

# 수술특이프로모터와 디프테리아 독성 유전자에 의한 옹성불임 형질전환체의 후대 유전분석

박영두\* · 김현욱<sup>1</sup> · 박범석<sup>1</sup> · 진용문<sup>1</sup>

경희대학교 원예학과, <sup>1</sup>농업과학기술원 생물자원부 세포유전과

## Inheritance Study of Male Sterile Transformants Containing Pollen-specific Promoter and Diphtheria Toxin A Gene

Young-Doo Park, Hyun-Uk Kim<sup>1</sup>, Beom-Seok Park<sup>1</sup>, and Yong-Moon Jin<sup>1</sup>

Department of Horticulture, KyungHee University, Suwon 449-701, Korea

<sup>1</sup>Cytogenetics Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea

\*corresponding author

**ABSTRACT** The objectives of this study were to investigate the genetic and phenotypic features of male sterile transformants by pollen-specific expression of diphtheria toxin gene and to find out inheritance patterns of transgene to the next generation. When backcrossed (BC) progenies were tested for expression of kanamycin resistance ( $Km^R$ ), 9 lines out of 13 lines, except 4 lines (BC<sub>1</sub>5-13, BC<sub>1</sub>5-23, BC<sub>1</sub>5-28, BC<sub>1</sub>5-32), showed the ratio of  $Km^R$  to kanamycin sensitive ( $Km^S$ ), from 1:30 to all  $Km^S$ . As a result, they were much lower than Mendelian segregation of a dominant gene. To determine whether male sterility is a heritable and stable trait, 5 male sterile plants (BC<sub>1</sub>5-13, BC<sub>1</sub>5-14, BC<sub>1</sub>5-23, BC<sub>1</sub>5-32, BC<sub>1</sub>5-33 lines) which had different transgene copy numbers were backcrossed as female parents with pollens from wild type. To confirm the existence of the DTx-A gene in the genome of the progenies, PCR was conducted using specific primers of the DTx-A coding region. A PCR band of 428 bp was obtained from each generation, which is the predicted size of the DTx-A gene fragment. Transgenes were inherited to the next BC<sub>4</sub>T<sub>0</sub> progenies and showed male sterility, however, based on the copy numbers of DTx-A gene male sterile plants did not show predicted ratio. When male sterile plants were backcrossed with fertile plants, fruit capsule sizes and seed settings were relatively reduced from those of selfing wild type plants. The fruit sizes and seed settings were reduced in proportion to the increase in the copy number of DTx-A gene.

**Additional key words:** backcross, kanamycin test, PCR, transgene

### 서 언

잡종강세 현상을 나타내는 일대잡종종자의 생산체계에서는 자가 수분을 방지하기 위하여 자가불화합성을 이용하거나 유전적인 결합으로 옹성생식기관의 기능이 상실된 경우를 제외하면 인위적으로 옹성기관을 제거하여야 된다. 일반적으로 세포질적옹성불임성(CMS)은 벼, 밀, 옥수수, 양파, 당근, 고추, 해바라기 등의 잡종종자 채종에 널리 이용되고 있는데 이 CMS를 효율적으로 이용하기 위해서는 채종체계의 확립이 요구된다. CMS를 이용하는 1대잡종종자생산체계에는 세포질적옹성불임계통(CMS line) 및 세포질옹성불임을 유지하기 위한 유지친(maintainer)이 필요하다. CMS를 이용하여 생산되는 잡종종자는 옹성불임이 될 것으로 예상되는 바,

담배, 배추 등 영양기관을 이용하는 작물은 별 문제가 없으나 벼, 옥수수, 해바라기 등과 같이 종자를 이용하는 작물은 임성회복을 위하여 임성회복친(restorer)도 필요하다. 실제로 세포질적옹성불임을 아직 여러 작물에서 발견하지 못하였거나 세포질적옹성불임이 있어도 임성회복유전자를 아직 찾지 못한 경우가 많으며 이 두 가지 유전자가 있어도 유지친과 임성회복친을 선발, 이용하는 데는 어려움이 있어 그 이용성에 제한이 있다. 옹성불임을 임의로 조절할 수 있는 방법이 있다면 앞에서 언급한 여러가지 문제점을 해결할 수 있을 것으로 생각되며 Mariani(1990, 1992)는 담배 수술의 tapetum(옹단조직)에서 특이하게 발견되는 유전자 프로모터와 RNase 유전자(barnase)를 이용, 형질전환하여 담배와 유채로부터 옹성불임 식물체를 유기하고 동일한 프로모터와 RNase inhibitor

유전자(barstar)를 이용, 형질전환한 식물체와 교배함으로써 임성을 회복시킬 수 있었음을 보고한 바 있다.

