

*Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 상추 (*Lactuca sativa* L.)의 PAT 유전자 형질전환

류정아* · 김창길¹ · 이현숙 · 최경배 · 양덕춘²
경북농업기술원, ¹상주대학교 원예학과, ²한국인삼연초연구원

Transformation of PAT gene into Lettuce (*Lactuca sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*

RYU, Jung A* · KIM, Chang Kil¹ · LEE, Hyun Suk · CHOI, Kyung Bae · YANG, Deok Chun²

Kyungbuk Agriculture Technology Administration, Taegu, 702-320, Korea

¹Dept. of Horticulture, Sangju National University, Sangju, 742-711, Korea

²Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345, Korea

ABSTRACT *Agrobacterium tumefaciens* MP90 harboring PAT (phosphinothricin acetyltransferase) and NPT II - GUS gene were used for the genetic transformation of lettuce (*Lactuca Sativa* L.). Shoot regeneration from cotyledon explants were obtained from the MS medium supplemented with 0.1 mg · L⁻¹ NAA, 1.0 mg · L⁻¹ 2ip, 50 mg · L⁻¹ kanamycin and 500 mg · L⁻¹ carbenicillin after cocultivation with *A. tumefaciens* for 2 days. Kanamycin resistance test of transgenic plants indicated that the NPT II gene was integrated into the lettuce genome and was stably expressed. PCR and northern blot analysis indicated that bialaphos resistance gene (PAT) was stably integrated into the lettuce genome. The transgenic plant sprayed with Basta (1500×) remained healthy with continuous growth, while the control group exhibited fatality.

Key words: Bialaphos, kanamycin, northern blot, PCR

서 론

상추는 세계적으로 중요한 샐러드용 채소의 하나로 한국에서도 수요가 계속적으로 증가하고 있다. 최근 분자생물학의 발달로 다양한 유전자를 클로닝할 수 있게 됨에 따라 획득된 많은 유전자를 식물 세포 내로 도입하려는 연구가 활발히 진행되어 상추에서도 안정적 형질전환법 개발을 비롯하여 오존 내성 유전자, 저온관련 유전자, *Amaranthus* 저장단백질 유전자 등 형질전환 기법을 이용한 작물 개량 연구가 보고되고 있다 (Chung et al. 1998; Jeong et al. 2000; Kim and Kim 2000; Torres et al. 1993).

제조제로 사용된 bialaphos는 "Basta"라는 상품명으로 판

매되는 비선택성 제조제로서 글루타민 합성 효소를 비가역적으로 저해하여 식물체 내에 암모니아의 축적과 광합성의 억제 유도시킴으로써 식물체를 고사시킨다고 알려져 있다 (Manderscheid and Wild 1986; Sauer et al. 1987). 그러나 *S. hygroscopicus*에서 제조제 bialaphos의 주요 성분인 PPT의 NH₂를 acetyl화하여 제조활성을 잃게 하는 phosphinothricin acetyltransferase가 발견되고 이 유전자 (bar)를 클로닝함으로써 작물에 제조제 저항성의 도입이 가능하게 되었다 (Thompson et al. 1987; White et al. 1990).

본 실험에서는 bar 유전자의 GC content를 조절하여 인공으로 합성된 제조제 저항성 유전자인 PAT 유전자 (NCBI Accession No-A02774)를 상추에 도입코자 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 형질전환을 시도하여 제조제 저항성 상추를 선발하였던 바, 그 결과를 보고하는 바이다.

*Corresponding author. Tel 053-320-0289 Fax 053-321-7730

E-mail jahryu@hanmail.net

재료 및 방법

식물재료

상추 (*Lactuca sativa* L. cv. Green Skirt. 청치마) 종자는 70% 에탄올로 30초, 전착제를 함유한 1% NaOCl로 15분간 표면 살균한 후 3~4회 멸균수로 수세하여 생장조절제를 첨가하지 않은 MS배지에서 발아시켰으며, 4일 후 자엽만을 절단하여 형질전환을 위한 공동배양에 사용하였다.

형질전환용 균주

본 실험에는 독일 Hoechst사에서 인공합성한 제초제 저항성 유전자인 phosphinothricin acetyltransferase (PAT) gene을 사용하였다. 공시 균주는 선발 marker인 GUS-NPT II 유전자와 PAT 유전자가 재조합되어진 binary vector를 함유한 *Agrobacterium tumefaciens* strain MP90을 사용하였다. *Agrobacterium*은 28°C 암상태에서 50 mg · L⁻¹ kanamycin을 넣은 LB (1% Bacto-peptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 1% NaCl) 배지에서 배양하였다.

