

사과 갈라 품종의 *Agrobacterium* 이용 형질전환에 영향을 미치는 요인

송관정^{1, 2*} · 성은수¹ · 황정환¹ · 제갈성¹ · 차지은¹ · 김정희¹ · 신용억¹

¹원예연구소, ²제주대학교 원예생명과학부

Factors Affecting the *Agrobacterium*-Mediated Transformation of 'Gala' Apple

SONG, Kwan Jeong^{1,2*} · SEONG, Eun Soo¹ · HWANG, Jeong Hwan¹ · JEGAL, Sung¹ · CHA, Ji Eun¹ · KIM, Jeong Hee¹ · SHIN, Yong Uk¹

¹National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon, 440-706, Korea

²Department of Horticultural Science, Cheju National University, Cheju, 690-756, Korea

ABSTRACT Some factors of wounding methods, solidifying agents, origin of leaf explants, conc. of acetosyringone, and MES affecting regeneration and transformation by *Agrobacterium tumefaciens* were investigated to establish an efficient transformation system of apple. Wounding by cutting the leaves merely showed the tendency of regeneration and transformation with higher efficiency compared with that of wounding by non-traumatic forcep when carrying out co-cultivation for three days after bacterial inoculation. While examining the solidifying agents of medium with the combination of agar (A)+Gelrite® (G) in g · L⁻¹, the higher concentration of Gelrite® increased the efficiency of regeneration. However, there was no difference in the efficiency of transformation from the treatments of 2.5 G, 3.5 A+1.2 G, and 7.0 G. The origin of leaf explants showed no difference statistically in the efficiency of regeneration and transformation, but that from the shoots of proliferation medium showed the tendency with higher efficiency. The concentration of above 0.1 mM acetosyringone had an increase in the efficiency of regeneration and transformation and the concentration of 0.15 mM had the highest efficiency of transformation in the treatment of acetosyringone with different concentration. There was no effect of MES on regeneration and transformation.

Key words: Efficiency, gene transfer, PCR, regeneration, southern blot

서 론

사과 갈라 품종은 고품질 조생종으로 전세계적으로 각광을 받고 있으며, 우리나라도 최근 다양한 갈라 변이 계통들이 소개되어 급속히 보급되고 있는 실정이다. 그런데 갈라 품종은 과실의 크기가 다소 작고 과즙이 적으며, 과숙시 과경부의 열과가 발생된다는 약간의 단점을 가지고 있어, 이들에 대한 개량이 요구되고 있다.

그러나 교배육종을 통한 이러한 소수형질의 개량은 유전자

조성이 매우 잠박하고 세대가 길며 식물체 크기가 큰 과수작물에 있어서는 극히 어렵다. 그러므로 형질전환은 사과와 같이 육종기간이 매우 긴 영년생 작물에서 특정 소수의 형질을 단기간에 개량시킬 수 있는 유용한 수단으로서 관심이 매우 높다.

사과 형질전환은 James 등 (1989)이 처음 보고한 이래, 여러 품종에서 재분화 및 형질전환이 연구되어 왔으나, 품종에 따른 반응의 차이가 크고 효율이 낮다 (Bolar et al. 1999; De Bondt et al. 1996; Puite and Schaart 1996; Song et al. 2000; Yao et al. 1995). 일반적으로 식물의 형질전환은 유전자 전이와 재분화라는 2단계로 크게 구분할 수 있고, 이에는 여러가지 요인이 복합적으로 관여한다고 알려져 있으나 사과의 경

*Corresponding author. Tel 064-754-3328 Fax 064-725-4905
E-mail kwansong@cheju.ac.kr

우에는 연구가 미미한 실정에 있다. 따라서 일반 작물의 형질 전환에서 중요하게 영향을 주는 것으로 알려진 몇 가지 요인에 대한 사과 갈라 품종의 형질전환을 연구하여 효율적인 형질 전환 기술을 확립코자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

