

# 상처처리와 접종시간이 *Agrobacterium*에 의한 고추 형질전환에 미치는 영향

전영주 · 박영두 · 최근원\*

경희대학교 생명과학부 원예학 전공

## Effects of Wounding and Inoculation Time on *Agrobacterium* -mediated Transformation in *Capsicum annuum* L.

Young-Ju Jeon, Young-Doo Park, and Geun-Won Choi\*

Major in Horticulture, Division of Life Science, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea

\*corresponding author

**ABSTRACT** The present study was conducted to improve the efficiency of transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in hot pepper. Both regeneration ratio and transformation frequency after the cocultivation with *A. tumefaciens* were affected by inoculation time and artificial wounding. Transformation frequency was increased over 50% by combining artificial wounding with 120 s of inoculation treatment. Confirmation for the transformation of regenerated shoots was carried out by histochemical  $\beta$ -glucuronidase assay and polymerase chain reaction analysis using nptII primer.

**Additional key words:**  $\beta$ -glucuronidase, nptII, polymerase chain reaction

### 서 언

유용유전자의 식물체로의 전이를 위한 *Agrobacterium tumefaciens*을 이용한 형질전환은 쌍자엽식물에 적용되는 가장 일반적인 방법이며 최근 다양한 작물에서 이를 이용하여 재조합체 저장성 유전자, 내바이러스성 유전자, 내충성 유전자 등의 유용유전자를 전이시켜 신품종을 육성하려는 연구들이 활발히 시도되고 있다. 그러나 작물에 따라 형질전환을 위한 재조합조건이 다르고 같은 작물이라도 품종에 따라 형질전환율이 차이를 보여 각 작물에 따른 형질전환 체계를 확립하여 효율을 높이기 위한 연구를 필요로 하고 있다. *A. tumefaciens*를 이용한 형질전환에 있어 가장 큰 문제점의 하나는 일부 작물에서의 낮은 형질전환율과 작물과 품종에 따른 형질전환율의 차이인데 이는 *A. tumefaciens* 계통에 따른 차이, *A. tumefaciens*와 식물체와의 공동배양조건(Monika 등, 1991), 접종시간, 배지조성(Filloppone과 Lurquin, 1989), 박테리아의 농도(Pechan, 1989; Zahara 등, 1995) 등 여러 가지 복합적인 요인이 상호작용하는 것으로 알려져 있다. 이를 해결하기 위한 연구가 진행되고는 있으나 아직까지는 극히 일부작물을 제외하고는 최적의 형질전환 조건이 확립되어 있지 않았으며 고추에 있어서도 그 효율이 50% 이하로 그리 높지 않다(Szasz와 Fari, 1995; Zhu 등 1996). 고추는 우선 재분화가 어렵고 품종에 따른 재분화조건이 다르기 때문에 적

정한 재분화체계를 확립하는 것이 중요한데 이는 Gunay와 Rao (1978)에 의해 처음 보고되었으며 그 후 신초발생과 기관형성이 원형질체, 배축 및 자엽으로부터 가능하다고 보고되고 있다(Arroy와 Revilla, 1991; Attila 등, 1995; Diaz 등, 1988; Phillips와 Hubstneberger, 1985). 또한 형질전환체의 선발 후 유전학적인 검증을 위해 주로 Southern hybridization을 이용하고 있으나 실험방법이 복잡하고 많은 노력이 필요하여 최근에는 polymerase chain reaction(PCR) 검정을 병행하는 추세에 있다(Hamil 등, 1991).

따라서 본 실험은 고추에 있어 *A. tumefaciens*와의 공동배양기간, 접종시간 그리고 절편체의 인위적인 상처유무에 따른 재분화 및 형질전환율의 차이를 조사함으로써 형질전환의 효율성을 높이기 위하여 수행되었다.

