에는 그 효과가 더욱 민감하게 반영된 것으로 사료된다. 또한 실제 배양시에는 본 실험에서 사용한 0.5 mg/L kinetin 농도보다 높은 농도의 kinetin을 첨가하기 때문에 적절한 신초 수를 확보할 수 있다고 본다.

신초분화에 대한 carbenicillin과 BAP의 농도별 혼합 및 단독처리 효과

상기에서와 같이 carbenicillin이 신초분화를 억제하였으므로 실제 형질전환 후 재관과정에서 이용되고 있는 carbenicillin 농도인 500 mg/L에 BAP를 혼합 처리하여 형성된 신초수의 변화를 조사하였다. 그 결과 배양 4주째 형성된 신초수는 BAP 농도 전체에 걸쳐 carbenicillin 처리구에서 carbenicillin 무처리구보다 신초 수가 감소하였다 (Table 3,

Figure 4A, B). 또한 생중량도 BAP 0.1 mg/L 이하를 제외한 모든 처리구에서 carbenicillin 무처리구에 비해 처리구에서 낮았다 (Table 3).

이상의 결과에서 보는 바와 같이 carbenicillin이 포함된 배지의 조직은 auxin류 첨가배지에서 흔히 나타나는 현상인 캘러스 유도를 촉진하고 신초형성을 억제하는 효과를 가지고 있었다. 따라서, 서론에서 언급한 바와 같이 carbenicillin의 구조가 아세트산기의 측쇄에 페놀기 또는 벤질기를 가진 옥신 (각각 2,4-D 및 NAA)의 화학구조와 유사성을 가지고 (Holford and Newbury 1992; Lin et al. 1995; Nauerby et al. 1997) 있기 때문에, 본 연구의 담배 잎절편 배양에서도 균 제거를 위한 carbenicillin 항생제 첨가가 신초형성을 억제하고 캘러스 형성을 촉진하는 식물생장조절제 효과를 가진다는 것을 강력히 시사해준다.

Agrobacterium 감염조직으로부터 기관분화에 대한 carbenicillin과 BAP의 효과

Agrobacterium 감염조직으로부터 균을 제거하기 위하여 일반적으로 사용되고 있는 500 mg/L의 carbenicillin 처리가 배양조직에서 신초형성을 억제하는 auxin과 유사한 효과가 있다는 사실을 고려하여 식물체 재분화 조건을 조사하였다. 그 결과, 0.25~0.5 mg/L의 저농도의 BAP를 포함한 배지에서는 잎절편 당 신초의 분화가 2개 미만이었으나 2.0~4.0 mg/L의 고농도의 BAP를 포함한 배지에서는 5.4~6.7개로 3배 이상의 증가를 보였다. 그리고 잎절편의 생중량도 고농도의 BAP가 포함된 배지가 저농도의 배지에 비해 그 증가폭이 높았다 (Table 4, Figure 5). 이와같이 Agrobacterium 감염 후 조직에서 신초 수가 크게 감소한 것은 여과지 위에서 조직과 균의 공조배양, 감염시킨 조직의 건조와 같은 감염과정이 치상조직의 신초형성에 부정적인 영향을 미친 것으로 볼 수 있다. 또한 Agrobacterium 감염 후 신초가 유도된 조직을 bialaphos 20 mg/L 포함된 배지에서 1개월간 배양한 결과, 녹색을 나타낸 신초 수가 총 유도된 신초 수의 0.1%로 BAP 농

Table 3. Effect of BAP on the regeneration of shoots and fresh weight of tobacco leaf discs cultured on MS medium with and without 500 mg/L carbenicillin.

BAP (mg/L)	No. of shoots/explant ^a		Fresh weight/explant (mg) ^b	
	Carbenicillin free	Carbenicillin (500 mg/L)	Carbenicillin free	Carbenicillin (500 mg/L)
0	0	0	46.9 ± 2.5	61.5 ± 4.9
0.1	3.0 ± 0.5	0	159.5 ± 24.9	260.6 ± 9.2
0.25	6.3 ± 1.0	2.0 ± 0.4	626.3 ± 106.2	490.2 ± 77.9
0.5	11.6 ± 1.0	5.2 ± 0.5	1392.7 ± 119.4	1334.5 ± 84.8
1.0	16.0 ± 1.1	6.0 ± 0.6	1667.7 ± 128.9	1324.8 ± 88.0
2.0	19.1 ± 1.2	9.5 ± 1.4	1344.3 ± 54.6	1110.8 ± 93.4
4.0	30.6 ± 2.0	19.2 ± 1.9	1190.1 ± 81.8	1055.6 ± 54.0

^aNumber of shoots per explant was obtained as the average of the regeneration of shoots over 2 mm in length from 10 tobacco leaf discs incubated on MS medium with or without 500 mg/L carbenicillin and different concentrations of BAP for 4 weeks. ^bFresh weight per explant was obtained as the average of explants from 10 tobacco leaf discs.

Table 4. Number of shoot and fresh weight induced from tobacco leaf discs on different concentrations of BAP after cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens* EHA101^a.