본 실험은 유전자의 조직 특이적인 발현을 이용하여 유기된 음성 불임 형질전환체들의 유전적 특성과 표현형의 특징, 후대유전양상 및 전이유전자의 안정성을 검증함으로써 유전자의 조직특이적 발현 현상을 실제로 작물육종에 이용할 수 있는 가를 검토하기 위하여 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 음성불임유기를 위한 pBPE5 제작

배추(*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*)로부터 수술특이 promoter를 분리하여 pBPE construct(Kim 등, 1997)를 제작하고 이로부터 383bp 크기의 promoter 지역을 diphtheria toxin A-chain (DTx-A) 유전자와 cassette로 식물형질전환용 binary vector, pGA987(Czako와 An, 1991)에 삽입하였다. 음성불임유기를 위하여 제작된 chimeric construct, pBPE5(Fig. 1)는 식물형질전환을 위하여 freeze-thaw 방법(An 등, 1988)으로 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404에 삽입하였다.

### 음성불임 개체의 획득

담배(*Nicotiana tabacum* HAVANA SR1) 잎 절편을 음성불임 유기유전자 pBPE5를 운반하는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 균주 용액에 약 10초간 접촉한 후,  $1.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 benzyladeninepurine(BA)을 첨가한 MS 고체배지에 치상하여  $25^\circ\text{C}$ 에서 3일간 공조배양하였다. 공조배양 후  $1.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BAP,  $200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  cefatoxime과  $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  kanamycin을 첨가한 MS 선발배지에 치상하여  $25^\circ\text{C}$ , 18L/6D 조건에서 배양하여 형질전환된 신초를 유기하였다. 유기된 신초는  $200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  cefatoxime과  $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  kanamycin이 첨가된 MS 뿌리 유기배지에 이식하여 뿌리 형성을 유도하였으며, 뿌리가 형성된 형질전환 담배를 포트에 이식하여 순화시킨 다음 온실에서 재배하였다.

### 형질전환된 담배의 후대검정

형질전환체 T<sub>0</sub>로부터 wild type과 여교잡된 BC<sub>1</sub>T<sub>0</sub>(자손 1세대)와 자가수분된 R<sub>1</sub>의 종자를 수확한 후 kanamycin  $200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 이

첨가된 MS 기본배지에서 kanamycin 저항성 검정을 수행하였다. 또한 BC<sub>1</sub>T<sub>0</sub>로부터 여교잡하여 BC<sub>2</sub>T<sub>0</sub>를 선발하였으며 같은 방법으로 BC<sub>3</sub>T<sub>0</sub>, BC<sub>4</sub>T<sub>0</sub>도 선발하여 kanamycin 저항성 검정을 하였다. BC<sub>3</sub>T<sub>0</sub>세대까지는 단주선발을 하였으나 BC<sub>4</sub>T<sub>0</sub>세대에서는 각 조합 내의 여러 개체들의 종자들을 각각 검정하였다.

### DNA 분리

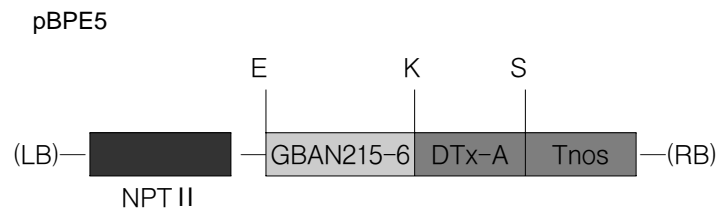
DNA분리는 Dellaporata 등(1983)의 방법을 변형하여 사용하였다. 시료 2g을 액체 질소에 넣어 마쇄한 후, 15mL DNA 추출 용액 [100mM Tris-HCl(pH8.0), 50mM EDTA(pH8.0), 500mM NaCl, 10mM β-mercaptoethanol]을 첨가하여 혼합하였다. 여기에 1mL의 20% SDS를 첨가하여  $65^\circ\text{C}$ 에서 10분간 가온하고 5mL의 5M potassium acetate를 첨가하였다. 다음 단계로 얼음에 20분간 두었다가 15,000rpm으로 20분간 원심분리한 후 상등액을 수거하여 10mL의 isopropanol을 첨가하고  $-20^\circ\text{C}$ 에서 30분간 처리하였다. 그후  $4^\circ\text{C}$ 에서 10,000rpm으로 10분간 원심분리하여 침전된 DNA를 1mL의 50mM Tris-HCl(pH8.0), 10mM EDTA에 녹여 다시 10분간 원심분리하여 녹지 않은 polysaccharide를 제거하고 RNase A를 처리한 다음 phenol/chloroform 추출을 수회 반복하여 DNA를 정제하였다.

