

사과 'McIntosh Wijcik' 형질전환체 선발을 위한 Kanamycin 농도

송관정* · 성은수

농촌진흥청 원예연구소

Kanamycin Concentration for Selection of 'McIntosh Wijcik' Transgenic Apple

Kwan Jeong Song* and Eyn Soo Seong

Department of Fruit Breeding, National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon 440-706, Korea

*corresponding author

ABSTRACT Effects of kanamycin concentration on regeneration and rooting of transgenic 'McIntosh Wijcik' were investigated to establish the efficient *Agrobacterium*-mediated transformation system. Relatively high regeneration frequency of explants appeared even at the high concentration of 150 mg · L⁻¹ kanamycin, but the regeneration frequency and the number of normal shoots decreased significantly at a concentration of higher than 100 mg · L⁻¹ kanamycin in the gelrite-gellifying medium. Rooting response varied with the transgenic lines in the agar-solidifying medium supplemented with the different concentrations of kanamycin and they were grouped with the inhibition level at 30 mg · L⁻¹ concentration. No correlation between copy number and root response was observed. The optimum concentrations of kanamycin for the regeneration of 'McIntosh Wijcik' apple in the medium gellified with gelrite and for indirect-selection of putative transformants in the rooting medium solidified with agar were found to be 100 mg · L⁻¹ and 30 mg · L⁻¹, respectively.

Additional key words: antibiotics, nptII, selection, transformation

서 언

*Agrobacterium*을 이용한 사과 형질전환 성공이 보고(James 등, 1989)된 이래로 배(Bell 등, 1999), 포도(Scorza 등, 1996), 오렌지(Gutierrez-E 등, 1997) 등 여러 과수에서 형질전환에 의해 특정 소수형질이 개량된 신품종 육성의 가능성이 제시되어 왔다. 그런데 아직까지는 형질전환 효율이 낮을 뿐만 아니라 품종에 따른 반응의 차이가 커서 실용화가 미흡한 실정이며, 효율 증진을 위한 연구가 시급한 실정이다(Bolar 등, 1999; James 등, 1993; Puite와 Schaart, 1996; Yao 등, 1995).

사과 형질전환 효율을 증진하기 위해서 초기 유전자 전이단계에서는 *A. tumefaciens* strain 중 EHA101을 이용하고(De Bondt 등, 1996), 병원성 유도과정에는 acetosyringone 및 betaine phosphate를 첨가하며(James 등, 1993), 후기 재분화단계에서는 배지고형물로서 agar보다는 gelrite를 이용하고, 첨가 호르몬으로는 thidiazuron(De Bondt 등, 1996)을 사용하는 것이 효과적인 것으로 보고되었다. 특히, James 등(1989)은 agar 배지를 이용한 사과 형질전환 연구에서 형질전환체 선발마커로 이용되는 kanamycin의 적정농도 설정이 가장 중요한 요인으로 작용한다고 하였다. 그런데 대부분의 사과 형질전환 연구에서는 재분화 배지 고형물로서 agar보다

gelrite의 이용을 선호하여 왔으나, kanamycin의 적정농도 설정에 대한 연구는 미미한 실정이다(Maheswaran 등, 1992; Maximova 등, 1998; Sriskandarajah와 Goodwin, 1998).

형질전환체의 일차적인 선발은 주로 β -glucuronidase(GUS) 활성에 의존하여 왔는데, 활성분석에 장시간이 소요되고 조직파괴적이며 GUS발현의 불안정 등으로 인하여, 최근에는 green fluorescent protein의 이용에 관한 연구가 수행되어 왔다(Maximova 등, 1998). 그런데 이들 reporter 단백질들은 세포내에서 전이된 목적 유전자의 단백질들과의 상호작용의 가능성 때문에 GUS 유전자를 삭제한 벡터를 사용하기도 하는데, 이 경우 효율적인 형질전환체의 일차적인 선발체계가 필요한 실정이다.

따라서 본 연구는 효율적인 형질전환체 재분화 체계를 마련코자 재분화 배지내 적정 항생제 농도를 구명하고, 재분화 신품종부터 형질전환체의 일차적인 간접 선발체계를 마련하기 위한 발근 배지내 적정 항생제 농도를 설정코자 수행되었다.