식물체 재분화와 형질전환

형질전환을 위해 발아 후 4일 된 상추 자엽을 *Agrobacterium* 현탁액에 10분간 침지하였다가 멸균된 필터 페이퍼에 흡수한 후 0.1 mg · L⁻¹ NAA와 1 mg · L⁻¹의 2ip, 3% sucrose, 0.2% gelrite를 첨가한 배지에서 2일간 공동배양하였다. 공동배양 후 자엽은 형질전환된 신초의 분화와 성장을 위해 50 mg · L⁻¹ kanamycin, 500 mg · L⁻¹ carbenicillin을 첨가한 선발 배지 (MS+NAA 0.1 mg · L⁻¹+2ip 1.0 mg · L⁻¹)로 옮겨 주었다. 선발배지에서 유도된 신초는 발근을 위해 kanamycin 25 mg · L⁻¹, cabenicillin 250 mg · L⁻¹을 첨가한 MS 배지에 배양하고 뿌리가 형성되면 온실로 옮겨 재배하였다.

형질전환체의 선발

선발배지에서 유도된 신초는 형질전환체의 선발을 위해서 kanamycin에 대한 내성 여부를 검정하였다. 200 mg · L⁻¹의 고농도의 kanamycin이 첨가된 MS 배지에 leaf disk를 1 cm² 크기로 잘라 16시간 광주기로 배양하였다. Kanamycin에 대해 내성이 있는 것으로 확인된 식물체에 대해서는 유전자 분석 및 포장검정을 실시하였다.

형질전환체의 도입 유전자 확인

항생제 첨가 배지에서 선발된 식물체는 유전자 도입 여부를 확인하기 위해 PCR (Perkin Elymer)을 수행하였다. PCR

반응은 96°C에서 5분간 predenaturation한 후 96°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 2분간 second-extension을 36회 반복한 후 72°C에서 15분간 post-extension하는 조건으로 하였고, PCR 산물은 1% agarose gel 전기영동으로 확인하였다. Total RNA를 RNA 추출 kit (iNtRon)를 이용하여 추출하고 이를 Northern blot 분석에 사용하였다. 10 µg의 total RNA를 formaldehyde를 함유하는 1% agarose gel에서 전기영동한 다음 nylon membrane에 transfer 하였으며 ³²P로 labelling된 PAT유전자를 probe로 이용하여 hybridization 시켜 분석하였다.

제초제 저항성 검정

형질전환의 과정을 거쳐 얻어진 식물체에 대해서는 포트에 이식하여 약 4주간 생육시켜 안정된 활착과 생육을 확인한 후 제초제 저항성 검정을 실시하였다. 저항성 검정은 시판 제초제인 Basta 액제 (유효성분 18%, (주)경농)를 1500배액의 농도로 살포하여 형질전환체와 대조식물체의 생육을 관찰하였다.

결과 및 고찰

상추 형질전환 및 선발

형질전환을 위해 상추 자엽을 PAT유전자를 포함하는 *Agrobacterium*과 공동배양한 후 50 mg · L⁻¹ kanamycin과 500 mg · L⁻¹ carbenicillin이 첨가된 선발 배지에서 배양하였다. 배양 1주경 자엽 절단면에서 캘러스가 형성되기 시작하였으며 배양 3주 후에는 초록색의 신초가 다수 유기되었다. 그러나 유기된 신초의 대부분은 1~2주 안에 성장을 멈추고 백화하였다. 성장을 계속하는 신초는 새로운 배지로 옮겨 성장을 유지시켜가면서 선발을 계속하였다 (Figure 1). 발근 배지에 kanamycin이 첨가되는 경우는 뿌리의 형성이 어려우므로 재분화 배지에 비해 발근 배지의 kanamycin의 양을 줄이는 것이 발근에 효과적이라는 보고 (Eliseu et al. 1994; Yang et al. 1998)에 따라 본엽 4매 이상으로 성장한 신초는 25 mg · L⁻¹로 kanamycin의 양을 줄인 배지에서 발근을 유도하였다. 발근 배지로 옮겨진 신초 중 50%는 뿌리가 전혀 유도되지 않거나 뿌리의 발달이 정상적이지 못하였으며 이 개체는 이후의 PCR 반응에서 형질전환 되지 않는 개체임이 확인되었다. 따라서 항생제 배지에서의 발근 및 뿌리의 성장 확인을 통해 형질전환체를 선발하는 것이 가능할 것으로 사료되었다.