### 재료 및 방법

본 실험의 공시재료인 고추는 중앙종묘(주) 육종연구소에서 육성된 계통들인 '276F'와 '135Q'를 사용하였고 형질전환은 고추종자를 무균상태에서 발아시킨 후 자엽을 채취하여 실시하였다. 형질전환은 nptII와  $\beta$ -glucuronidase(GUS) 유전자가 삽입된 pBI121 binary vector를 운반하는 *A. tumefaciens* strain LBA 4404를 사용하였다.

상처유무 및 침지시간이 형질전환에 미치는 영향을 알아보기 위하여 '135Q'와 '276F' 계통의 자엽절편체에 엽맥과 수직으로 3mm 정도의 인위적인 상처를 5개씩 가한 것과 상처를 가하지 않은 것을 대조군으로 OD<sub>600</sub>=0.8인 *A. tumefaciens* 용액에 20초, 120초, 그리고 3600초간 각각 침지한 후 꺼내어 filter paper 위에서 건조시킨 다음 NAA 0.01mg · L<sup>-1</sup>와 zeatin 3.0mg · L<sup>-1</sup>, sucrose 30 g · L<sup>-1</sup> 및 agar 8g · L<sup>-1</sup>가 첨가된 MS 기본배지에(pH 5.7) 치상하여 암상태에서 3일간 공동배양하였다. *A. tumefaciens*와의 공동배양을 마친 절편체는 NAA 0.01mg · L<sup>-1</sup>, zeatin 3.0mg · L<sup>-1</sup> 그리고 cefotaxime 200mg · L<sup>-1</sup>가 첨가된 *A. tumefaciens* 세척용 MS 기본배지로 절편체의 표면에 묻어 있는 *A. tumefaciens*를 깨끗이 씻어낸 후 멸균된 filter paper위에서 건조시켰다. 그 다음 NAA 0.01mg · L<sup>-1</sup>, zeatin 3.0mg · L<sup>-1</sup>, AgNO<sub>3</sub> 10mg · L<sup>-1</sup>, cefotaxime 200mg · L<sup>-1</sup>과 kanamycin 40mg · L<sup>-1</sup>가 함유된 선발 배지에 치상하여 25±1℃, 16시간 일장의 배양실에서 배양하였으며 3주 후 2차 선발배지에 옮겨주었다. 절편체에 대한 신초형성은 각 절편체의 생존상태를 관찰하면서 신초형성 절편수 및 신초수를 조사하였으며 재분화된 신초에 대하여 형질전환여부의 확인을 위하여 Jefferson(1987) 방법에 따른 GUS 분석과 PCR 분석을 실시하여 형질전환빈도를 조사하였다. NptII 유전자의 존재여부는 형질전환시킨 절편체로부터 유기된 신초와 형질전환시키지 않은 절편체로부터 나온 신초에서 각각의 DNA를 NaOH 추출법에 의해(Hong 등, 1993) 추출한 후 2개의 nptII primer(5'-GAGGCTATTCGGC TATGACTG-3'; 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3')로 증폭하였다. DNA 증폭을 위한 PCR robot은 독일 Biometra사의 UNOII thermocycler를 이용하였으며 PCR을 위한 프로그램은 95℃에서 3분 변성시킨 후 95℃ 1분, 55℃ 1분, 그리고 72℃ 2분

으로 35반복하여 증폭시켰으며 마지막으로 72℃에서 5분 동안 연장시킨 후 4℃에 저장하였다. 증폭산물은 1.0% agarose gel에서 전기영동한 후 UV로 밴드를 확인하여 형질전환여부를 조사하였다.