재료 및 방법

기내 증식되어 발근된 사과 'McIntosh Wijcik' 품종 신품종의 유엽으로부터 nptII 유전자와 MdAGP 또는 OsMADS1 유전자를 포

함하는 binary vector를 가지는 *A. tumefaciens* strain LBA4404을 이용하여 형질전환체가 양성되었다(Song 등, 2000). 이들 형질전환체중 polymerase chain reaction 및 Southern blot 분석으로 선발 및 목적 유전자의 전이가 확인된 형질전환 4계통(45AMW3, 49AMW1, 49SMW5 및 58SMW1)을 본 실험에 이용하였다(Fig. 1).

재분화 배지 및 발근유도 배지내 적정 항생제 농도를 구명하기 위하여 발근 신초의 유엽 채취에서부터 재분화 단계까지 *A. tumefaciens*의 접종단계만이 생략된 형질전환 유도과 일반 증식 신초로부터 발근이 유도되는 동일한 방법(Song 등, 2000)을 적용하여, 배지내 kanamycin sulfate(Duchefa Co.) 농도를 각각 5수준으로 처리하였다. 유엽 절편체의 치상 8주 후에 치상 엽절편체로부터의 재분화 절편체의 비율인 재분화율, 정상 신초를 가지는 재분화 절편체의 비율인 정상 신초 재분화율과 재분화된 평균 정상 신초수를 조사하였고, 발근 처리 4주 후에 발근율, 주근 수와 평균 주근 길이를 측정하였다.

결과 및 고찰

사과 'McIntosh Wijcik' 형질전환체 계통을 이용한 재분화 실험에서 형질전환체 계통에 관계없이 kanamycin 농도가 $150\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 고농도에서도 60% 이상의 높은 재분화율을 나타내었다(Fig. 2). 이는 Norelli와 Aldwinckle(1993)가 'M26' 대목의 형질전환 계통을 이용한 재분화 실험에서 agar 고형배지내 kanamycin 농도가 재분화 유도에 사용되는 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 보다 높은 $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 이상에서 재분화를 저해한다고 보고한 것과 유사하였다. 그런데 Sriskandarajah 등(1994)는 'Delicious' 품종에서 gelrite 고형배지내 kana-

mycin 농도가 $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 에서도 거의 완전히 재분화가 억제된다고 하였다. 그러므로 kanamycin 농도에 대한 재분화 반응은 품종에 따라 달라질 수 있다고 보여진다. 또한 Ko 등(1998)에 의하면 사과 형질전환 계통간의 재분화 정도의 차이가 *nptII*의 발현과 정의 상관성이 있었는데, 본 연구에서는 형질전환체 계통간 *nptII* 유전자의 삽입수와 발현 정도에 대한 분석이 불충분하여, 이에 대해서는 명확치 않았으며 추가적인 연구가 있어야 할 것으로 생각되었다.

한편, 정상 신초 재분화율 및 정상 신초수에 있어서는 kanamycin 농도가 높아질수록 저해 정도가 높아지는 경향이 뚜렷하였다. 45AMW1 계통의 경우는 정상 신초 재분화율 면에서 농도에 다른 차이가 크게 나타났고, 49SMW1 계통의 경우는 정상 신초수 면에서 반응의 차이가 뚜렷하였다. 따라서 정상 신초 재분화율과 정상 신초수를 고려할 때 gelrite 고형배지에서의 적정 kanamycin 농도는 $100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 으로 판단되었다. 그런데 항생제가 첨가되지 않은 경우에도 정상 신초 재분화율이 낮고 상대적인 투명화율이 높아진 것은 배지 고형물로 첨가된 gelrite의 영향인 것으로 생각되었기 때문에(Bolar 등, 1999), 품종에 따른 gelrite와 agar의 재분화율, 재분화 신초수 증진, 및 투명화율 증가에 미치는 영향에 대한 연구가 필요한 것으로 판단되었다.