### PCR(Polymerase chain reaction)

PCR은 *Taq* polymerase를 사용하여  $95^\circ\text{C}$ 에서 5분/1회,  $95^\circ\text{C}$ 에서 1분- $55^\circ\text{C}$ 에서 2분- $72^\circ\text{C}$ 에서 1분/40회,  $72^\circ\text{C}$ 에서 10분/1회의 조건에서 실시하였으며 형질전환체의 genomic DNA를 template로 사용하였다.

## 결과 및 고찰

Kim(1995)이 제작한 BAN215 프로모터와 DTx-A 유전자를 이용하여 음성불임 담배를 유기하고 각 음성불임체의 유전적 특성 및 표현형의 특징을 조사하여 기초 자료를 확보하는 동시에 적당한 음성불임 계통을 선발하였다(Kim 등, 1997). 형질전환으로 유기된 음성불임 담배는 음성불임 정도에 따라 자가수분이 되지 않기 때문에 wild type의 정상 화분에 의한 인공수정이 필요한 것들과 부분적으로 자가수분이 되는 것들로 구분할 수 있었으며 각각의 형질전



**Fig. 1.** Construct of a chimeric gene used in this work. The chimeric pBPE5 was constructed by fusing the 383 bp GBAN215-6 promoter with the coding region of the A chain of diphtheria toxin gene (DTx-A). The NPTII gene was included as a selectable marker. Restriction sites are abbreviated as follows: E, *EcoRI*; K, *KpnI*; S, *SacI*

**Table 1.** Segregation of kanamycin resistance in progenies from back-crossing between male sterile transformants ( $\sigma$ ) transformed with pBPE5 (*nptII/GBAN215-6/DTx-A*) and wild type plants ( $\delta$ ).

Plant line	Copy number <sup>z</sup>	Germination ratio	Segregation of Km <sup>R</sup>
			Kan <sup>Rx</sup> : Kan <sup>Sw</sup> (Ratio)
5-3	≥2	61 / 63	2 : 59 (1 : 30)
5-4	≥2	73 / 73	2 : 71 (1 : 35)
5-10	≥6	52 / 54	0 : 52 (0 : 52)
5-13	1	74 / 74	12 : 62 (1 : 5)
5-14	≥2	62 / 62	1 : 61 (1 : 61)
5-18	1	ND <sup>y</sup>	ND
5-21	1	ND	ND
5-23	≥2	69 / 71	1 : 68 (1 : 68)
5-24	≥4	99 / 100	2 : 97 (1 : 49)
5-25	ND	99 / 100	2 : 97 (1 : 49)
5-28	ND	85 / 92	8 : 77 (1 : 10)
5-32	≥2	67 / 69	3 : 64 (1 : 16)
5-33	1	62 / 62	17 : 45 (1 : 3)

<sup>z</sup>Copy number of DTx-A gene was determined by Southern blot analysis.

<sup>y</sup>Not determined.

<sup>x</sup>Kanamycin resistance.

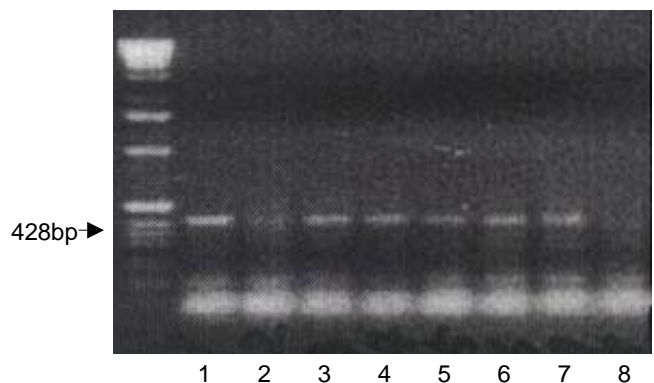
<sup>w</sup>Kanamycin sensitive.

