

*Agrobacterium tumefaciens*에 의한 벼 형질전환에 미치는 품종과 Acetosyringone의 영향

권용삼* · 이효신 · 김경민 · 이병현 · 조진기 · 손재근
경북대학교 농과대학

Effects of Variety and Acetosyringone Influencing Transformation of Rice Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

KWON, Yong-Sham* · LEE, Hyo-Shin · KIM, Kyung-Min · LEE, Byung-Hyun · JO, Jin-Ki · SOHN, Jae-Keun
College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Koera

ABSTRACT The cytosolic glutathione reductase (GR) gene of *Brassica campestris* L. was introduced into several Japonica cultivars of rice by *Agrobacterium tumefaciens* and a large number of transgenic plants were produced. Three-week old calli were co-cultivated with *A. tumefaciens* strain EHA101 carrying the plasmid pIGR1. The efficiency of transformation was differed from rice cultivars. A Japonica cultivar, 'Daeribbyeol' appeared the highest efficiency (42.5%) of transformation among the four cultivars tested. The addition of acetosyringone (50 μ M) during co-cultivation was a key to successful transformation. Transgene fragments were identified by PCR amplification and further confirmed by Southern blot analysis. Mendelian inheritance of the transgenes was confirmed in T₁ progeny.

Key words : Acetosyringone, *Brassica campestris*, Cytosolic glutathione reductase

서론

우체, 콩, 땅콩, 토마토 등과 같은 쌍자엽 식물은 *Agrobacterium*을 이용하여 외래 유전자를 전이시키는 형질전환 기법이 확립되어 있기 때문에, 기존 육종 방법을 보완하는 수단으로 활용되어 새로운 품종을 육성하는 등 큰 연구성과를 얻고 있다. 그러나, 벼를 포함하여 밀, 보리, 옥수수 등과 같은 단자엽 식물은 *Agrobacterium*이 배양 조직부위에 감염이 되지 않기 때문에 microinjection, particle bombardment, silicon carbide whisker 등의 방법을 이용하여 아주 낮은 효율의 형질전환체를 얻는데 성공하였다 (Matsushita et al. 1999; Potrykus 1993). Microinjection 기법은 원형질체의 유

리와 재분화 과정이 단순하지 않을 뿐만 아니라 대상 품종도 아주 제한되어 있으며, particle bombardment 기법은 외래 DNA의 coating 과정이 복잡하고 가격 또한 매우 높기 때문에 그 이용 범위가 크게 제한되어 왔다 (Lal and Lal 1993). 최근에 단자엽 식물인 벼의 경우 *Agrobacterium*에 의한 형질전환 방법이 Hiei 등 (1994)과 Rashid 등 (1996)에 의해 보고되었지만 배양 조직으로부터 형질전환체를 얻기까지의 과정이 아주 복잡할 뿐만 아니라 육종가가 이용할만한 수준에는 크게 미달되고 있는 실정이다.

벼의 형질전환 과정에는 모품종의 genotype, 배양재료의 발육상태, 배지의 조성, *Agrobacterium*의 strain 등 여러 가지 요인이 관여하며 연구자에 따라서도 형질전환체의 획득효율은 상이한 것으로 보고되고 있다 (Hiei et al. 1997).

따라서 본 연구에서는 벼의 형질전환 효율을 향상시키기 위하여 형질전환 효율의 품종간 차이, 배지내에 첨가되는 acetosyringone (AS)의 적정 농도 등에 대한 몇 가지 실험을

* Corresponding author. Tel 053-950-5711
E-mail ys4654@naver.com

수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

식물재료 및 캘러스의 유지

본 실험에는 경북대학교 농과대학 농학과 실습포장에서 표준재배법으로 재배된 '금오벼', '대립벼', '간척벼', '낙동벼'의 수정후 21 일된 미숙배를 연구재료로 이용하였다. 공시품종의 미숙배의 외형과 내역을 편셋으로 절취하여 70%의 에틸알콜에 30초간 표면살균한 다음 1%의 sodium hypochlorite 용액에 30분간 살균한 다음 멸균수로 3회 수세하였다. 미숙배는 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, 5 g/L gelrite가 첨가된 N₆ 배지 (Chu et al. 1975)에 치상한 다음, 26°C, 암상태에서 4주 동안 캘러스를 유도하였다.