발근배지에 첨가된 kanamycin 농도별 발근 정도에 대한 반응은 계통간에 차이가 크게 나타났(Fig. 3). $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 높은 농도에서도 발근이 저해되지 않은 계통과 저해 정도가 비교적 높은 계통으로 대별되었으며, 항생제의 농도가 높을수록 발근율이 저해되는 계통은 주근수와 근장에서도 유사한 경향의 반응을 나타내었다. 이는 Maximova 등(1998)의 사과 형질전환 계통들이 항생제가 첨가되지 않은 발근 배지에서도 발근율에 차이가 있다는 보고와

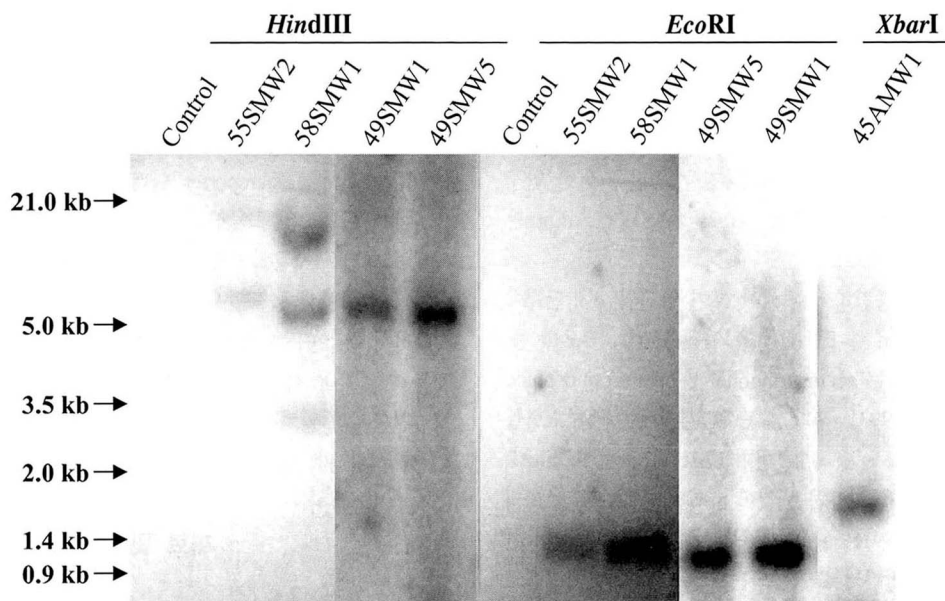


Fig. 1. Southern blot analysis of genomic DNA from 'McIntosh Wijcik' transgenic apple. The genomic DNA was digested with *HindIII*, *EcoRI*, or *XbaI* and hybridized with the probe of ^{32}P -labelled *OsMADS1* or *MdAGP*.

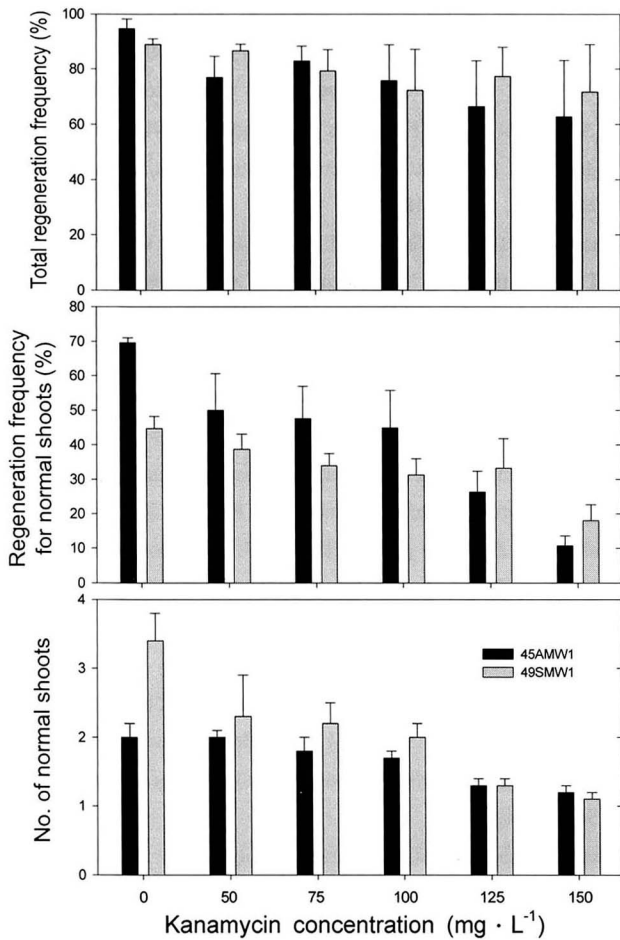


Fig. 2. Effect of kanamycin on the regeneration response of 'McIntosh Wijkik' transgenic apple. Total regeneration frequency was calculated as the percent of explants forming buds or shoots, the regeneration frequency, and the percent of explants having normal shoots. Each value represents the mean of 3 independent experiments consisted of 50 leaf segments. Vertical bars indicate the SE.