## 결과 및 고찰

절편체에 엽맥과 수직으로 3mm 정도의 상처를 가한 것과 가하지 않은 것을 접종시간을 20초, 120초 그리고 3600초로 달리하여 3일 공동배양하여 실험을 실시한 결과는 Table 1에 나타난 것과 같다. '135Q' 계통에서 상처를 가하여 120초간 접종한 것에서 다른 처리구보다 많은 수의 신초가 발생하여 96%의 높은 재분화율을 나타냈으며 '276F' 계통도 상처를 가하여 120초간 접종한 것에서 88%의 높은 재분화율을 나타내 접종시간과 인위적인 상처가 재분화율에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 또한 '135Q'와 '276F' 두 계통 모두에서 20초 접종한 절편체에서 상처를 가한 것이 상처를 가하지 않은 절편체보다 재분화율이 높았으나 3600초 접종한 것에서는 상처를 가한 것이 상처를 가하지 않은 절편체보다 오히려 낮은 것으로 나타났는데 이는 3600초 접종하는 경우 인위적인 상처를 넘으로써 오랜 시간동안 많은 부위로 *A. tumefaciens*가 침투하게 되어 절편체의 조직손상과 더불어 세척시 완전히 제거되지 않는 문제 등이 발생되어 재분화율이 낮아진 결과인 것으로 생각되며 따라서 이의 사용은 부적합한 것으로 판단된다. 형질전환율은 상처 처리를 하지 않은 경우에는 두 품종 모두 20초 또는 120초간 접종한 것이 3600초 접종한 것보다 높은 형질전환율을 보였으나 상처 처리를 한 경우 '135Q'에서는 3600초 처리가 가장 높은 반면 '276F'에서는 가장 낮은 결과를 보였으며 상처를 처리하지 않은 것에 비해 전 처리구에서 형질전환율이 향상되었다.

**Table 1.** Effects of artificial wounding treatment and inoculation time with *A. tumefaciens* on regeneration and transformation frequency of cotyledon explants of two different hot pepper lines.

Line	Artificial wounding	Inoculation time (s)	Regeneration frequency <sup>z</sup> (%)	Regenerated shoots per explant	Transgenic shoots confirmed by PCR	Transformation frequency <sup>x</sup> (%)
'135Q'	Non wounding	20	56 bc <sup>y</sup>	4.2	8	50.0
		120	56 bc	4.9	7	50.0
		3600	43 c	4.2	4	36.4
	Wounding	20	72 b	5.7	13	72.3
		120	96 a	5.8	14	58.4
		3600	31 c	4.5	6	75.0
'276F'	Non wounding	20	39 b	3.1	6	54.6
		120	68 a	4.8	5	29.5
		3600	36 b	3.3	2	22.3
	Wounding	20	68 a	5.4	13	68.5
		120	88 a	4.9	15	68.2
		3600	28 b	3.1	4	57.2

<sup>z</sup>(No. of explants producing one or more shoots / total number of explants)×100.

<sup>y</sup>Within column, means followed by the same letter are not significantly different at 0.05 probability level, according to Duncan's multiple range test.

