

# ***Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 벼의 형질전환 효율의 검토 및 내한성 관련 GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase) 유전자의 형질전환**

서미숙 · 배창휴 · 최대옥<sup>1</sup> · 임성렬<sup>2</sup> · 서석철<sup>3</sup> · 송필순<sup>4</sup> · 이효연<sup>\*</sup>  
순천대학교 농과대학, <sup>1</sup>순천대학교 자연과학대학, <sup>2</sup>한림대학교 자연과학대학, <sup>3</sup>농촌진흥청 농업과학기술원,  
<sup>4</sup>금호생명공학연구소

## **Investigation of Transformation Efficiency of Rice Using *Agrobacterium tumefaciens* and High Transformation of GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase) Gene Relative to Chilling Tolerance**

SEO, Mi-Suk · BAE, Chang-Hyu · CHOI, Dae-Ock<sup>1</sup> · RHIM, Seong-Lyul<sup>2</sup> · SEO, Suk-Chul<sup>3</sup> ·  
SONG, Pili-Soon<sup>4</sup> · LEE, Hyo-Yeon<sup>\*</sup>

College of Agricultural & Life Science, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea

<sup>1</sup>College of Natural Science, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea

<sup>2</sup>College of Natural Science, Hallym University, Chuncheon, 200-702, Korea

<sup>3</sup>National Agricultural Science and Technology Institute, RDA, Suwon, 441-707, Korea

<sup>4</sup>Kumho Life and Environmental Science Laboratory, Gwangju, 500-712, Korea

**ABSTRACT** This study has been focused on improving transformation efficiency of rice using *Agrobacterium tumefaciens*. We have demonstrated the effect of this system when the GPAT gene related to the cold-resistance was transferred by *Agrobacterium tumefaciens* in rice. Transformation conditions were modified using intron  $\beta$ -glucuronidase (GUS) expression as a reporter gene in the rice. In this study, mature seed-derived calli of rice (*Oryza sativa* L. cv. Dongjin) were pre-cultured for 3 days and then infected with *Agrobacterium*. When this infected calli were cultured in the dark for 10 days on co-culture medium containing 50 mg/L of CaCl<sub>2</sub>, 30 mg/L of acetosyringone, 2 mg/L of 2,4-D, 120 mg/L of betaine, high GUS expression was observed. In the present transformation system, the efficiency of transformation of GPAT gene was about 54%. Stable integration of GPAT gene into chromosomal DNA was proven by southern blot analysis of genomic DNA isolated from T<sub>0</sub> progenies. The progenies (T1 generation) derived from primary transformant of 5 lines were segregated with a 3 (resistant) : 1 (sensitive ratio) in medium containing hygromycin. This high frequency transformation system can be used as a useful tool in transformation of another monocotyledon.

**Key words :** *Agrobacterium*, co-culture, GPAT gene, transformation efficiency

## 서 론

*Agrobacterium*을 매개로 한 형질전환법은 다른 형질전환 방법에 비해서 외부의 특정 유전자가 식물 염색체에 도입된 후 그 후대에도 안정되게 발현하는 특징을 가지고 있기 때문에 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물의 형질전환에도 널리 이용되고 있다. 벼를 포함하여 단자엽 식물의 형질전환이 가능하게 된 것은 최근 10년 동안 세계 각지의 연구실에서 형질전환에 관련된 많은 연구가 이루어졌기 때문이다 (Uchimiya and Toriyama 1991; Hiei et al. 1994; Zhang et al. 1997; Lee et al. 1998; Kwon et al. 2000). 이러한 단자엽 식물인 벼는 *Agrobacterium* 균주에 대해서 비숙주 식물이기 때문에 기존의 담배 등과 같은 쌍자엽 식물과는 다른 형질전환방법이 여러 측면에서 검토되어야 한다. 또한 쌍자엽 식물과 비교해서 형질전환 효율이 낮은 것과 벼 품종간에 식물체 재분화 능력 (Kwon et al. 2000) 및 형질전환의 효율 (Henry et al. 1994; Hiei et al. 1994; Lee et al. 1998; Oh et al. 2000)에 큰 차이점을 보이는 것도 앞으로 개선되어야 할 과제이다. 따라서 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법을 캘러스에 적용하여 형질전환 효율을 증가시키기 위해서는 *Agrobacterium* 내의 T-DNA가 식물세포 안으로 잘 도입될 수 있는 조건을 확립하는 것과 유전자가 도입된 세포가 정상적으로 세포 분열하여 식물체의 재분화가 효율적으로 이루어지는 배양계의 확립이 중요하다. 지금까지 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환연구는 T-DNA 전이에 필요한 acetosyringone의 처리농도, 공동배양 기간, 광의 유무 등이 형질전환 효율에 영향을 미치는 것으로 보고되었다 (Cheng et al. 1997; Hiei et al. 1994; Zhang et al. 1997).