사과 갈라 품종 (*Malus domestica* Borkh. cv. Gala)의 식물체가 이전의 Song et al. (2000)이 보고한 방법에 따라 기내에서 유지 증식되었다. 신초증식을 위한 계대배양 4주 후에 1.5 cm 이상 길이의 신초들은 유연의 신장을 유도하기 위하여 Bolar et al. (1999)가 사용한 사과 증식배지로부터 생장 조절제 조성이 0.3 mg · L⁻¹ IBA와 8.3 mg · L⁻¹ 2iP로 변형된 엽신장 배지로 옮겨 배양하였고, 배양 4주 후에 새로 완전히 전개된 직후의 유연을 형질전환에 이용하였다.

형질전환

엽신장 배지의 신초 유연을 절취하여 상단부와 엽병 조직을 제거하고, 하단부의 엽절편체를 수술용 핀셋 (non-traumatic forcep)으로 눌러 상처를 유도 (Norelli et al. 1996)한 후, binary vector pGA 1532 (Figure 1)를 포함하는 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404를 접종하였다. *Agrobacterium*의 배양은 Song et al. (2000)의 방법에 따라 수행하였으며, 이때 초기 배양농도와 병원성유도 농도는 각각 OD₆₀₀ 1.0 내외와 OD₆₀₀ 0.9 내외이다. 접종한 절편체는 3일간의 공동배양 후, 재분화 배지에서 4주 암배양, 2주 약광 배양과 2주 강광 배양단계를 차례로 진행하였고, 재분화 신초를 항생제 첨가 발근 배지에서 재선발한 후 순화하였다 (Song et al. 2000; Song and Seong 2000).

유전자 전이 및 재분화 단계에서 여러가지 요인이 형질전환에 미치는 영향을 살펴보고자, 상처유도 방법, 엽절편체 기원, acetosyringone의 농도, 재분화 배지의 고형물 조성과 pH 안정제인 MES [2-(N-Morpholino) ethansulfonic acid]의 첨가에 따른 신초 재분화율 및 형질전환율을 조사하였다. 상처

유도는 단순절단 또는 수술용 핀셋으로 눌러 처리하였고 엽절편체 기원은 증식배지와 엽신장배지에서 배양 4주 후의 신초 유래를 상호 비교하였다. Acetosyringone의 농도는 0~0.20 mM의 범위에서 0.05 mM 농도의 간격으로 처리하였으며 재분화 배지의 고형물 조성은 agar (A)와 Gelrite® (G)의 조합으로 7.0 A, 3.5 A+1.2 G 및 3.5 G 등 3수준 처리하였다. 형질전환율은 PCR 분석을 거쳐 목적 유전자의 삽입이 확인된 신초유도 절편체의 비율로 계산하였으며, 이들 잠정적인 형질전환체들은 southern blot 분석으로 재확인되었다.

형질전환 확인

DNA는 Shure 등 (1983)의 방법에 따라 추출하였고, PCR 반응은 최초 95°C에서 5분간 denaturation한 후, 95°C에서 30초간 denaturation, 65°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 elongation의 30회 반복한 후, 최종 72°C에서 7분간 elongation 과정으로 수행하였다. PCR 증폭에 사용한 primer는 *nptII* 유전자의 증폭을 위해서 5'-GAGGCTATTCGGC TATGACT-3'와 5'-AATCTGTGATGGCAGGTTG-3'을, *MdMADS2* 유전자의 증폭을 위해서는 5'-CAGAAGCCAT CTGTGTGTCA-3'와 5'-AGAGATAGATCGAGTCTAG G-3'을 사용하였다. 증폭된 DNA밴드의 크기는 각각 0.8 kb와 1.1 kb로서, 1.0% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. Southern blot 분석은 추출한 genomic DNA를 *EcoRI* 및 *HindIII* 또는 *HindIII*로 절단처리하여 0.7% agarose gel에서 전기영동한 후 nylon membrane에 전이하였다. Probe의 작성과 Hybridization은 *MdMADS2* 유전자가 증폭된 DNA절편체를 digoxigenin-11-dUTP labeling kit (Roche Cat. No. 15856140)를 이용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