*Agrobacterium*의 배양과 형질전환

식물체 형질전환을 위한 binary vector는 T-DNA 내부에 선발표지로서 항생제 저항성 유전자인 hygromycin phosphotransferase (Hyg R) 유전자와 배추의 cytosolic glutathione reductase의 cDNA (BcGR1; Lee et al. 1998)를 포함하고 있는 pIGR1을 이용하였다 (Figure 2-1).

pIGR1으로 형질전환된 *Agrobacterium* EHA101을 AB배지 (Chilton et al. 1974)에 도말하여 28°C에서 3일 동안 배양한 다음, 50 µM의 acetosyringone (AS)이 첨가된 AA배지 (Toriyama and Hirata 1985)에 접종하여 48시간 동안 현탁배양하였다.

적정밀도 (10^7 cell/L)로 자란 *Agrobacterium*에 벼의 미숙배에서 유래된 캘러스를 3분 정도 감염시킨 다음, 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, 10 g/L glucose, 0 ~ 100 µM AS, 5 g/L gelrite가 첨가된 N₆ 배지에서 28°C에서 3일 동안 공동배양 하였다. 형질전환된 캘러스의 선발을 위하여 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, 500 mg/L carbenicillin, 40 mg/L hygromycin (Hyg), 5 g/L gelrite가 첨가된 N₆ 배지에서 3주 동안 명상상태에서 배양한 다음, 선발된 캘러스를 1 mg/L NAA, 5 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose, 500 mg/L carbenicillin, 40 mg/L Hyg, 5 g/L gelrite가 첨가된 N₆ 배지에서 재분화시켰다.

T₁ 세대의 hygromycin 저항성 검정

Hyg이 첨가된 배지에서 재분화된 건전한 식물체를 선발하여 순화시킨 후, 1999년 하계에 직경이 30 cm인 플라스틱 포트에 주당 1본씩 60개체를 이양하여 채종이 가능한 28개체의 종자를 수확하였다. 채종된 종자를 40 mg/L의 Hyg이 첨가된

N₆ 배지에 파종하여 배양 14일 후에 저항성 개체와 감수성 개체의 분리비를 χ^2 검정에 준하여 추정하였다.

Southern blot 분석

모품종과 형질전환체 (T₀)의 잎 2 g을 CTAB 방법 (Murray and Thompson 1980)에 준하여 genomic DNA를 분리하였다. DNA 3 µg을 제한효소 *Xba* I 과 *Sac* I 으로 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동한 다음, capillary transfer 방법으로 nylon membrane에 전이시켰다.

Membrane은 5×SSC, 5×Denhardt's solution, 0.1% SDS, 50 mM Na-Pi (pH 6.5), 0.1 mg/ml denatured salmon sperm DNA, 50% dextran sulfate가 첨가된 용액에서 3시간 (42°C) 동안 prehybridization 한 다음, [α -³²P]dCTP로 표식된 BcGR1 cDNA를 첨가하여 12시간 이상 hybridization 하였다. Membrane은 2×SSC, 0.1% SDS 용액 (50°C)에서 10분간, 그리고 0.2×SSC, 0.1% SDS 용액 (50°C)에서 1시간 동안 세정한 다음, -70°C에서 2~3일간 X-ray film (Kodak)에 노출시켰다.

PCR analysis

선발배지를 통하여 얻어진 식물체 내에 BcGR1 유전자가 존재하는지의 여부를 확인하기 위하여 polymerase chain reaction (PCR) 증폭을 수행하였다. PCR 증폭을 위하여 재분화된 식물체의 앞에서 분리한 DNA 2 ng을 template DNA로 이용하였으며, *Taq* DNA polymerase reaction buffer (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 1.5 mM MgCl₂; 0.01% gelatin; 0.1% Triton X-100)에 0.2 mM의 dNTP mix, 100 pmol의 sense 및 antisense primers, 그리고 2 units의 *Taq* DNA polymerase를 첨가하여 실시하였다. pIGR1의 35S promoter 단편의 특이적인 증폭을 위하여 sense primer (5'-TTCAACAAAGGGTAATATCCGG-3'; 22 mers)와 antisense primer (5'-CGAAGGATAGTGGGATTGTGC-3'; 21 mers)를 합성하여 사용하였으며, 이때 예상되는 증폭산물의 크기는 0.3 kbp였다. PCR 반응은 Personal Cycler (Biometra, Germany)에서 30 cycle을 실시하였으며, 1 cycle은 denaturation을 94°C에서 1분간, annealing을 55°C에서 1분간, 그리고 extension을 72°C에서 1분간으로 하여 수행하였다.