본 연구는 *Agrobacterium* 내의 T-DNA가 식물세포의 염색체에 도입되는 과정에서 영향을 줄 것으로 생각되는 여러 요인들을 GUS유전자의 발현을 통해서 조사하였다. 그리고 그 연구 결과에서 검토된 최적의 형질전환방법을 사용하여 농업적으로 이용가치가 높은 GPAT 유전자 (phosphatidyl glycerol의 지방산 불포화도를 변화시킴으로써 내한성을 갖게 하는 유전자)를 동진벼에 도입하고, 재분화된 식물체로부터 형질전환체의 빈도를 조사하는 것이 본 연구의 최종 목적이다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 캘러스 유도

본 실험에 사용된 벼 (*Oryza sativa* L.)는 남부지방에서 많이 재배되고 있는 동진 품종의 완숙 종자를 이용하였다. 벼의 종피를 제거하고 70% 에탄올에서 1분간 교반한 후 4% sodium hypochloride 용액 (200  $\mu$ L의 Tween 20 첨가)에 15분

간 교반하면서 표면 살균하였다. 살균된 종자를 멸균수에 3회 이상 세척하고 2,4-D 2 mg/L, 포함된 N6 (Chu et al. 1975) 캘러스 유도배지 (Table 1)에 종자를 치상하였다. 25°C  $\pm$  1, 3000 lux의 연속광 조건에서 20일간 배양하여 callus를 유도하였다. 완숙종자의 배유와 자엽부분을 핀셋으로 제거하고 캘러스 부분만을 채취하여 이 중 갈변되었거나 점성물질이 붙어 있는 캘러스를 제거한 후에 실험재료로 이용하였다.

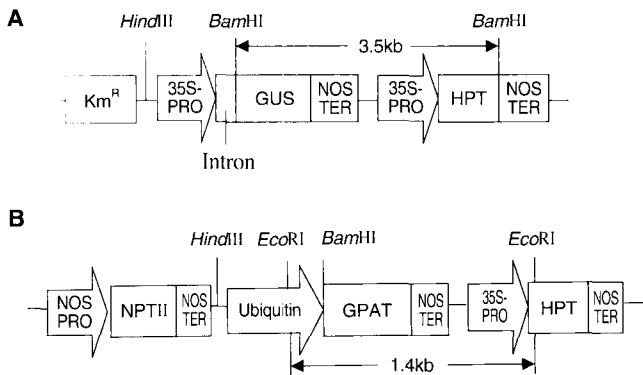
### 형질전환 vector 및 *Agrobacterium* 배양

캘러스내의 형질전환 효율을 조사하기 위하여 사용된 vector는 pIG121Hm으로서 T-DNA 내부에 intron GUS ( $\beta$ -glucuronidase), hygromycin phosphotransferase (HygR)와 kanamycin 저항성 유전자를 포함하고 있다 (Figure 1A). pIG121Hm 증식은 *E. coli* JM109를 숙주로 이용하였고, plasmid DNA의 추출은 Birnboim과 Doli (1979)의 방법을 이용하였다. 추출된 pIG121Hm은 freezing-thawing 방법을 이용하여 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101에 형질전환시켰다. 형질전환된 균주는 hygromycin 50 mg/L, kanamycin 100 mg/L 첨가된 YEP 액체배지 (Table 1)에서 28°C, 24~36시간 배양한 후 그 이상 계대배양하지 않고 glycerol 60% 용액과 1:1로 혼합