환체 T<sub>0</sub>로부터 wild type과 여교잡된 BC<sub>1</sub>과 자가수분된 R<sub>1</sub>의 종자를 수확하였다. 각 계통의 BC<sub>1</sub> 종자의 발아 및 kanamycin 저항성 검정을 MS 기본배지에 300mg · L<sup>-1</sup>의 kanamycin이 첨가된 배지에서 수행하였다(Table 1). 조사된 13계통 중 BC<sub>1</sub>5-13, BC<sub>1</sub>5-23, BC<sub>1</sub>5-28과 BC<sub>1</sub>5-32의 4계통을 제외한 나머지, 즉 BC<sub>1</sub>5-10을 비롯한 9계통의 kanamycin 저항성 개체(Kan<sup>R</sup>) 대 kanamycin 감수성 개체(Kan<sup>S</sup>)의 비율은 1 : 30-0 : all로 나타났다. 또한 이 Kan<sup>R</sup> 비율이 낮은 9계통은 2 copy 이상의 DTx-A 유전자를 가지고 있음이 밝혀졌다(Kim, 1995). 그러나 이 결과는 화분 특이 BAN215 프로모터에 의한 형질전환체의 도입유전자 copy 수에서 예상되는 Mendel 법칙의 우성유전자의 유전 비율에는 부합되지 않았다. BAN215 프로모터에 의해서 DTx-A 유전자가 오직 화분에서만 발현되어 화분이 기능을 잃게 되면(정상적으로 형질전환되었을 때의 NPTII 유전자의 수는 DTx-A 유전자의 수와 같기 때문에) NPTII 유전자의 수가 n일 때 Kan<sup>R</sup>/Kan<sup>S</sup>의 비율은 2<sup>n</sup>-1/1이 되어야 된다. 한편 응성불임을 보이지 않는 개체들을 자가수분한 각 R<sub>1</sub> 종자의 발아 및 kanamycin 저항성을 검정한 결과(Park, 1995), R<sub>1</sub>5-6을 제외한 나머지의 Kan<sup>R</sup>/Kan<sup>S</sup>의 비율은 예상 비율에 부합되어 1:1이 4계통, 3:1이 9계통 그리고 7:1이 1계통으로 나타났다.

형질전환된 응성불임 개체에 존재하는 DTx-A 유전자가 후대로 안정적으로 전이되는지 또한 응성불임 상태가 그대로 유지되는지를 확인하기 위하여 완전응성불임개체중 전이유전자의 copy 수가 다른 5개체(5-13, 5-14, 5-23, 5-32, 5-33)를 선발하고 여교잡을 실시하였다. 여교잡으로부터 얻어진 BC<sub>2</sub>T<sub>0</sub>세대부터 BC<sub>4</sub>T<sub>0</sub>세대의

종자를 이용하여 PCR과 kanamycin 저항성 검정을 통하여 copy 수에 따른 분리비와 이의 안정적인 전달을 확인하였다. PCR은 *Taq* polymerase를 사용하여 95℃에서 5분/1회, 95℃에서 1분-55℃에서 2분-72℃에서 1분/40회, 72℃에서 10분/1회의 조건에서 실시하였으며 형질전환체의 genomic DNA를 template로 사용하였다. Genomic상의 DTx-A 유전자를 PCR로 확인하기 위하여 DTx-A 유전자의 A-chain 시작 codon에서 46nt부터 63nt까지의 primer DT1 5'-AACTTTTCTTCGTACCAC-3'(18mer)와 473nt부터 456nt까지의 반대 방향 primer DT2 5'-GCTTTCGCCTGT TCCCAG-3'(18mer)를 이용하였다. 각 세대로부터 이 primer들을 사용하여 얻은 PCR 산물인 428bp 크기의 밴드를 확인할 수 있었으며 응성불임 정도도 계속 유지되는 것으로 나타나 안정적으로 유지되고 있는 것을 알 수 있었다(Fig. 2).