엽절편체의 상처유도 방법이 형질전환에 미치는 영향을 알아보고자 단순절단과 절단 후 수술용 핀셋의 누름에 의한 전조직의 상처유도 처리한 결과, 통계적인 유의차는 없었으나 재분화율과 형질전환율이 단순절단 처리에서 보다 높은 경향을 나타냈다 (Table 1). 이는 Norelli 등 (1996)의 보고와는

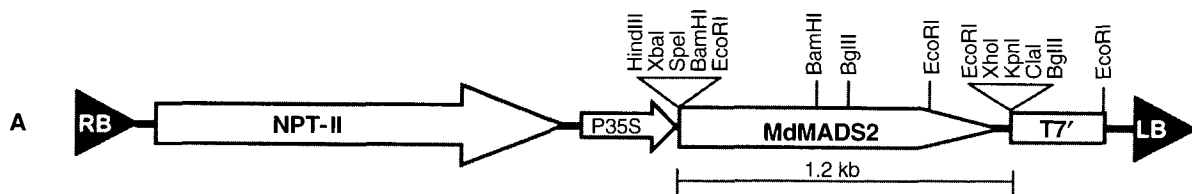


Figure 1. Schematic representation of the T-DNA of the binary vector pGA1532. Abbreviations: RB and LB, right and left border sequences from the vector T-DNA; *NPT-II*, coding region for the neomycin phosphotransferase gene; P35S, 35S promoter of CaMV; *MdMADS2*, coding region for the *MADS*-box gene #2 cloned from 'Fuji' apple; T7', termination signal of gene 7 pTiA6.

Table 1. Effects of leaf blade wounding on the efficiency of regeneration and transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in leaf explants of 'Gala' apple.

Wounding	Regeneration rate (%) ^z	Transformation efficiency (%) ^y
Cut	18.7 ± 1.8	2.0 ± 1.2
Crushed by non-traumatic forcep	40.0 ± 11.0	4.0 ± 1.2

^zEach value represents the mean ± SE of 3 replications with 50 explants per replication. The percentage numbers of explants with regenerants or transformants confirmed by PCR analysis were calculated.

Table 2. Comparison of solidifying agents affecting the efficiency of regeneration and transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in 'Gala' apple.

Solidifying agent (g · L ⁻¹) ^y	Regeneration rate (%) ^z	Transformation efficiency (%) ^y
7.0 A	8.0 ± 2.0 c ^x	3.3 ± 1.8
3.5 A ± 1.2 G	24.0 ± 8.1 b	2.0 ± 1.2
2.5 G	58.7 ± 3.5 a	2.0 ± 1.2

^yA, agar; G, Gelrite.

^zEach value represents the mean ± SE of 3 replications with 50 explants per replication. The percentage numbers of explants with regenerants or transformants confirmed by PCR analysis were calculated.

^xMean separation within columns by Duncan's multiple range test at $P=0.05$.

Table 3. Influence of the origin of leaf explants on the efficiency of regeneration and transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in 'Gala' apple.

Origin of leaf explants	Regeneration rate (%) ^z	Transformation efficiency (%) ^y
Leaf elongation medium	33.3 ± 6.8	10.0 ± 2.0
Shoot proliferation medium	31.3 ± 7.0	4.7 ± 0.7

^zEach value represents the mean ± SE of 3 replications with 50 explants per replication. The percentage numbers of explants with regenerants or transformants confirmed by PCR analysis were calculated.

상반된 연구결과이나, 품종에 따른 차이로 보아진다. 또한 수술용 핀셋을 이용한 상처의 재유도는 작업과정의 복잡함과 비공을 고려할 때, 오히려 비효율적인 것으로 판단되었다.