NPT II 유전자는 많은 식물종에 있어 유용한 선발마커로 사용되고 있다 (Fraley et al. 1986). 그러나 대상 식물체의 kanamycin 내성정도는 조직에 따라 차이를 보인다 (Raffaella et al. 1988). 상추 자엽의 kanamycin 내성은 50 mg · L⁻¹에서

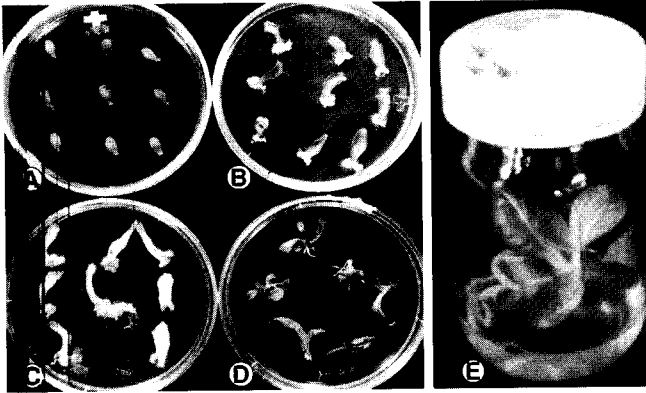


Figure 1. Production of herbicide-resistant transgenic lettuce plants on the selection medium. (A) 1 day after cultivation; (B) 10 days after cultivation; (C) 4 weeks after cultivation; (D) selection of regenerated shoots; (E) rooting of regenerated shoot on rooting medium.



Figure 2. Resistance of leaves of control plant and transgenic plant (arrow) on MS medium supplemented with 200 mg · L⁻¹ kanamycin.

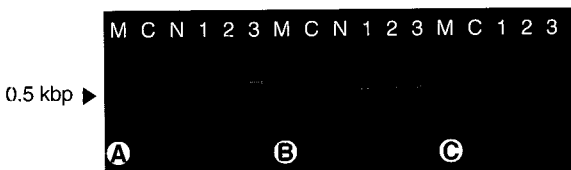


Figure 3. Agarose gel electrophoresis of PCR amplification product of control plants (lane C) nontransgenic plant (lane N) and transgenic plants (lane 1-3). PCR products of NPT II (A), GUS (B) and PAT (C) gene were 700 bp, 515 bp and 371 bp respectively.

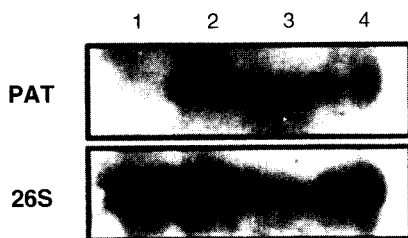


Figure 4. Expression of PAT gene of transgenic lettuce. Total RNA was extracted from leaves of control plant (1) and transgenic plant (2-4). Total RNA was fractionated by electrophoresis and probed with PAT gene.

0%에 이르는 결과를 보였다 (data 미제시). 따라서 형질전환 과정을 거쳐 얻어진 상추 식물체의 엽절편을 잘라 200 mg · L⁻¹ kanamycin 배지에서 내성 검정을 실시하였다. 배양 4주 후 형질전환된 개체의 잎은 초록색의 callus가 형성되는 반면 대조식물체의 잎은 고사하였다 (Figure 2). 이는 NPT II 유전자가 형질전환체에 도입되어 형질이 발현됨을 시사하는 것이다.

상추 형질전환체의 도입 유전자 확인

상추 genome 내로 NPT II 및 GUS 유전자의 도입을 확인하기 위해 PCR을 수행하였다. 형질전환하지 않은 대조 식물체와 형질전환 과정을 거쳐 얻어진 식물체 중 발근이 정상적이지 않은 식물체는 유전자의 증폭이 전혀 이루어지지 않았고 200 mg · L⁻¹의 고농도의 항생제에 저항성을 보인 형질전환 식물체는 NPT II, GUS에 해당하는 700 bp와 515 bp에서 뚜렷한 밴드를 보여 유전자가 도입되었음이 확인되었다 (Figure 3A, B). 또한 이 개체에 대해서는 제초제 저항성 유전자의 도입 여부도 확인하기 위해 PAT 유전자에 대해 PCR을 수행하였다. NPT II 유전자의 PCR 결과와 마찬가지로 형질전환 하지 않은 식물체에서는 유전자의 증폭이 이루어지지 않았고, NPT II 유전자가 도입된 모든 형질전환 식물체는 예상되는 크기인 371 bp 단편이 증폭되어 PAT 유전자가 상추 genome 내로 도입되었음이 확인되었다 (Figure 3C). PCR결과 PAT 유전자의 도입이 확인된 개체에 대해서는 Northern blot 검정을 통해 제초제 저항성 유전자가 안정적으로 발현됨을 확인하였다 (Figure 4). 공동배양에 사용한 절편체 대한 형질전환 개체의 비율은 2%로 'South Bay' 품종을 재료로 한 Torres 등 (1987)의 3~6%보다는 다소 떨어지는 결과를 보였다.