각 응성불임개체들의 후대들은 온실에서 재배한 후 꽃가루의 변화를 확인하고 자연적인 회복이나 유전자의 기능이 상실됨으로써 오는 회복가능성을 확인하였다. 그 결과 완전응성불임개체로부터의 후대들 역시 완전응성불임을 보이고 전이유전자가 후대 4대까지도(BC<sub>4</sub>T<sub>0</sub>) 그 기능을 유지하면서 안정적으로 전달되는 것으로 나타났다(Table 2, 3). 그러나 BC<sub>2</sub>T<sub>0</sub>부터 BC<sub>3</sub>T<sub>0</sub>까지의 각 후대에서의 결과는 BC<sub>1</sub>T<sub>0</sub>의 경우와 같이 화분 특이 BAN215 프로모터에 의한 형질전환체의 전이유전자 copy 수에서 예상되는 Kan<sup>R</sup>/Kan<sup>S</sup> 비율에 모두 다 부합되지는 않았다. 먼저 1 copy를 가지고 있는 경우 즉 5-13이나 5-33 개체의 후대에서는 1:5 혹은 1:3의 비율을 유지하였고 세대가 진전되어도 예상되는 비율에는 부합되지 않으나 어느 정도 세대별로는 일정한 비율을 유지하였다(Table 2). 또한 2 copy 이상을 가지고 있는 나머지 2개체(5-23과 5-32)의 후대에서는 각 세대에서 각각 다른 비율을 보였고 특히 3 copy 이상 되는 5-14의 후대에서는 각 세대에서 그 비율이 큰 차이를 보였다. 이와 같은 결과는 BC<sub>4</sub>T<sub>0</sub> 세대에서도 볼 수 있었는데 BC<sub>4</sub>T<sub>0</sub> 경우 각 개체에서 수



**Fig. 2.** Detection of DTx-A gene in progenies of transgenic plants by PCR. Two synthetic primers, 5'-AACTTTTCTTCGTACCAC-3' and 5'-GCTTTCGCCTGT TCCCAG-3', from the sequence of DTx-A gene were used for PCR. The expected size of DTx-A (428 bp) of PCR products were appeared. 1: BC<sub>2</sub>T<sub>0</sub> 5-13; 2: BC<sub>3</sub>T<sub>0</sub> 5-13; 3: BC<sub>4</sub>T<sub>0</sub> 5-13-1; 4: BC<sub>2</sub>T<sub>0</sub> 5-33; 5: BC<sub>3</sub>T<sub>0</sub> 5-33; 6: BC<sub>4</sub>T<sub>0</sub> 5-33-1; 7: BC<sub>2</sub>T<sub>0</sub> 5-14; 8: SR1 (negative control).

**Table 2.** Segregation of kanamycin resistance from BC<sub>1</sub>T<sub>0</sub> to BC<sub>3</sub>T<sub>0</sub> progenies of back-crossing between male sterile transformants (♀) and wild type plants (♂).

Transgenic plant	Copy no. <sup>z</sup>	BC <sub>1</sub> T <sub>0</sub>		BC <sub>2</sub> T <sub>0</sub>		BC <sub>3</sub> T <sub>0</sub>	
		Kan <sup>Ry</sup> : Kan <sup>Sx</sup>	R : S	Kan <sup>R</sup> : Kan <sup>S</sup>	R : S	Kan <sup>R</sup> : Kan <sup>S</sup>	R : S
5-13	1	12 : 62	1 : 5	96 : 542	1 : 6	217 : 1222	1 : 6
5-14	≥3	1 : 61	1 : 61	66 : 1275	1 : 19	47 : 1218	1 : 26
5-23	≥2	1 : 68	1 : 68	92 : 1028	1 : 11	125 : 1229	1 : 10
5-32	≥2	3 : 64	1 : 16	151 : 1024	1 : 7	146 : 1333	1 : 9
5-33	1	17 : 45	1 : 3	296 : 863	1 : 3	314 : 1067	1 : 3

<sup>z</sup>Copy number of DTx-A gene was determined by southern blot analysis.

<sup>y</sup>Kanamycin resistance.

<sup>x</sup>Kanamycin sensitive.

**Table 3.** Segregation of kanamycin resistance of BC<sub>4</sub>T<sub>0</sub> progenies of back-crossing between male sterile transformants (♀) and wild type plants (♂).