Gelrite[®]를 이용한 항생제 첨가 고형배지에서 재분화 유도 과정 중에, McIntosh Wjick 품종과 비교하여 과수화(hyperhydration) 발생이 많았는데 (data not shown), 이를 억제하여 먼저 재분화 신초발생 및 형질전환율을 제고하고자 배지의 고형물 조성을 달리하여 처리한 결과, Table 2에서와 같이 Gelrite[®] 비율이 높을수록 재분화율은 높게 나타났으나, 형질전환율에 있어서는 처리 간에 차이가 없어, Gelrite[®]가 오히려 과수화 신초 및 escape의 발생을 증가시키는 것으로 나타났다. 이는 N6배지의 경우 사과에서 일반적으로 발생하는 과수화 현상을 줄일 수 있으며, agar 또는 Gelrite[®] 단독처리보다는 오히려 혼용처리에서 과수화를 줄이고 정상신초의 발생을 증가하나, 형질전환율은 오히려 agar의 비율이 높을수록 증가하였다는 Bolar 등 (1999)의 연구결과와 유사하였다. 그러므로 실험의 효율면에서 사과 갈라 품종의 형질전환에서는 먼저 고형물로서 agar를 단독으로 사용하는 것이 바람직하다고 보아졌다.

형질전환을 위한 엽절편체의 기원이 재분화 및 형질전환율에 미치는 영향을 살펴보고자, 증식을 위한 계대배양 4주 후

의 유엽과 엽신장 배지로 옮긴 4주 후의 유엽의 효과를 비교하였다. Table 3에서와 같이 엽절편체의 기원에 따른 재분화율의 차이는 없었으나, 증식배지에서의 유엽을 사용할 경우 형질전환율이 증가하는 경향을 나타냈다. 이는 갈라 품종의 경우 다른 품종에서와는 달리 증식배지에서도 발육이 왕성한 새로운 유엽을 선별할 수 있는 식물적 특성을 가지고 있기 때문인 것으로 보인다. 그러므로 이후의 실험은 증식배지 기원의 유엽을 단순절단하여 상처를 유도한 후 agar 배지에서 재분화를 유도하는 과정으로 수행되었다.

일반적으로 병원성유도 배지에 acetosyringone의 첨가는 형질전환율을 증가시킨다고 알려져 왔으나, 작물이나 품종에 따른 적정농도에 대한 연구는 미미하다 (Zhang et al. 2000). Acetosyringone의 농도별 재분화 및 형질전환의 반응을 분석한 결과, 0.1 mM 이상의 첨가가 재분화율과 형질전환율을 유의하게 증가시켰는데, 0.15 mM의 농도에서 형질전환율이 가장 높은 경향을 보였다 (Table 4). 이는 사과의 경우 0.1 mM acetosyringone의 병원성유도 배지 첨가가 접종 절편체의 높은 GUS 활성을 나타내었고, 공동배양 단계까지 연장사용은 처리효과의 차이가 없다는 보고와 일치하였다 (James et al. 1993).

또한, 기관형성과정에서 배지의 pH가 작물에 따라 크게 영

Table 4. Effect of acetosyringone on the efficiency of regeneration and transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in ‘Gala’ apple.

Concentration (mM)	Regeneration rate (%) ^z	Transformation efficiency (%) ^z
None	7.5 ± 2.5 c ^y	2.5 ± 2.5 b
0.05	12.5 ± 2.5 bc	0.0 ± 0.0 b
0.10	25.0 ± 5.0 a	7.5 ± 2.5 ab
0.15	30.0 ± 5.0 a	15.0 ± 0.0 a
0.20	30.0 ± 5.0 a	7.5 ± 2.5 ab

^zEach value represents the mean ± SE of 2 replications with 20 explants per replication. The percentage numbers of explants with regenerants or transformants confirmed by PCR analysis were calculated.

^yMean separation within columns by Duncan’s multiple range test at *P*=0.05.

Table 5. Effects of 2-(N-Morpholino) ethansulonic (MES) supplemented in the regeneration medium on the efficiency of regeneration and transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in ‘Gala’ apple.