BAP (mg/L)	No. of shoots/explant ^b	Fresh weight/explant (mg) ^c
0.25	0.5±0.1	408.9±14.1
0.5	1.9±0.3	593.9±32.0
2.0	5.4±0.4	1182.2±82.0
4.0	6.7±0.7	879.0±37.9

^aLeaf discs were cultured on MS medium containing different concentrations of BAP and 500 mg/L carbenicillin for 5 weeks. *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 carrying a plasmid pGPTV-HB harboring hygromycin resistance (Hyg^R) and bialaphos resistance (Bar^R) genes. ^bNumber of shoots per explant was obtained as the average of the regenerated shoots over 2 mm in length from 10 tobacco leaf discs. ^cFresh weight per explant was obtained as the average of explants from 10 tobacco leaf discs.

도에 따른 차이는 없었으나 녹색을 보인 절대적인 개체수는 3배 이상으로 관찰되었다 (자료 미제시). 이들 유식물체가 분자생물학적 방법을 통해 형질전환 식물체로 검증된 것은 아니지만 식물체의 재분화 비율이 높을수록 형질전환 식물체의 절대수도 증가할 것으로 기대된다. 이러한 결과를 참고로 한다면 *Agrobacterium* 감염 후 균 제거를 위해서 carbenicillin이 첨가된 배지에서 식물체를 재분화시킬 경우, 본 연구의 담배와 같이 기존의 재분화 조건으로 검토된 배양계의 성장조절제의 농도를 미리 검토함으로써 형질전환 후에도 다수의 신초 수를 확보할 수 있다고 판단된다.

이상의 결과를 종합해보면 *Agrobacterium tumefaciens*를 매개로 한 형질전환과정은 carbenicillin을 이용한 재분화과정에서 기존의 배양계에서의 최적 재분화 조건을 검토할 때 반드시 carbenicillin의 영향을 고려한 조건에서 최적의 재분화 조건을 검토하는 것이 형질전환체를 보다 효율적으로 얻을 수 있고, 담배 이외의 식물에 있어서도 이러한 검토는 반드시 필요하다고 본다.

적 요

*Agrobacterium tumefaciens*를 매개로 한 형질전환 과정에서 재분화제로 사용되고 있는 항생제인 carbenicillin이 담배 (*Nicotiana tabacum* L. cv. BY-4) 잎절편 배양 시 기관분화에 미치는 영향을 검토하였다. BAP와 kinetin을 각각 0.5 mg/L 첨가한 MS 배지에 250 mg/L ~ 2000 mg/L의 carbenicillin을 처리한 배지에서 신초 수는 크게 감소하였다. 또한 carbenicillin을 단독첨가하거나 0.5 mg/L의 2,4-D 또는 NAA와 혼합첨가한 MS 배지에서 250 mg/L ~ 500 mg/L 농도의 carbenicillin은 캘러스 형성을 증가시켰다. 반면 carbenicillin을 0.5 mg/L의 2,4-D, NAA와 각각 혼합첨가한 배지에서 배양 4주째 치상조직의 생중량은 carbenicillin의 농도가 250 mg/L에서 2000 mg/L로 높아질수록 감소하였다.

이러한 결과는 carbenicillin이 캘러스 형성을 촉진하고 신초 형성을 억제하는 auxin과 유사한 효과를 가지고 있다는 것을 시사해 준다. 따라서 담배 잎절편에 *Agrobacterium tumefaciens*를 매개로 형질전환하고자 할 때 최적 재분화용 식물성장조절제의 농도는 carbenicillin이 제균제뿐만 아니라 auxin 유사효과를 가지는 물질임을 고려하여 결정하여야 한다.

인용문헌

- Bae CH, Nou IS, Lim YP, Min KS, Kim DC, Kim HJ, Lee HY (1994) Transformation of maize controlling element Ac and Ds into *Amoracia rusticana* via *Agrobacterium tumefaciens*. *Kor J Plant Tiss Cult* 21: 319-325
- Colby SM, Meredith CP (1990) Kanamycin sensitivity of cultured tissues of *Vitis*. *Plant Cell Rep* 9: 237-240
- Holford P, Newbury HJ (1992) The effects of antibiotics and their breakdown products on the in-vitro growth of *Antirrhinum majus*. *Plant Cell Rep* 11: 93-96
- Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholtz D, Rogers S, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231
- Horsch RB, King J (1983) A covert contaminant of cultured plant cells: elimination of a *Hyphomicrobium* sp. from cultures of *Datura innoxia* (Mill.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 2: 21-28
- Lee HY, Lee CH, Kim HI, Han WD, Choi JE, Kim JH, Lim YP (1998) Development of bialaphos-resistant transgenic rice using *Agrobacterium tumefaciens*. *Kor J Plant Tiss Cult* 25: 282-288
- Lin JJ, Assad-Garcia N, Kuo J (1995) Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. *Plant Sci* 109: 171-177
- Mathias RJ, Boyd LA (1986) Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bred wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Sci* 46: 217-223
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nauerby B, Billing K, Wyndaele R (1997) Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci* 123: 169-177
- Park YD, Ronis DH, Boe AA, Cheng ZM (1995) Plant regeneration from leaf tissues of four North Dakota genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Am Potato J* 72: 329-338
- Patton DA, Meinke DW (1988) High-frequency of plant regeneration from cultured cotyledons of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 7: 233-237
- Pollock K, Barfield DG, Shields R (1983) The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant Cell Rep* 2: 36-39