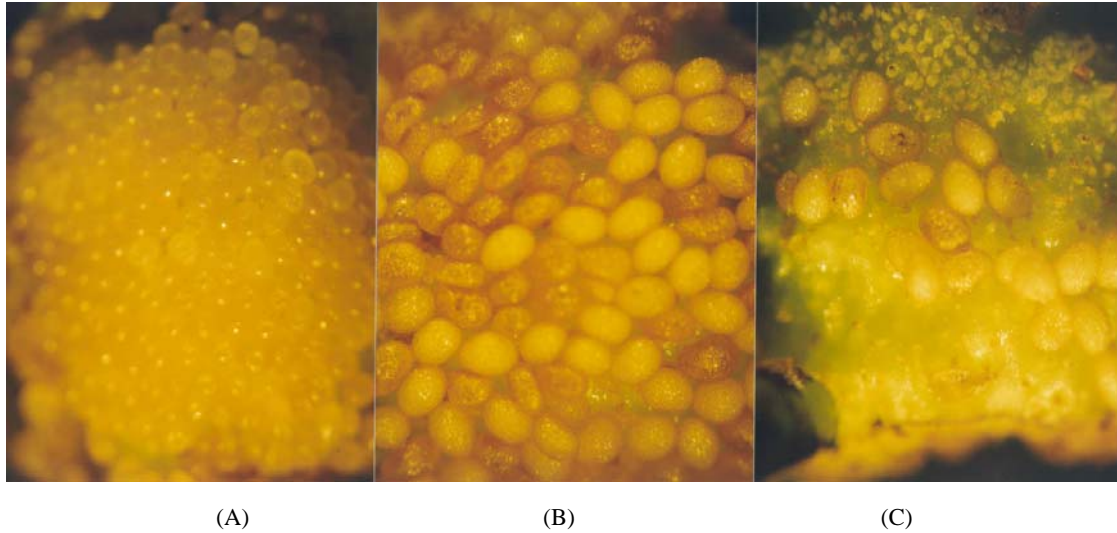
Plant no.	Kan <sup>Rz</sup> : Kan <sup>Sy</sup>	Ratio (R : S)	Plant no.	Kan <sup>R</sup> : Kan <sup>S</sup>	Ratio (R : S)	Plant no.	Kan <sup>R</sup> : Kan <sup>S</sup>	Ratio (R : S)
13-1	28 : 277	1 : 10	23-1	4 : 80	1 : 20	33-1	70 : 274	1 : 4
2	25 : 296	1 : 12	2	4 : 76	1 : 19	2	42 : 259	1 : 6
3	18 : 267	1 : 15	3	7 : 153	1 : 22	3	97 : 268	1 : 3
4	32 : 272	1 : 9	4	15 : 234	1 : 16	4	64 : 346	1 : 5
5	37 : 278	1 : 8	5	14 : 298	1 : 21	5	62 : 344	1 : 6
6	19 : 301	1 : 16	6	15 : 305	1 : 20	6	62 : 245	1 : 4
7	34 : 305	1 : 9	7	21 : 301	1 : 14	7	77 : 93	1 : 1
8	19 : 141	1 : 7	8	12 : 228	1 : 19	8	125 : 184	1 : 1
9	15 : 225	1 : 15	9	7 : 73	1 : 10	9	117 : 213	1 : 2
10	26 : 292	1 : 11	10	13 : 307	1 : 24	10	45 : 125	1 : 3
11	35 : 286	1 : 8	11	9 : 311	1 : 35	11	120 : 250	1 : 2
12	13 : 227	1 : 17	12	11 : 310	1 : 28	12	143 : 225	1 : 2
13	16 : 222	1 : 14	13	17 : 303	1 : 18	13	106 : 167	1 : 2
14	24 : 296	1 : 12				14	114 : 207	1 : 2
15	27 : 283	1 : 10				15	10 : 74	1 : 7
						16	77 : 204	1 : 3
14-1	5 : 307	1 : 61	32-1	15 : 145	1 : 10	17	115 : 263	1 : 2
2	2 : 320	1 : 160	2	20 : 220	1 : 11	18	107 : 252	1 : 2
3	4 : 316	1 : 79	3	12 : 148	1 : 12	19	101 : 267	1 : 3
4	1 : 143	1 : 143	4	38 : 281	1 : 7	20	19 : 66	1 : 3
5	3 : 317	1 : 106	5	23 : 238	1 : 10	21	58 : 105	1 : 2
			6	25 : 294	1 : 12	22	60 : 112	1 : 2
			7	6 : 74	1 : 12	23	167 : 272	1 : 2
			8	28 : 292	1 : 10	24	147 : 282	1 : 2
			9	10 : 70	1 : 7	25	113 : 272	1 : 2
			10	17 : 223	1 : 13	26	135 : 231	1 : 2
						27	72 : 126	1 : 2
						28	94 : 188	1 : 2
						29	140 : 220	1 : 2
						30	144 : 267	1 : 2

<sup>z</sup>Kanamycin resistance.

<sup>y</sup>Kanamycin sensitive.