Skiskandarajah 등(1994)의 사과 형질전환체가 50mg · L⁻¹의 높은 kanamycin 농도에서도 발근율이 저해되지 않았다는 보고와 유사 하였다. 한편, Holefors 등(1998)은 사과 대목인 M26의 형질전환체를 이용한 발현분석에서 형질전환 계통에 따른 발근율의 차이가 전이 유전자의 삽입수와는 관련이 없고 유전체내 삽입 위치와 관계된다고 하였다. 본 연구의 Southern blot 분석(Fig. 1)에서는 49AMW1 및 49SMW5 계통은 전이 유전자 삽입수가 1회이고 58SMW1 계통은 삽입수가 3회로 나타나서, 이들 계통들간 발근 반응의 차이가 전이 유전자의 삽입수보다는 삽입 위치에 따른 효과로 판단되었다. 그러므로 이는 전이 유전자 삽입 위치 효과에 따라 발근 이외의 특성 발현도 달라질 수 있음을 보여 주는 것으로 생각되었다.

한편, 50mg · L⁻¹의 높은 농도에서 발근을 저해가 높은 계통에서도 상당 비율의 싹은 정상 생장을 유지하고 싹초 밑부분에 캘러스가 발생되었으며, 30mg · L⁻¹ 이하의 농도에서는 저해 정도가 약

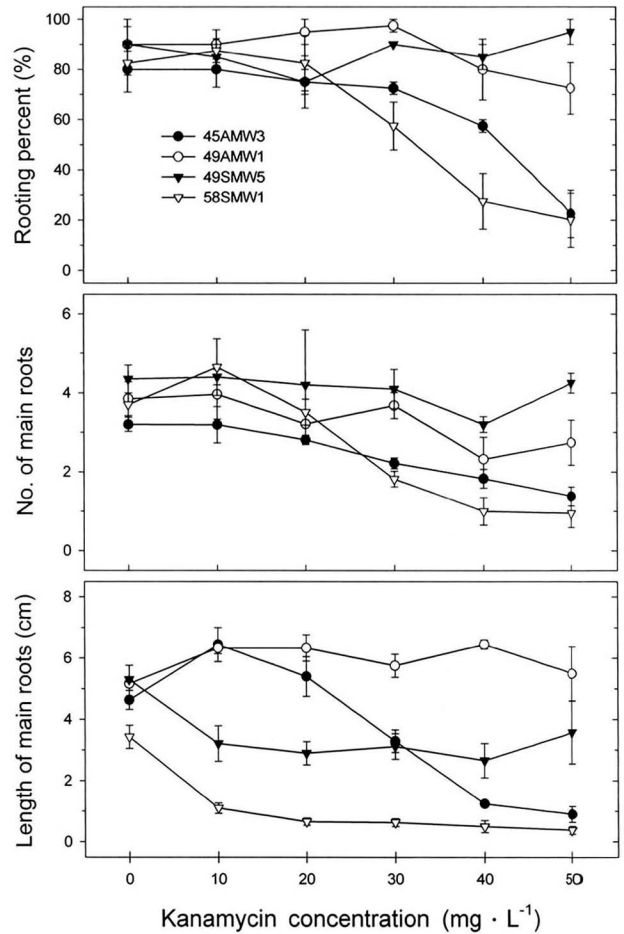


Fig. 3. Effect of kanamycin on rooting activities of 'McIntosh Wijkik' transgenic apple. The rooting frequency was calculated as the percent of rooted shoots. Each value represents the mean of 2 independent experiments consisted of 2 replications with 20 shoots. Vertical bars indicate the SE.

하여 2개 이상의 주근이 형성되어 순화에 이용할 수 있었다. 또한 비형질전환체는 10mg · L⁻¹의 낮은 농도에서도 발근에 대한 저해 정도가 매우 높아 거의 대부분은 뿌리를 발달시키지 못할 뿐만 아니라 고사하는 현상을 보여 주었다. 따라서 형질전환체의 일차적인 간접선택을 위한 적정 kanamycin 농도는 30mg · L⁻¹으로 판단되었다.