MES (g · L ⁻¹)	Regeneration rate (%) ^z	Transformation efficiency (%) ^z
None	22.0 ± 3.1	8.7 ± 1.3
MES 100	20.0 ± 3.5	8.0 ± 2.0

^zEach value represents the mean ± SE of 3 replications with 50 explants per replication. The percentage numbers of explants with regenerants or transformants confirmed by PCR analysis were calculated.

향을 미친다고 알려져 있으며, 이는 초기 배양배지의 pH가 배양기간이 지나면서 낮아지기 때문이다 (Cho et al. 1992; Kenneth & Jacqueline 1986). 사과에서도 원충능을 높이고 배지의 pH변화를 줄일 수 있는 simplified induction medium (SIM) 배지의 사용이 연구한 바가 있으나, 이 경우 SIM배지가 사과조직의 재분화를 억제하는 효과로 인하여 보다 깊은 연구의 필요성이 제안되어 왔다 (James et al. 1993). Table 5에서와 같이, pH 안정제인 MES의 첨가는 재분화와 형질전환에 영향하지 않은 것으로 나타났는데, 이는 Cho et al. (1992) 이 용담에서 수행한 연구결과에서와 같이 식물의 종에 따른 반응의 차이로 보아졌다.

항생제가 첨가된 발근배지에서의 재선발 과정을 거친 식물체 내로의 목적유전자의 삽입 여부를 확인하기 위하여 순화 식물체의 genomic DNA를 추출하여 PCR 분석을 실시한 결

과, 형질전환체에서는 *nptII* (0.8 kb)와 *MdMADS2* (1.1 kb) 유전자를 확인할 수 있었으며 (Figure 2), 이는 southern blot 분석을 통하여 재확인하였다 (Figure 2; Table 2). 항생제 첨가 발근 배지에서 재선발된 총 72개 개체로부터 67개 개체에서 항생제 선발 유전자의 삽입이 확인되어 사과에서 93.1%의 높은 비율로 간접선발이 가능하였고, 이 중 91.0%가 목적 유전자를 가지고 있는 것으로 나타났다 (data not shown).

적 요

사과 갈라 품종의 고효율 형질전환 기술체계를 확립하기 위하여 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 관여하는 상처유도 방법, 배지 고형물, 엽절편체 기원, acetosyringone의 농도와 MES첨가 등 몇 가지 요인이 재분화 및 형질전환에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 엽절편체의 상처유도는 수술용

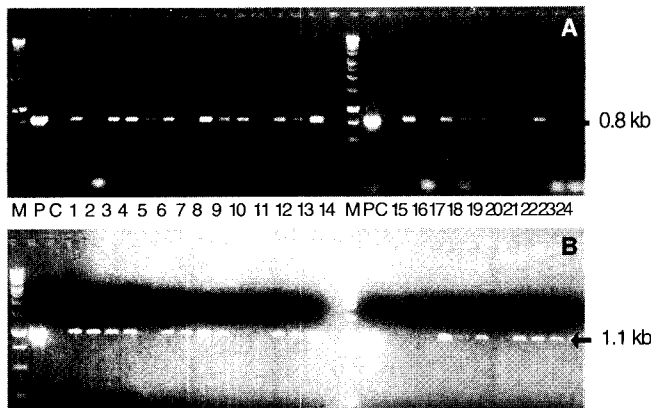


Figure 2. PCR analysis of putative transgenic apple plants. PCR bands were detected for both the *npt II* (A) and *MdMADS2* genes (B). M, Marker; P, Plasmid (positive control); C, Control (negative control). Lane 1-24, putative transformants. No bands represent the non-transformants (lane 11 and 20).