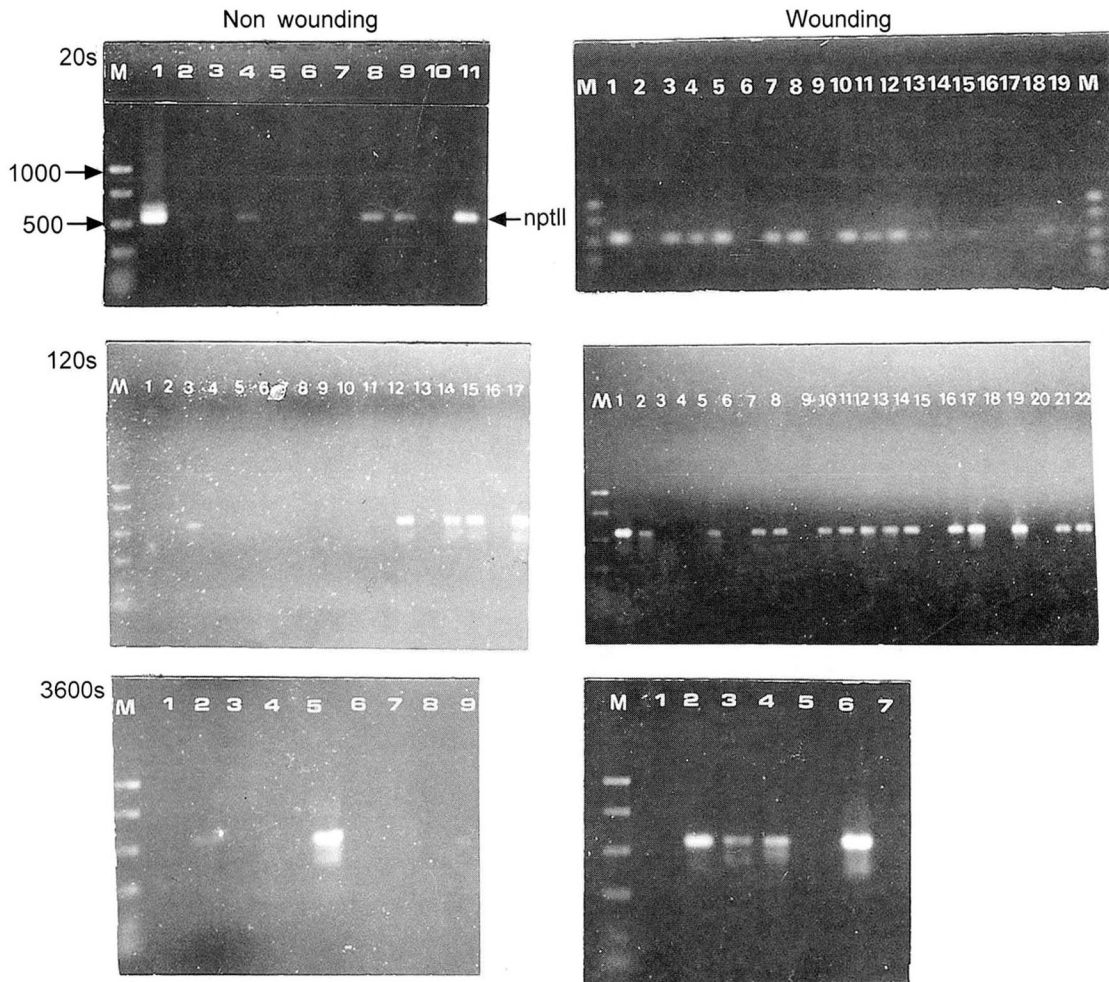
<sup>x</sup>(Transgenic shoots / total number of shoots tested by PCR)×100.

선발배지에서 재분화된 신초의 DNA를 추출하여 nptII primer로 증폭시킨 PCR 검정을 한 결과 '135Q' 계통은 상처를 가하여 20초간 접종한 것에서 총 18개의 재분화 신초 중 13개에서 0.5kb PCR 산물이 증폭되어 72.3%의 형질전환율을, 120초간 접종 처리한 것에서는 총 24개중 14개에서 증폭되어 58.4%의 형질전환율을, 3600초 처리에서 총 8개중 6개에서 0.5kb 밴드가 형성되어 75%의 높은 형질전환율을 각각 나타냈다(Fig. 1). '276F' 계통에서도 상처를 가하여 20초, 120초, 3600초간 접종한 것에서 각각 총 19개의 재분화된 신초 중 13개, 총 22개 중 15개, 그리고 총 7개 중 4개에서 0.5kb PCR 산물이 확인되어(Fig. 2) 68.5%, 68.2%, 57.2%의 형질전환율을 나타냈다. PCR 산물이 확인된 신초를 대상으로 histochemical GUS 분석을 한 결과 국부적인 푸른 발색을 보여(Fig. 3) 두 유전자 모두의 전이를 확인하였으며 확인된 신초들은 발근배지에 옮겨져 뿌리를 유도하여 온실순화중이다.