**Table 1.** Media used for tissue culture and transformation of rice (*Oryza sativa* L.).

Medium	Composition
N6 callus induction	N6 <sup>1</sup> salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 2 mg/L 2,4-D, 3 g/L gelrite, pH 5.8
YEP	10 g/L Bacto Triptone, 10 g/L Bacto yeast extract, 5 g/L NaCl, 2 g/L D-Glucose, pH 7.2
AA suspension	AA <sup>2</sup> salts and amino acids, B5 vitamin, 20 g/L sucrose, 2 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L kinetin, 30 mg/L acetosyringone, pH 5.8
N6 Co-culture	N6 <sup>1</sup> salts and vitamin, 30 g/L sucrose, 10 g/L glucose, 2 mg/L 2,4-D, 30 mg/L acetosyringone, 3 g/L gelrite, pH 5.2
N6 Callus propagation	N6 <sup>1</sup> salts and vitamin, 30 g/L sucrose, 2 mg/L 2,4-D, 3 g/L gelrite, 250 mg/L carbenicillin, pH 5.8
MS Regeneration	MS <sup>3</sup> salts and vitamins, 15 g/L sucrose, 30 g/L sorbitol, 4 g/L casamino acids, 0.5 mg/L NAA, 2 mg/L BA, 0.5 g/L L-proline, 250 mg/L carbenicillin, (50 mg/L hygromycine), 4 g/L gelrite, pH 5.8
Root induction	MS <sup>3</sup> salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 100 mg/L myo-inositol, 50 mg/L hygromycin, 100 mg/L carbenicillin, 8g/L agar, pH 5.8

<sup>1</sup>Chu et al. 1975, <sup>2</sup>Toriyama and Hinata 1985, <sup>3</sup>Murashige and skoog 1962.



**Figure 1.** Schematic diagram of a part of the T-DNA region of transformation vector. (A) pIG121Hm : Km<sup>R</sup> Gene for kanamycin resistance; 35S-PRO, CaMV35S promoter; Intron, the first intron of the castor bean catalase gene; GUS gene; NOS-TER, 3' signal of nopaline synthase; HPT gene for hygromycin phosphotransferase (B) pBI101H-Ub : Km<sup>R</sup>, gene for kanamycin resistance; Ubiquitin promoter from maize; GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase from *A. Thaliana*; NOS-TER, 3' signal of nopaline synthase; Hyg<sup>R</sup>, gene for hygromycin resistance.

하여 -80°C에 보관하였다. Glycerol에 저장된 *Agrobacterium* 용액으로부터 10 µL을 채취하여 상기와 동일한 농도의 항생물질이 포함된 YEP 액체배지 5mL에 넣고 28°C, 24시간 배양하고 800 rpm에서 1분간 원심한 후 침전된 pellet을 acetosyringone을 함유한 AA액체배지에서 재현탁 (10<sup>7</sup> cell/mL)하였다.

전배양기간에 따른 GUS 유전자의 발현빈도

캘러스의 전배양 기간에 따른 *Agrobacterium* 감염 정도를 조사하기 위해서 상기의 종자로부터 유도된 캘러스를 table 1의 캘러스 유도배지에 0, 1, 3일간 각각 배양하였다. 배양된 각 처리구의 캘러스는 상기의 pIG121Hm 유전자가 포함된 *Agrobacterium* EHA101 균 현탁액에 5분간 침적시킨 후 공동배양배지 (Table 1) 위에서 28°C, 3일간 암배양하였다. 공동배양이 끝난 캘러스는 500 mg/L carbenicillin 첨가된 멸균수에서 3회 세척하고 250 mg/L의 carbenicillin 포함된 캘러스 증식배지에 25°C, 7일간, 연속광 조건에서 배양하였다. 배양된 캘러스로부터 GUS 유전자의 발현분석은 Jefferson 등(1987)의 방법에 따라 조사하였다.

공동배양기간에 따른 GUS 유전자의 발현빈도

공동배양기간에 따른 *Agrobacterium* 감염의 영향을 조사하기 위해서 3일간 전배양이 끝난 캘러스를 상기의 *Agrobacterium* EHA101 균현탁액에 5분간 침적시킨 후 여분의 수분을 제거하였다. 공동배양배지 위에 멸균된 여과지를 1장 깔고 균 접종된 캘러스를 치상한 후 28°C, 암조건에서 3, 6, 10, 15일간 각각 공동배양하였다. 공동배양이 끝난 각각의 처리구의 캘러스는 상기와 동일하게 제균 및 배양한 후 GUS 염색을 하였다.

공동배양배지 내의 조성에 따른 GUS 유전자의 발현빈도

*Agrobacterium* 감염에 영향을 줄 수 있는 공동배양배지의 첨가제 종류 및 농도에 따른 GUS 발현율을 다음과 같이 조사하였다.