결과 및 고찰

Agrobacterium 을 이용한 벼의 형질전환 효율에 영향을 미치는 품종간 차이를 조사한 바 (Table 1), 캘러스 선발 배지에서 Hyg에 저항성을 갖는 캘러스 비율은 공시품종에 따

Table 1. Varietal difference of transformation efficiency in rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens* EHA101.

Cultivars	No. of calli co-cultivated (A)	No. of calli with HygR (%)	No. of transgenic plants (B)	B/A (%)
Keumobyeo	200	123 (61.5)	2	0.6
Nagdongbyeo	200	160 (80.0)	10	5.0
Daeribbyeo	200	187 (93.5)	85	42.5
Ipumbyeo	200	14 (7.25)	0	0.0

Table 2. Effect of acetosyringone on transformation efficiency of mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.

Acetosyringone concentration (μM)	No. of calli co-cultivated (A)	No. of calli with HygR (%)	No. of transgenic plants (B)	B/A (%)
0	300	10 (3.3)	0	0.0
50	300	250 (83.3)	123	41.0
100	300	200 (66.7)	30	10.0

*1 cultivar: Daeribbyeo.

리 61.5~93.5%까지 다양한 변이폭을 보였으며, 특히 '대립벼'가 93.5%로 가장 높게 나타났다. Hyg에 저항성을 갖는 클리스를 재분화 배지에 이식하였을 경우 '금오벼', '낙동벼', '일품벼'의 경우 각각 0.6%, 5.0%, 0%의 낮은 식물체 분화율을 나타내었으나 '대립벼'는 42.5%의 가장 높은 재분화율을 나타내었다.

Agrobacterium 을 이용한 벼의 형질전환에 있어서 공동배양 배지 내에 첨가되는 AS의 영향을 조사한 바 (Table 2), AS이 첨가되지 않은 배지에서는 형질전환체를 획득할 수 없었으나, 50 μM의 AS을 배지에 첨가하였을 경우 형질전환 효율이 41.4%로 가장 높게 나타났다. 그러나 AS의 농도가 증가될수록 형질전환 효율은 떨어지는 양상을 나타내었다. 따라서 단자엽 식물인 벼의 형질전환에 있어서 공동배양 배지 내에 첨가되는 AS의 적정 농도는 배양 효율에 아주 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다.

수경후 21일된 벼의 미숙배를 2 mg/L의 2,4-D가 첨가된 배지에 30일 동안 배양하여 유도된 캘러스를 (Figure 1-1), binary vector인 pIGR1을 가진 *Agrobacterium* EHA101과 공동배양하여 40 mg/L의 Hyg이 첨가된 배지에서 형질전환된 개체를 선별하고 (Figure 1-2, 3), 이들 식물체는 순화과정을 거쳐 포트에 이식하였다 (Figure 1-4). 그리고 T₁ 종자를 Hyg이 첨가된 배지에 배양하였을 때 저항성 개체와 감수성 개체가 분리됨을 확인할

수 있었다 (Figure 1-5).

재분화된 벼의 genome상에 pIGR1 construct가 정확히 도입되었는지 확인하기 위하여 PCR 증폭을 수행한 바, 형질전환된 식물체에서는 pIGR1 내의 35S promoter에 특이적인 0.3 kbp의 증폭산물을 확인하였으나, 대조구 식물체에서는 band의 증폭이 관찰되지 않았다 (Figure 2-2). 그리고 genomic DNA를 제한효소 *Xba* I과 *Sac* I으로 절단한 다음,