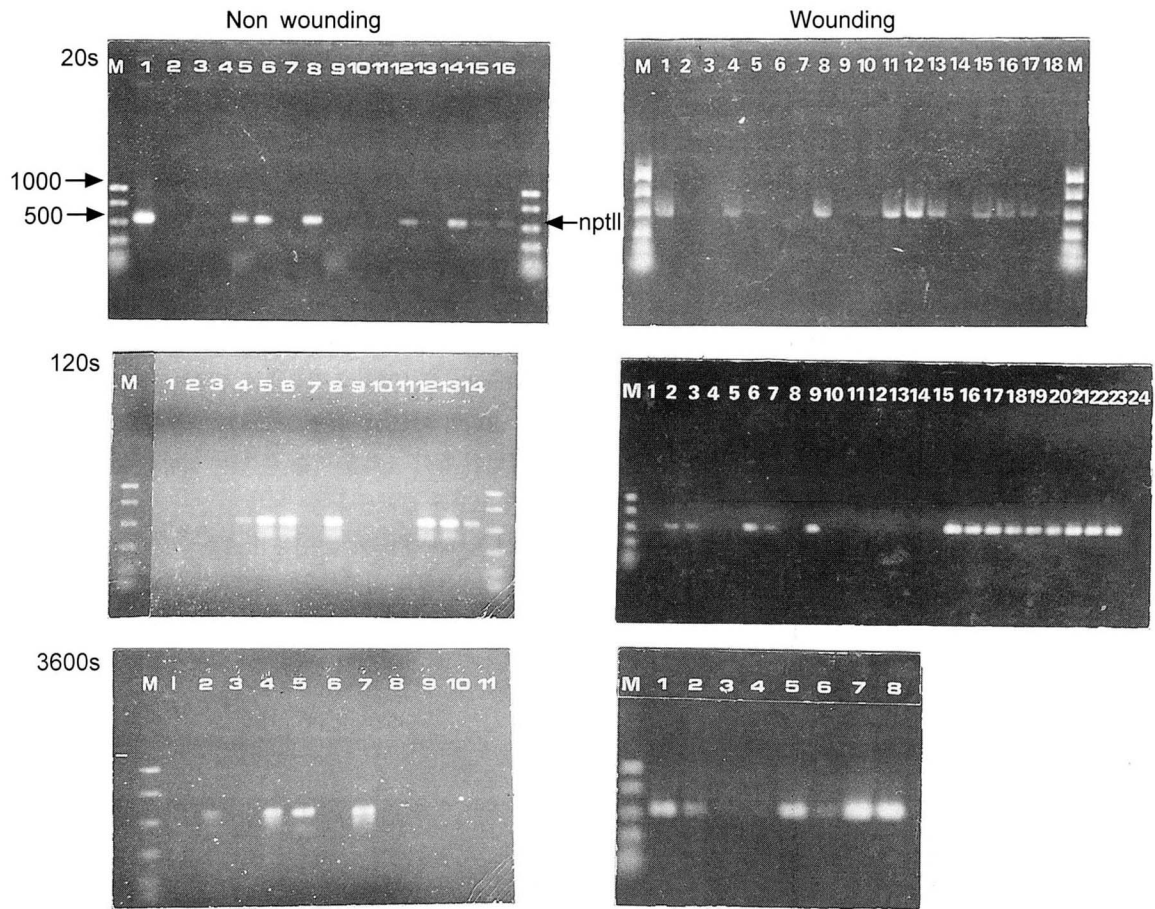
본 실험 결과 재분화율과 형질전환율에 복합적인 요소가 작용한 것으로 판단되며 인위적인 상처를 가하여 준 것이 형질전환 효율이