CaCl<sub>2</sub>의 농도 : 공동배양배지 내의 CaCl<sub>2</sub>의 농도만을 0, 50, 150, 300, 600 (mg/L)으로 각각 조절하고 균접종된 캘러스를 각 처리구별로 치상하였다.

Acetosyringone의 농도 : Acetosyringone의 농도를 0, 10, 30, 50, 100 (mg/L)으로 각각 조절한 공동배양배지에 상기의 *Agrobacterium* EHA101 균접종 처리가 끝난 캘러스를 각 처리구별로 치상하여 공동배양하였다.

2,4-D의 농도 : 2,4-D 0, 1, 2, 4, 8 (mg/L)의 농도로 각각 조절된 공동배양배지에 균접종된 캘러스를 각 처리구별로 치상하여 공동배양하였다.

Betaine의 농도 : 공동배양배지 내의 betaine농도를 각각 0, 60, 120, 180 (mg/L)으로 조절한 후 균접종된 캘러스를 각 처리구의 배지에 치상한 후 배양하였다.

위의 모든 처리구의 캘러스는 10일간 28°C, 암조건에서 공동배양하였으며, 공동배양이 끝난 캘러스는 500 mg/L carbenicillin 첨가된 멸균수에서 3회 세척하고 250 mg/L의 carbenicillin 포함된 캘러스 증식배지에 25°C, 7일간, 연속광 조건에서 배양하였다. 배양된 캘러스로부터 GUS 유전자의 발현분석을 실시하였다.

GPAT 유전자의 형질전환

본 실험에 사용되는 GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase) 유전자는 *Arabidopsis*의 phosphatidylglycerol 지방산 포화도를 조절하는 효소 유전자로 내한성과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Yokoi et al. 1998). 이 유전자는 binary vector T-DNA 내부에 hygromycin phosphotransferase와 kanamycin 저항성 유전자가 함께 삽입된 유전자 (pBI101-Ub)로서 *Agrobacterium* EHA101 균주에 형질전환되어 있다 (Figure 1B). 벼 캘러스에 대한 GPAT 유전자의 형질전환방법은 전술한 pIG121Hm 유전자를 이용한 실험에서 GUS발현이 가장 효율 높게 나타난 조건을 사용하였다. 간단히 소개하면 2,4-D 2 mg/L 포함된 N6배지에서 3주간 유도된 캘러스를 채취하여 3일간 전배양한 후 *Agrobacterium*에 5분간 감염시켰다. 이러한 캘러스는 50 mg/L CaCl<sub>2</sub>, 30 mg/L acetosyringone, 2 mg/L 2,4-D, 120 mg/L betaine을 포함한 공동배지에 치상한 후 10일간 28°C에서 암배양하였다.

형질전환 식물체의 유도

공동배양된 캘러스로부터 *Agrobacterium*을 제거하기 위하여 캘러스를 carbencillin 250 mg/L 첨가된 멸균수로 3회 이상

세척하고 캘러스 증식배지 (Table 1)에 이식한 후 7일간 25 °C, 3000 lux의 명조건에서 배양하였다. 그 후 50 mg/L hygromycin과 250 mg/L carbenicillin을 포함한 MS (Murasige and Skoog 1962)재분화 배지 (Table 1)에 이식한 후 녹색의 싌초가 분화가 관찰되었을 때 성장조절물질이 첨가되지 않은 뿌리 유도 배지 (Table 1)에 이식하여 외형적으로 정상적인 식물체만을 선발하였다. 배양기에서 순화가 끝난 식물체는 pot에 옮겨서 온실의 자연광 조건에서 재배하였다.

### Southern-blot 분석

형질전환 식물체와 wild type 벼의 엽육조직 500 mg을 채취하여 액체질소로 분쇄시킨 후 Shure 등 (1983)의 DNA 추출 방법을 변형시켜 genomic DNA를 추출하였다. 먼저 2×추출 고정액 (0.6 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl pH7.5, 40 mM EDTA pH 8.0, 1% SDS)에 5 M Urea, 5% phenol을 넣고 교반하여 1×추출 용액을 만든 후 사용 직전까지 4°C에 냉장 보관하였다. 식물체를 액체 질소로 분쇄시킨 후 3~4배량의 1×추출 용액을 넣고 그것과 동량의 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25 : 24 : 1)을 첨가하여 교반하고 원심분리 (12,000 rpm, 5분)한 후 상층액을 얻었다. 이 상층액에 2배량의 에탄올을 첨가 침전시키고 원심분리하여 DNA를 추출하였다. DNA 20 µg을 Bam HI 제한효소로 절단한 후 전기영동에 의해 0.8% agrose gel에 분획한 후 nylon membrane에 전사시켰다. Hybridization은 Southern (1975) 방법에 따라 행하여졌다. Probe DNA는 pBluescript에 삽입된 GPAT의 cDNA (1.4 kb)를 Eco RI 제한효소 처리에 의해 단리하였고 [ $\alpha$ -32P] dCTP로 표지한 후 X-ray film에 10시간 동안 노출하였다.