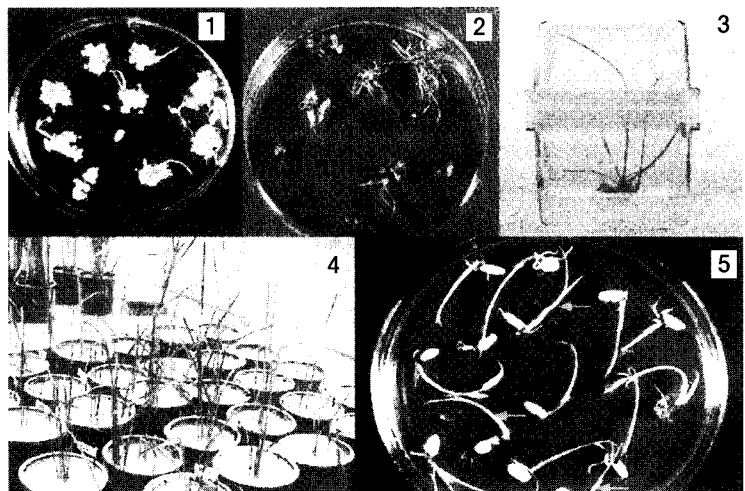


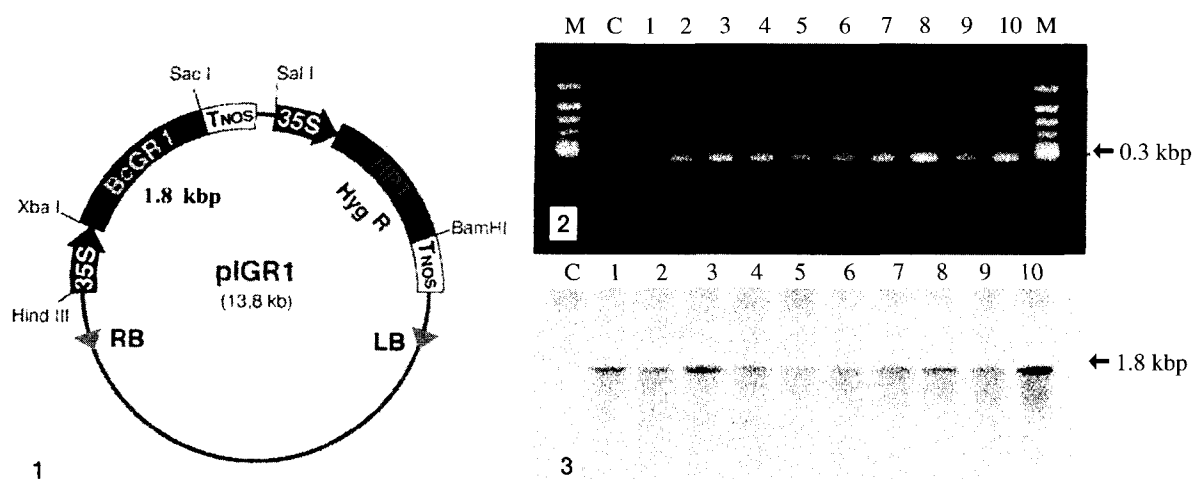
Figure 1. Production of transgenic plants in rice.

1. Calli derived from three-week-old scutellum.
- 2 and 3. Plant regeneration from medium with hygromycin.
4. Transgenic plants cultivated in pot for 10 weeks.
5. Hygromycin resistance and susceptibility (↓) in T₁ progenies of transgenic plant.

Table 3. Expression of HygR gene in selfed progeny (T₁) of transgenic rice cultivar, 'Daeribbyeo' and 'Nagdongbyeo'.

Lines	No. of T ₁ seedlings tested	No. of plants		Expected ratio	x ²	P
		HygR	HygS			
TF-1	400	312	88	3 : 1	0.166	0.50~0.20
-2	400	289	111	3 : 1	0.204	0.90~0.50
-3	400	322	78	3 : 1	0.011	>0.90
-4	400	291	109	3 : 1	0.299	0.90~0.50
-5	400	377	23	15 : 1	0.833	0.50~0.20
-6	400	301	99	3 : 1	0.908	0.50~0.20
-7	400	297	103	3 : 1	0.729	0.50~0.20
-8	400	317	83	3 : 1	0.050	0.90~0.50
-9	400	365	35	15 : 1	0.021	0.90~0.50
-10	400	378	22	15 : 1	0.674	0.50~0.20
-11	400	360	40	15 : 1	0.001	>0.90
-12	400	305	95	3 : 1	0.563	0.50~0.20
-13	400	299	101	3 : 1	0.908	0.50~0.20
-14	400	289	111	3 : 1	0.204	0.90~0.50
-15	400	389	11	15 : 1	0.006	>0.90
-16	400	377	23	15 : 1	0.833	0.50~0.20
-17	400	304	96	3 : 1	0.644	0.50~0.20
-18	400	312	88	3 : 1	0.166	0.90~0.50
-19	400	290	110	3 : 1	0.248	0.90~0.50
-20	400	313	87	3 : 1	0.133	0.90~0.50
-21	400	297	103	3 : 1	0.729	0.50~0.20
-22	400	310	90	3 : 1	0.248	0.90~0.50
-23	400	377	23	15 : 1	0.833	0.50~0.20
-24	400	374	26	15 : 1	0.674	0.50~0.20
-25	400	313	87	3 : 1	0.133	0.90~0.50
-26*	400	365	35	15 : 1	0.021	0.90~0.50
-27*	400	380	20	15 : 1	0.399	0.90~0.50
-28*	400	370	30	15 : 1	0.207	0.90~0.50

*Nagdongbyeo.