확된 한 꼬투리내의 여러 종자들을 각각 여교잡하여 얻은 여러 개체들을 조사하였다. 그 결과도 역시 copy수에 따라 후대들이 일정한 비율을 유지하거나 혹은 큰 차이를 보였다. 결론적으로 각 후대 개체들은 전이유전자를 후대에 안정적으로 전달하고 전달받은 후대들은 음성불임성을 그대로 유지하였으나 그 비율은 각 세대에 전이된 DTx-A 유전자의 copy수에 따라 차이를 보이거나 또는 같은 음성

불임체내의 후대들 사이에서도 차이를 보이는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 DTx-A 유전자가 기능을 보이는 target 조직의 범위 (Pappenheimer, 1997) 즉 수술특이 프로모터, GBAN215-6이 형질 전환 담배의 genome내에 복수로 존재하면 화분에서뿐만 아니라 수술의 일부 다른 조직에서도 발현됨으로써 나타나는 것으로 추정할 수 있다(Kim 등, 1997). 비슷한 결과는 벼의 화분특이유전자(PS1)



**Fig. 3.** Difference of seed settings between wilde-type and male sterile tobacco plants after cross-fertilization.  
 (A) Ovule from male sterile plants at 5 days after fertilization.  
 (B) Ovule from wild type plants at 20 days after fertilization.  
 (C) Ovule from male sterile plants at 20 days after fertilization.

에 의해 조절되는 RNase 유전자(Barnase)의 경우에서도 보고되었다(Zhan 등, 1996). Zhan 등(1996)은 담배의 형질전환체에서 각 전환체들이 임성부터 완전웅성불임까지 다양하게 나타나는 결과는 PS1 프로모터가 수술의 포자체 조직(2n)에서 발현되어 화분발달에 영향을 미치거나 또는 독성 유전자가 소포자 모세포(n)의 초기형성 단계에서 발현되어 소포자 발달을 억제하기 때문에 나타난다고 보고하였다. 또한 많은 화분특이 유전자가 비록 적은 양이지만 암술 조직에서도 발현된다는 보고도 있으며(Gasser, 1991) position 효과(Peach와 Velten, 1991)나 전이유전자의 suppressor나 activator로서의 역할(Hart 등, 1992)에 의한 이상 분리현상으로 추정할 수도 있다. 본 실험에 이용된 수술특이 프로모터 역시 1 copy가 전이될 경우 수술에서만 발현되는 것이 확인되었으나 2 copy 이상이 전이될 경우에는 발현되는 독성 단백질이 암술조직의 발달에도 영향을 미칠 수 있어 이상 분리현상을 보일 수 있을 가능성을 배제할 수 없다.

웅성불임개체들과 임성개체들을 여교잡하여 수확한 꼬투리의 크기와 종자결실은 정상적인 개체들의 교배 때와는 달리 감소하였다(Fig. 3) 이는 DTx-A 유전자의 copy수가 많은 개체들에서 더욱 많이 감소하였다. 이와 같은 결과도 역시 앞에서 언급한 바와 2 copy 이상이 전이될 경우에는 발현되는 독성 단백질이 암술조직 즉 씨방의 발달에도 영향을 미칠 수 있어 꼬투리의 크기나 종자결실에 영향을 미쳤으리라 추측된다.

따라서 이들 웅성불임개체들을 일대잡종종자 생산체계에 이용하려면 임성회복친이 필요한데 예를 들면 antisense 방향의 DTx-A 유전자를 가진 개체를 자가수분시켜서 획득한 종자들로부터 여교잡 방법으로 homozygous한 회복친을 선발한 후 웅성불임 개체들과의 교배를 통하여 임성을 회복시키는 방법도 이용될 수 있다. 회

복친을 선발해야 할 것이다. 또한 무엇보다도 앞에서 제시한 모든 가능성 있는 문제점을 검토, 해결하여 이상분리현상이나 종자결실 현상을 보이지 않는 웅성불임개체의 확보가 우선되어야 하며 누대(累代)에 걸쳐 분리비 검정을 하여 안정성을 검토한 연후에 교배모본으로 이용하여야 할 것으로 사료된다.