### 형질전환 식물체의 T1세대 유전자검증

GPAT 유전자가 형질전환된 T<sub>1</sub> 세대의 식물체를 온실에서 재배한 후 외형적으로 정상이고 종자의 채종이 가능한 6개통의 식물로부터 종자를 각각 수확하였다. 채종된 각 계통의 종자로부터 종피를 벗기고 표면 살균한 뒤 hygromycin 50 mg/L 포함된 1/2 MS 배지에 파종하여 배양 14일 후에 저항성과 감수성 식물체의 분리비를  $\chi^2$  검정에 의해서 추정하였다.

## 결과 및 고찰

### 전배양 기간에 따른 GUS 유전자의 발현빈도

*Agrobacterium* 감염전 캘러스의 전배양기간에 따른 GUS 유전자의 발현 빈도는 table 2에서 보여준 것과 같이 3일간 캘러스 유도배지에 전배양한 처리구에서 가장 많은 GUS spot 수를 관찰하였다. 특히 전배양을 하지 않은 처리구에 비해서

는 약 2배의 증가를 보여주었다. 이러한 결과는 오옥신이 첨가된 새로운 배지에 일정기간 캘러스를 치상함으로써 기존의 캘러스로부터 세포분열이 활발한 새로운 세포군을 다량 확보할 수 있기 때문이고, 동시에 그러한 캘러스 집단은 *Agrobacterium* 감염에 대해서 대단히 용이할 것으로 생각된다. 또한 본 연구와 유사한 연구결과가 애기장대 식물의 형질전환 연구에서도 보고된 바가 있다 (Sangwan et al. 1992).

### 공동배양기간에 따른 GUS 유전자의 발현빈도

GUS 유전자의 발현빈도는 *Agrobacterium* 공동배양기간에 따라 많은 차이를 보여주었다 (Table 3). GUS의 spot수는 공동배양 6일부터 급격히 증가하기 시작하여 10일째 84.3개로 가장 많이 관찰되었으며, 기존의 싌험에서 많이 적용하고 있는 3일간의 공동배양 처리구에 비해서는 약 2.3배의 증가를 보여주었다. 또한 공동배양기간을 15일간 하였을 경우에는 오히려 GUS spot 수는 감소하였다 (Figure 2). 그 이유는 장기간 *Agrobacterium* 공동배양에 따른 균의 증가로 캘러스의 증식을 억제시키는 역할을 하였거나 또는 세포의 괴사 때문에 발생한 현상이라 생각된다. 본 연구 결과와 유사한 연구는 *Kalanchoe* (Jia et al. 1989)와 감귤속 식물 (Cervera et al. 1998)에서도 보고되었는데 이들의 연구에서도 공동배양기간을 기존의 3일보다 장기간 배양하였을 경우 형질전환율을 증가시키고 동시에 지나치게 장기간 배양하는 것은 형질전환 효율을 감소시킨다고 보고하였다. 따라서 식물의 형질전환 연구에 있어서 식물의 종류 또는 *Agrobacterium* 감염 재료에 따라서 미리 공동배양기간을 검토하는 것이 형질전환 효율을 높일 수 있는 하나의 방법으로 생각된다.

**Table 2.** Effect of pre-culture period on transient GUS expression.

pre-culture period	No. of blue spots/600 mg
0	158.76
1	199.05
3	308.97

Calli were co-cultivated with *Agrobacterium* EHA101 (pIG121Hm) on N6 co-culture medium for 3 days in dark at 28°C.

**Table 3.** Effect of co-culture period on transient GUS expression.

co-culture period	No. of blue spots/350 mg
3	36.2
6	54.5
10	84.3
15	45.1

Calli pre-cultured for 3 days were co-cultivated with *Agrobacterium* EHA101 (pIG121Hm) on N6 co-culture medium for different periods in dark at 28°C.