**Figure 2.** Transformation vector, PCR analysis, and Southern blot analysis.

1. Diagrammatic map of the pIGR1.
2. PCR analysis of rice regenerated after transformation (lane 1 ~ 10).
3. Southern hybridization of transgenic rice (lane 1 ~ 10).

Southern blot 분석을 실시한 결과, 1.8 kbp 크기의 BcGR1 cDNA의 존재를 확인하였다 (Figure 2-3).

PCR 증폭과 Southern blot 분석을 통하여 형질전환이 확인된 개체 가운데 T₀ 세대에서 채종이 가능하였던 28계통의 종자를 40 mg/L의 hyg이 첨가된 배지에 배양하여 저항성 정도를 조사한 바 (Table 3), '낙동벼'에서 재분화된 3계통과 '대립벼'에서 유래된 8계통은 저항성 개체와 감수성 개체가 15:1의 분리비를 나타내었으나, '대립벼'에서 유래된 25계통중 17계통이 3:1의 이론적 분리비에 적합하게 나타나 1 copy의 BcGR1 유전자가 삽입된 것으로 분석되었다.

Agrobacterium 기법을 이용한 벼의 형질 전환에는 배양에 사용되는 조직이나 모식물의 genotype, 공동배양 배지 내에 첨가되는 AS의 농도와 배지조성, *Agrobacterium*의 strain 등 여러 가지 요인이 관여하는 것으로 알려져 있다 (Hiei et al. 1997). 이들 요인중에서 모식물의 genotype에 따라 형질전환 효율이 상당한 차이를 보인다는 것이 대부분의 연구자의 공통된 견해이다. 벼의 경우 일반적으로 자포니카형 품종이 인디카형 품종보다 형질전환 효율이 높은 것으로 보고되고 있으며, 자포니카형 품종 내에서도 다양한 형질전환 효율의 차이를 보이는 것으로 알려져 있다 (Hiei et al. 1997). 본 연구에서도 자포니카형 벼 4품종을 대상으로 형질전환 효율의 품종간 차이는 0~41%까지 다양하게 나타났는데 (Table 1), 특히 '대립벼'의 경우 가장 높은 형질전환 효율을 나타내어 금후 이 품종은 형질전환 기법을 이용한 품종 육종에 매우 유용하게 이용되어질 수 있을 것으로 사료된다.

벼와 같은 단자엽 식물은 *Agrobacterium*이 감염될 때 쌍자엽 식물과 달리 Ti plasmid의 vir 유전자의 활성을 띄게 하는 펩톤 성분인 AS와 α -hydroxy-AS 같은 물질을 발산하지 않기 때문에 이러한 물질을 *Agrobacterium*의 배양이나 공동배양 배지에 첨가하는 것이 형질 전환에 필수적이라고 보고되고 있으며, 그 농도에 따라 형질전환 효율이 아주 상이한 것으로 알려져 있다 (Smith and Hood 1995). 벼의 경우 Hiei 등 (1994)은 자포니카형 벼의 형질전환에 있어서 공동배양 배지 내에 첨가되는 AS의 적정 농도는 100 μ M이 적합하다고 하였으며, Rashid 등 (1996)은 인디카형 벼인 'Basmati 70'의 형질전환에 있어서 *Agrobacterium*의 배양과 공동배양 배지 내에 50 μ M의 AS 첨가가 가장 높은 효율을 나타내었다고 하였다. 본 연구에서도 AS이 첨가되지 않은 배지에서는 형질전환된 개체를 얻을 수 없었으나, 50 μ M이 첨가된 배지에서 41%의 높은 형질전환 효율을 나타내어 (Table 2), Rashid 등 (1996)의 연구와 AS의 농도면에서 일치하는 경향이 있었다.