제초제 저항성 검정

기내에서 정상적인 생육을 보인 형질전환 식물체는 포트로 이식하고 대조구와 비교하여 생육을 관찰하였다. 이식 2주경



Figure 5. Bioassay with bialaphos of transgenic lettuce. Control plant (right) and transgenic plant (left) were sprayed with basta (1500 ×). The photograph was taken at 10 days after spraying.

에 뿌리가 안정적으로 활착하였으며 대조구와 비교하여 정상적인 생육을 보였다. PAT 유전자 발현 검정을 위해 이식 4주 후 시판 제초제인 Basta를 1500배액의 농도로 충분히 살포한 결과 제초제 처리 3일 후부터 대조식물체는 활력을 잃으면서 잎이 말리는 현상을 보이다가 10일경에 완전히 고사한데 비해, 형질전환 식물체에서는 아무런 저해를 받지 않고 왕성한 생육을 유지하였다 (Figure 5). 제초제에 영향을 받지 않고 살아남은 개체는 5개월 후 정상적으로 추대 및 개화하여 유전자 도입이 추대 및 개화에 영향을 미치지 않음이 확인되었다.

형질전환이 확인된 식물체에 대해서는 PAT 유전자 단백질의 발현 분석을 위해 western blot 및 전환 형질이 후대에 안정적으로 발현되는지에 대한 연구가 필요할 것이라 생각된다.

적 요

상추에 제초제 저항성을 도입하기 위해 상추 자엽 조직을 NPT II-GUS 및 제초제 저항성 유전자 (PAT)가 삽입된 *A. tumefaciens* MP 90과 2일간 공동배양한 다음 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2ip, $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin, $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ carbenicillin을 첨가한 MS 배지에 배양하여 식물체를 재분화시켰다. 재분화 식물체는 kanamycin 내성 검정을 통해 NPT II 유전자의 도입과, PCR, Northern blot 분석을 통해 제초제 저항성 유전자가 식물체의 게놈상에 삽입된 형질전환체임이 확인되었다. 또한 1500배액의 농도로 Basta를 살포한 결과 살포 10일 후 대조 식물체는 완전히 고사하는 데 반해 형질전환체는 지속적인 생육을 보여 얻어진 형질전환 상추가 제초제 저항성 개체임이 확인되었다.

인용문헌

- Chung JD, Kim CK, Jo JK (1998) Expression of chinese cabbage Glutathione Reductase gene in lettuce (*Lactuca sativa* L.). Korea J. plant Tissue Culture. 25:267-271
- Eliseu S, Figueiredo LFA, Monte-Neshich DC (1994) Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) cv. Montiqueira using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of herbicide resistance. Plant cell Rep 13:666-670
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB (1986) Genetic transformation in higher plant. Crit Rev 4:1-46
- Jeong JH, Yang DC, Jang HG, Paek KY (2000) Transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) using cold regulated gene (BN115). Korean J Plant Tissue Culture 27:7-12
- Kim TG, Kim YS (2000) Heterologous expression of AmA1 gene encoding storage protein of Amaranthus in transgenic Lettuce (*Lactuca sativa*). J Kor Soc Hort Sci 41:495-498
- Manderscheid R, Wild A (1986) Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum* L. J. of Plant Physiology 123:135-142
- Raffaella T, Mario Y, Richardo JO, Giorgio A, Eugenio B (1988) Genetic transformation of potato (*Solanum tuberosum*) : An efficient method to obtain transgenic plants. Plant Science 59:175-181
- Rathore KS, Chowdhury VK, Hodges TK (1993) Use of bar as a selectable marker gene and for the production of herbicide resistant rice plants from protoplast. Plant Mol Bio 21:871-884
- Sauer H, Wild A, Ruhle W (1987) The effect of phosphinothricin (glufosinate) on the photosystem II. The causes of inhibition of photosynthesis. Z. Naturforsch 42:270-278
- Spencer TM, Gordon-Kamma W, Daines RJ, Start WG, Lemaux PG (1990) Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture. Theor Apple Genet 79:625-634
- Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Cramer R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J (1987) Characterization of herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces Hygroscopicus*. EMBO J. 6:2519-2523
- Torres AC, Cantliffe DJ, Laughter B, Bieniek M, Nagata R, Ashraf M, Ferl RJ (1993) Stable transformation of lettuce cultivar South Bay from cotyledon explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 34:279-285
- Vasil V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK (1992) Herbicide resistance fertile transgenic wheat plants obtained by micro-projectile bombardment of regenerative embryogenic callus. Bio/technology 10:667-674
- White J, Chang SY, Biv MJ (1990) A cassette containing the bar gene of *Streptomyces Hygroscopicus*: a selectable marker for plant transformation. Nucl acids Res 18:1062-1065
- Yang DC, Min BH, Kwang TJ, Woo IS, Park EK (1998) Development of Basta resistant tobacco using artificial phosphinothricin acetyl transferase gene. Korean J Plant Res Culture 11:188-194