높은 것으로 나타났는데 이는 적절한 접종시간과의 상호작용으로 인하여 상승된 것으로 사료된다. 3600초간의 접종시간은 극히 저조한 재분화율을 보여 사용이 불가능할 것으로 판단되었다. 20초와 120초간의 접종시간에서는 큰 차이를 보이지 않았고 두 처리 모두 인위적인 상처를 가하여 준 것이 형질전환율이 높은 것으로 나타났는데 이는 상처를 가하지 않은 조직보다 많은 상처부위에서 분비되는 acetosyringone이나 hydroxy-acetosyringone과 같은 페놀류 화합물이 *A. tumefaciens*의 vir 유전자를 활성화하여 T-DNA의 전이를 보다 원활하게 하여 높은 형질전환율을 보인 것으로 생각된다. 이는 Mireille 등(1988)이 식물체의 형질전환율을 높이기 위해서는 한가지 요인이 아닌 *A. tumefaciens*의 침투시간, 침투량, 노출시간 및 침투범위 등이 조화를 이룰 수 있는 적절한 조건이 주어져야 한다고 한 보고와 일치한다.

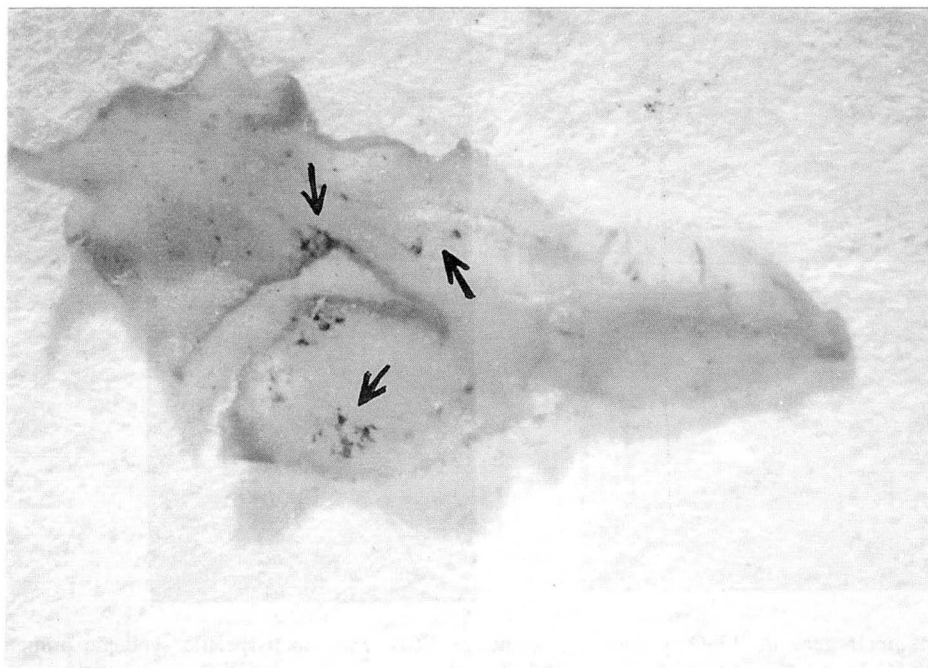
따라서 *A. tumefaciens*를 이용한 고추의 형질전환시 효율을 높이기 위해 상처유무와 접종시간의 병행처리에 따른 효과를 실험한 결과 절편체에 인위적인 상처를 가하여 *A. tumefaciens*와 20초나



**Fig. 1.** Detection of nptII gene in '135Q' pepper regenerants by PCR. Two nptII-specific synthetic primers, 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' and 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3' were used for PCR. Each number represents the regenerated shoot from cotyledon explants of '135Q' pepper line after infection with *A. tumefaciens*. Arrow (←) indicates the expected 500 bp PCR products of nptII. M: size marker.



**Fig. 2.** Detection of *nptII* gene in '276F' pepper regenerants by PCR. Two *nptII*-specific synthetic primers, 5'-GAGGCTATTCG GCTATGACTG-3' and 5'-ATCGGGA GCGGCGATACCGTA-3' were used for PCR. Each number represents the regenerated shoot from cotyledon explants of '276F' pepper line after infection with *A. tumefaciens*. Arrow (←) indicates the expected 500 bp PCR products of *nptII*. M: size marker.