초 록

사과에서 효율적인 형질전환 체계를 마련코자 'McIntosh Wijkik' 형질전환체 계통을 이용하여 재분화 및 발근 배지내 kanamycin 농도에 따른 반응을 조사하였다. Gelrite 고품 재분화 배지에서는 150mg · L⁻¹의 고농도에서도 재분화에 대한 저해 정도는 낮았으나, 정상 싹초 재분화 면에서는 100mg · L⁻¹ 이상의 농도에서는 저해 정도가 높았다. Agar 고품 발근배지에서 kanamycin 농도에 따

큰 발근 반응은 계통간 차이를 보여, 30mg · L⁻¹ 이상의 농도에서 발근율이 크게 저해되는 계통과 거의 영향을 받지 않는 계통이 존재하였다. 또한 이들 형질전환체 계통간 발근율 차이는 전이 유전자 삽입수보다는 삽입 위치에 따른 효과로 보이졌다. 따라서 'McIntosh Wijcik' 품종의 형질전환체 gelrite 고형 재분화 배지내 적정 kanamycin 농도는 100mg · L⁻¹ 정도로 판단되며, 형질전환체에 대한 일차적인 간접선발에 적당한 agar 고형 발근배지내 kanamycin 농도는 30mg · L⁻¹ 정도인 것으로 판단되었다.

추가 주요어 : 선발, nptⅡ, 항생체, 형질전환

인용문헌

- Bell, R.L., R. Scorza, C. Srinivasan, and K. Webb. 1999. Transformation of 'Beurre Bosc' pear with the *rolC* gene. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 124:570-574.
- Bolar, J.P., S.K. Brown, J.L. Norelli, and H.S. Aldwinckle. 1999. Factors affecting the transformation of Marshall McIntosh apple by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 55: 31-38.
- De Bondt, A., K. Eggermont, I. Penninckx, I. Goderis, and W.F. Broekaert. 1996. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple: An assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. Plant Cell Rpt. 15:549-554.
- Gutierrez-E, M.A., D. Luth, and G.A. Moore. 1997. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. Plant Cell Rpt. 16:745-753.
- Holefors, A., Z.T. Xue, and M. Welander. 1998. Transformation of the apple rootstock M26 with the *roleA* gene and its influence on growth. Plant Sci. 136:69-78.
- James, D.J., A.J. Passey, D.J. Barbara, and M.W. Bevan. 1989. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. Plant Cell Rpt. 7:658-661.
- James, D.J., S. Uratsu, J. Cheng, P. Negri, P. Viss, and A.M. Dandekar. 1993. Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. Plant Cell Rpt. 12:559-563.
- Ko, K., S.K. Brown, J.L. Norelli, and H.S. Aldwinckle. 1998. Alterations in *nptⅡ* and *gus* expression following micropropagation of transgenic M7 apple rootstock lines. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123:11-18.
- Maheswaran, G., M. Welander, J.F. Hutchinson, M.W. Graham, and D. Richards. 1992. Transformation of apple rootstock M26 with *Agrobacterium tumefaciens*. J. Plant Physiol. 139:560-568.
- Maximova, S.N., A.M. Dandekar, and M.J. Guiltinan. 1998. Investigation of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple using green fluorescent protein: High transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. Plant Mol. Biol. 37:549-559.
- Norelli, J.L. and H.S. Aldwinckle. 1993. The role of aminoglycoside antibiotics in the regeneration and selection of neomycin phosphotransferase-transgenic apple tissue. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 118:311-316.
- Puite, K.J. and J.G. Schaart. 1996. Genetic modification of the commercial apple cultivars Gala, Golden Delicious and Elstar via an *Agrobacterium*-mediated transformation method. Plant Sci. 119:125-133.
- Scorza, R., J.M. Cordts, D.J. Gray, D. Gonsalves, R.L. Emershad, and D.W. Ramming. 1996. Production transgenic 'Tompson Seedless' grape plants. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 121:616-619.
- Song, K.J., S.Y. Ahn, J.H. Hwang, Y.U. Shin, S.W. Park, and G. An. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of 'McIntosh Wijcik' apple. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 41:541-544.
- Sriskanarajah, S., P. Goodwin, and J. Speirs. 1994. Genetic transformation of the apple scion cultivar 'Delicious' via *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 36:317-329.
- Sriskanarajah, S. and P. Goodwin. 1998. Conditioning promotes regeneration and transformation in apple leaf explants. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 53:1-11.
- Yao, J.L., D. Cohen, R. Atkinson, K. Richardson, and B. Morris. 1995. Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala. Plant Cell Rpt. 14:407-412.