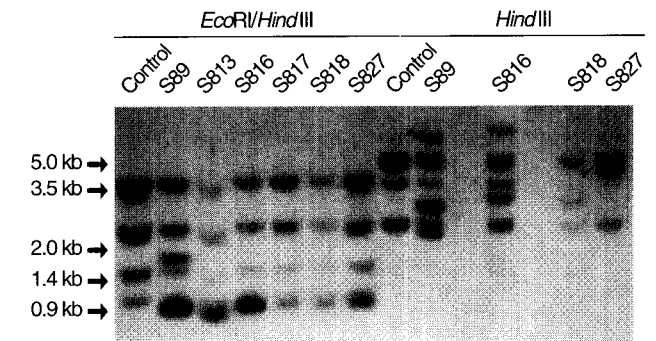


Figure 3. Southern blot analysis of apple plants transformed with *MdMADS2*. The genomic DNA was digested with *EcoRI/HindIII* or *HindIII* and probed with digoxigenin-labeled *MdMADS2* DNA.

핀셋 (non-traumatic forcep)의 사용보다는 단순한 절단 후 균접종과 3일 공동배양을 할 경우 재분화와 형질전환율이 더 증가하는 경향을 나타냈다. Agar (A)와 Gelrite® (G)의 조성 에 따른 배지 고형물의 처리에서는 Gelrite의 농도가 높을수록 재분화율이 증가하였으나, 형질전환율에 있어서는 2.5 G, 3.5 A+1.2 G 및 7.0 A의 처리 간에 차이가 없었다. 엽신장배 지 또는 증식배지 유래가 재분화 및 형질전환율에 유의한 차 이를 보이지는 않았으나, 증식배지 유래가 형질전환율을 더 높이는 경향을 나타냈다. Acetosyringone은 0.1 mM 이상의 농도가 첨가할 경우 높은 재분화 및 형질전환을 나타냈고, 0.15 mM의 농도에서 가장 높은 형질전환율을 나타냈다. MES의 재분화와 형질전환에 미치는 영향은 나타나지 않았다.

인용문헌

- Bolar JP, Brown SK, Norelli JL, and Aldwinckle H** (1999) Factors affecting the transformation of Marshall McIntosh apple by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss Org Cult* **55**:31-38
- Cho MS, Chang JJ, and Kwon ST** (1992) Effects of culture conditions on micropropagation of *Gentiana axillariiflora* var. *coreana*. *Kor J Plant Tiss Cult* **19**:357-362
- De Bondt A, Eggermont K, Penninckx I, Goderis I, and Broekaert WF** (1996) *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep* **15**:549-554
- James DJ, Passey AJ, Barbara DJ, and Bevan MW** (1989) Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Rep* **7**:658-661
- James DJ, Uratsu S, Cheng J, Negri P, Viss P, and Dandekar AM** (1993) Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. *Plant Cell Rep* **12**:559-563
- Kenneth CT and Jacqueline AC** (1986) Shoot and root organogenesis of *Camellia sasanqua*. *Plant Cell Rep* **5**:381-384
- Norelli J, Mills J, and Aldwinckle H** (1996) Leaf wounding increases efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. *HortScience* **31**:1026-1027
- Puite KJ and Schaart JG** (1996) Genetic modification of the commercial apple cultivars Gala, Golden Delicious and Elstar via an *Agrobacterium*-mediated transformation method. *Plant Sci* **119**:125-133
- Shure M, Wessler S, and Fedoroff N** (1983) Molecular identification and isolation of the Waxy locus in Maize. *Cell* **35**:225-233
- Song KJ, Ahn SY, Hwang JH, Shin YU, Park SW, and An G** (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation of 'McIntosh Wijcik' apple. *J Kor Soc Hort Sci* **41**:541-544
- Song KJ and Seong ES** (2000) Kanamycin concentration for selection of 'McIntosh Wijcik' transgenic apple. 2000. *Kor J Hort Sci & Technol* **18**:811-814
- Yao JL, Cohen D, Atkinson R, Richardson K, and Morris B** (1995) Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala. *Plant Cell Rep* **14**:407-412
- Zhang FL, Takahata Y, Watanabe M, and Xu JB** (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*). *Plant Cell Rep* **19**:569-575

(접수일자 2001년 6월 25일)