**Fig. 3.** Localization of GUS activity in transgenic shoot of '135Q' pepper. Histochemical assay was conducted to analyze GUS activity and arrows (→) indicate localization of GUS activity.

120초간 접종한 후 3일 공동배양처리 하였을 때 형질전환율이 향상되는 것으로 나타나 앞으로 고추의 형질전환실험시 활용될 수 있을 것으로 기대되며 형질전환에 영향을 미치는 다른 조건들과의 병행실험이 더 필요할 것으로 판단된다.

## 초 록

본 연구는 고추에서 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 형질전환시 형질전환율을 높이기 위하여 *A. tumefaciens*와의 접종시간과 인위적인 상처처리에 따른 효과를 조사하였던 바 고추 형질전환시 자엽절편체의 재분화는 인위적 상처처리 및 *A. tumefaciens* 접종시간에 의해 영향을 받았다. 접종시간을 3600초로 한 경우의 재분화는 상처처리에 의해 급격히 감소하였으며 자엽 절편체에 대한 인위적인 상처처리가 20초 또는 120초간의 접종시간처리와 병행됨으로써 형질 전환율을 58-72% 이상으로 높이는 효과를 보였다. 형질전환여부의 확인을  $\beta$ -glucuronidase 염색법과 nptII primer를 이용한 polymerase chain reaction 분석에 의해 수행 한 바 효과적인 것으로 판단되었다.

## 인용문헌

Attila, S., G. Nervo, and H. Miklos. 1995. Screening for in vitro shoot-forming capacity of seedling explant in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes and efficient explant plant regeneration using thidiazuron. *Plant Cell Rpt.* 14:666-669.

Arroy, R. and M.A. Revilla. 1991. In vitro plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Rpt.* 10:414-416.

Diaz, I., R. Moreno, and J.B. Power. 1988. Plant regeneration from protoplast of *Capsicum annuum*. *Plant Cell Rpt.* 7:210-212.

Filippone, E. and P.F. Lurquin. 1989. Stable transformation of eggplant (*Solanum melongena* L.) by cocultivation of tissues with *Agrobacterium tumefaciens* carrying a binary plasmid

vector. *Plant Cell Rpt.* 8:370-373.

Hamil, J.D., S. Rounsley, A. Spencer, G. Todd, and M.J.C. Rhodes. 1991. The use of the polymerase chain reaction in plant transformation studies. *Plant Cell Rpt.* 10:221-224.

Hong, W., M. Qi, and J.A. Cutler. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21:4153-4154.

Jefferson, P.A. 1987. GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6:3901-3907.

Mireille, C., E.P. Joan, C. Frank, and B.W. Vicky. 1988. Parameters affecting the frequency of kanamycin resistant alfalfa obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rpt.* 7:512-516.

Monika, M.L., R. Han, J.A. Jackson, D.S. Baliski, and S.L.A. Hobbs. 1991. Optimizing the production of transformed pea (*Pisum sativum* L.) callus using disarmed *Agrobacterium tumefaciens* strains. *Plant Cell Rpt.* 9:479-483.

Pechan, P.M. 1989. Successful cocultivation of Brassica napus microspore and proembryos with *Agrobacterium*. *Plant Cell Rpt.* 8:387-390.

Phillips, G.C. and J.F. Hubstneberger. 1985. Organogenesis in pepper tissue cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 4:261-269.

Szasz, A. and M. Fari. 1995. New technological and biological aspects of in vitro regulation and genetic transformation in pepper. Aug. In: Abstracts IX<sup>th</sup> EUCARPIA meeting on genetics and breeding on capsicum and eggplant. 21-25, Budapest, Hungary, p. 76-78.

Zahara A., F.G. Ann, and T. Zohreh. 1995. Transformation of the wild tomato (*Lycopersicon chilense* Dun.) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rpt.* 15:102-105.

Zhu, Y.X., W.J.O. Yang, Y.F. Zhang, and Z.L. Chen. 1996. Transgenic sweet pepper plants from *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rpt.* 16:71-75.