외래 유전자를 형질전환 기법을 이용하여 도입시켰을 때, 핵 내에 1개의 유전자가 삽입되어 3:1의 멘델의 이론적 분리비에 적합하게 나타나는 경우도 있으나, 2개 이상의 유전자가 삽입되는 경우도 여러 연구자에 의해 보고되고 있다 (Christou 1997; Hiei et al. 1997). 본 연구에서도 T₀세대에서

채종이 가능하였던 28계통을 대상으로 Hyg 저항성을 조사한 바 (Table 3), 17개의 계통이 한 개의 유전자가 삽입된 것으로 나타났으나, 11개의 계통은 15:1의 분리비를 나타내어 멘델의 이론적 유전 분리비에 적합하지 않게 나타났는데 이는 외래 DNA의 삽입으로 인한 genomic DNA의 rearrangement로 나타난 결과라고 추정되나 그 원인에 대해서 좀더 깊이 있는 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과를 종합해보면 *Agrobacterium*을 이용한 벼의 형질전환 과정은 다른 작물보다 매우 복잡하고 식물체 재분화 과정이 매우 길기 때문에 앞으로 이를 단순화 할 필요가 있을 것으로 사료된다. 만약, 재분화된 식물체를 짧은 기간에 얻을 수 있다면 모품종과 다른 변이체의 출현 빈도도 크게 줄일 수 있어 육종효율 향상에 크게 기여할 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서 도입한 배추의 BcGR1 유전자는 NADPH 존재에서 산화형 glutathione (GSSG)을 환원형 glutathione (GSH)로 변환시키는 유전자로 식물세포 내에서 활성 산소종의 해독에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Lee et al. 1998). 따라서 본 연구에서 얻어진 형질전환체를 이용하여 도입된 BcGR1 유전자의 발현이 최근 산업화에 따른 환경의 파괴로 그 발생빈도가 급증하고 있는 오존을 포함한 환경 스트레스에 미치는 영향 등에 관한 연구가 수행되어야 될 것으로 생각된다.

적 요

배추에서 분리된 cytosolic glutathione reductase (BcGR1) 유전자를 벼에 효과적으로 도입하기 위하여 몇 가지 실험을 수행하여 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다. 수정 후 3주된 미숙배에서 유도된 캘러스를 이용하여 형질전환 효율의 품종간 차이를 조사한 바 '대립벼'가 42.5%로 가장 높게 나타났다. 공동배양 배지 내에 acetosyringone (AS)이 첨가되지 않았을 경우 형질전환된 개체를 얻을 수 없었으나, 50 μ M을 첨가되었을 때 41.0%의 가장 높은 형질전환효율을 나타내었다. PCR 증폭과 Southern blot 분석을 실시한바 BcGR1 유전자가 형질전환체의 게놈상에 정상적으로 삽입된 것이 확인되었으며, T₁ 세대 28계통 중 17개체의 hygromycin 저항성 유전형질이 3:1로 분리되었다.

인용문헌

- Chilton MD, Currier TC, Farrand SK, Bendich AJ, Gordon MP, Nester EW (1974) *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. Proc Natl Acad Sci USA 71:3672-3676
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY (1975)

- Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sinica* **18**:659-668
- Christou P** (1997) Rice transformation : bombardment, *Plant Molecular Biology* **35**:197-203.
- Hiei Y, Komari T, Kubo T** (1997) Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Molecular Biology* **35**:205-218
- Hiei Y, Ohta S, Kumashiri T** (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA, *Plant J* **6**:271-282
- Lal R, Lal S** (1993) Gene transfer methods for crop improvement. In : Lal R Lal S (eds), *Genetic engineering of plants for crop improvement*, CRC Press, Boca Raton, pp 1-48
- Lee HS, Jo JK, Son DY** (1998) Molecular cloning and characterization of the gene encoding glutathione reductase in *Brassica campestris*. *Biochem Biophys Acta* **1395**:309-314
- Matsushida J, Otani M, Wakita Y, Tanaka O, Shimada T** (1999) Transgenic plant regeneration through silicon carbide whisker-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.), *Breeding Sci* **49**:21-26
- Murray MG, Thompson WF** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucleic Acids Res* **8**:4321-4325
- Potrykus I** (1993) Gene transfer to plants : approaches and available techniques. In : Hayward MD, Bosemark NO, Romagosa (eds), *Plant Breeding*, Chapman & Hall, London, pp 126-136
- Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, Hinata K** (1996) Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in indica rice, *Plant Cell Rep* **15**:727-730
- Smith RH, Hood EE** (1995) Review and interpretation : *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons, *Crop Sci* 301-309
- Toriyama K, Hirata K** (1985) Cell suspension and protoplast culture in rice, *Plant Sci* **41**:179-183

(접수일자 2000년 1월 17일)