## 초 록

본 실험은 diphtheria 독성유전자의 수술조직 특이적인 발현을 이용하여 유기된 웅성불임 형질전환체들의 유전적 특성 및 표현형의 특징을 조사하고 후대로의 유전양상을 조사하여 전이유전자의 안정성을 검정하며 유전자의 조직특이적 발현 현상을 실제적으로 작물육종에 이용할 수 있는 가를 검토코자 수행하였다. 각 계통의 BC<sub>1</sub> 종자의 kanamycin 저항성 검정을 수행한 바 조사된 13계통 중 BC<sub>1</sub>5-13, BC<sub>1</sub>5-23, BC<sub>1</sub>5-28과 BC<sub>1</sub>5-32의 4계통을 제외한 나머지 9계통의 kanamycin 저항성 개체(Kan<sup>R</sup>) 대 kanamycin 감수성 개체(Kan<sup>S</sup>)의 비율은 1 : 30 - 0 : 52로 나타났다. 그러나 이 결과는 화분 특이 BAN215 프로모터에 의한 형질전환체의 도입유전자 copy 수에서 예상되는 Mendel 법칙의 우성유전자의 유전 비율에 모든 개체가 다 부합되지는 않았다. 형질전환된 웅성불임 개체에 존재하는 DTx-A 유전자가 후대로 안정적으로 전이되는지 또한 웅성불임 상태가 그대로 유지되는지를 확인하기 위하여 완전웅성불임개체중 전이유전자의 copy 수가 다른 5개체(5-13, 5-14, 5-23, 5-32, 5-33)를 선발하고 여교잡을 실시하여 BC<sub>2</sub>T<sub>0</sub>세대부터 BC<sub>4</sub>T<sub>0</sub>세대를 확보하였으며 각 계통의 후대로부터 428bp 크기의 DTx-A 유전자의 PCR 밴드를 확인할 수 있었다. 각 계통의 후대 개체들은 전이유전자를 후대 4대(BC<sub>4</sub>T<sub>0</sub>)까지도 안정적으로 전달하고 전달받

은 후대들은 옹성불임성을 그대로 유지하였으나 그 비율은 각 세대에 전이된 DTx-A 유전자의 copy수에 따라 차이를 나타냈다. 옹성불임개체들과 임성개체들을 여교잡하여 수확한 꼬투리의 크기와 종자결실은 정상적인 개체들의 교배때와는 달리 감소하였으며 이는 전이된 DTx-A 유전자의 copy수가 많은 개체들에서 더욱 많이 감소하였다. 따라서 이러한 종류의 유전자 전환체를 육종에 이용하기 위해서는 이론분리비에 부합되는 개체를 선발한 후 누대(累代)에 걸쳐 검정함으로써 안정성이 있는 개체를 이용하여야 할 것으로 생각된다.

추가 주요어 : 가나마이신 검정, 여교잡, 전이유전자, PCR

## 인용문헌

- An, G., P.R. Ebert, A. Mitra, and S.B. Ha. 1988. Binary vectors, p.1-19. In: S.B. Gelvin, R. A. Schilperoort, and D.P.S. Verma (eds.). Plant molecular biology manual, A3. Academic Publishers, Dondrecht, Belgium.
- Czako, M. and G. An. 1991. Expression of DNA coding for diphtheria toxin chain A is toxic to plant cells. *Plant Physiol.* 95:687-692.
- Gasser, C.S. 1991. Molecular studies on the differentiation of floral organs. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:621-649.
- Hart, C.M., B. Fischer, and J.M. Neuhaus. 1992. Regulated inactivation of homologous gene expression in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants containing a defense-related tobacco chitinase gene. *Mol. Gen. Genet.* 235:179-188.
- Kim, H.U., B.S. Park, Y.M. Jin, and T.Y. Chung. 1997. Promoter sequences of two homologous pectin esterase genes from Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) and pollen-specific expression of GUS gene driven by a promoter in tobacco plants. *Mol. Cells* 7:21-27.
- Kim, H.U., B.S. Park, Y.D. Park, and Y.M. Jin. 1997. Pollen ablation of transgenic tobacco plants by expression of the diphtheria toxin A-chain gene under the control of a putative pectin esterase promoter from Chinese cabbage. *Mol. Cells* 8:310-317.
- Kim, H.U. 1995. Production of male sterile tobacco plants using an anther-specific promoter recombinant. PhD Thesis, Seoul National University, Seoul, Korea.
- Mariani, C., M.D. Beuckeleer, J. Truettner, J. Leemans, and R.B. Goldberg. 1990. Induction of male sterility in plants by a chimeric ribonuclease gene. *Nature* 347:737-741.
- Mariani, C., V. Gossele, M.D. Beuckeleer, M.D. Block, R.B. Goldberg, W.D. Greet, and J. Leemans. 1992. A chimeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature* 357:384-387.
- Park, B.S. 1996. Promoter analysis of two genes expressed in anther. PhD Thesis, Seoul National University, Seoul, Korea.
- Pappenheimer, A. 1997. Diphtheria toxin. *Ann. Rev. Biochem.* 46:69-94.
- Peach, C. and J. Velten. 1991. Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol. Biol.* 17:49-60.
- Zhan, X.Y., H.M. Wu, and A.Y. Cheung. 1996. Nuclear male sterility induced by pollen-specific expression of a ribonuclease. *Sex. Plant Reprod.* 9:35-43.