공동배양배지 내의 조성에 따른 GUS유전자의 발현빈도

*Agrobacterium* 감염 후 공동배양에 사용되는 배지의 성분 중에 일부 첨가제의 종류 및 농도에 따라 GUS 발현율에 많은 차이를 보여 주었다. 먼저 CaCl<sub>2</sub> 농도에 따른 GUS 유전자의 발현빈도는 150 mg/L 이상의 고농도보다 50 mg/L의 저농도에서 가장 많은 spot수가 관찰되었다 (Figure 3A). 일반적으로 사용되는 MS배지의 CaCl<sub>2</sub> 농도는 440 mg/L이기 때문에 이러한 조성의 배지를 공동배양배지로 그대로 사용할 경우 벼에 있어서는 형질전환 효율을 감소시킬 수 있다. 따라서 공동배양기간만이라도 CaCl<sub>2</sub> 농도를 감소시킨 배지에서 공동배양하는 것이 바람직하다고 생각한다. CaCl<sub>2</sub> 농도에 따른 형질전환율의 검토는 고무나무에서도 보고된 바가 있다 (Montoro et al. 2000). 이 경우 공동배양배지에 CaCl<sub>2</sub>를 전혀 첨가하지 않았을 경우 가장 효과가 있는 것으로 보고하였다. 그러나 본 연구결과에서는 배양배지 내에 CaCl<sub>2</sub>가 장기간 결핍될 경우 식물세포 생장에 영향을 주기 때문에 위에서 언급한 바와 같이 공동배양기간에만 적용하는 것이 좋다고 생각한다.

*Acetosyringone*의 농도에 따른 GUS 유전자의 발현 spot수는 많은 차이를 보여주었다. 벼와 같은 단자엽 식물의 경우에는 *acetosyringone*을 첨가하는 것이 절대적으로 중요한 작용을 하였으며, 30 ~ 50 mg/L 첨가된 배지에서 가장 양호하게 나타났다 (Figure 3B). 그러나 100 mg/L 이상의 농도에서는 배양하고 있는 캘러스가 갈변되는 현상을 보여주었다. 지금까지 벼의 형질전환에 사용된 *acetosyringone* 농도는 연구자에 따라 10 mg/L (Yokoi et al. 1999)와 20 mg/L (Hiei et al. 1994)을 사용하였으나 본 연구에서는 그보다 농도가 높은 30 ~ 50

mg/L이 효과적이었다.

공동배양배지 내의 2,4-D 농도에 따른 GUS 유전자의 발현 빈도는 2 mg/L 2,4-D 배지에서 공동배양한 캘러스로부터 blue spot수가 가장 많이 관찰되었다 (Figure 3C). 그러나 2 mg/L 이상의 농도에서는 blue spot수가 감소하는 경향을 보여주었다. 그러므로 적당한 농도의 옥옥신 첨가는 천배양기간에서 언급한 바와 같이 형질전환에 유리한 세포분열집단을 다수 확보할 수 있기 때문에 형질전환 효율이 증가한 것으로 생각된다. 이와 유사한 연구결과가 밀 (Barro et al.1998)에서도 보고되었다.

공동배양배지의 betaine 농도에 따른 GUS 유전자의 형질전환율은 betaine 무처리구에 비해서 첨가된 처리구에서 GUS 유전자의 blue spot수가 증가하였으며 특히 120 mg/L의 농도에서 가장 많이 관찰되었다 (Figure 3D). 지금까지 공동배양배지내에 betaine을 첨가하여 벼의 형질전환연구를 시도한 예 (Lee et al. 1999)는 있었으나 그 농도를 구체적으로 조사하였거나 그 기작을 연구한 경우는 알려져 있지 않다. Betaine은 벼과 등의 식물에서 삼투압 조절물질로 이용되고 있기 때문에 공동배양배지에 첨가하였을 경우 세포의 삼투압을 조절해서 외래의 DNA 삽입을 용이하게 하는 것으로 생각되나 본 연구 결과에서 그러한 구체적인 증거를 제시할 수는 없다.

GPAT 유전자의 형질전환율

GUS 유전자로 검토한 동진벼의 형질전환 적정조건을 이용하여 GPAT 유전자를 벼에 형질전환 시켰다. 그 결과 2번의 실험에서 hygromycin 저항성 식물체로 판단된 형질전환식물

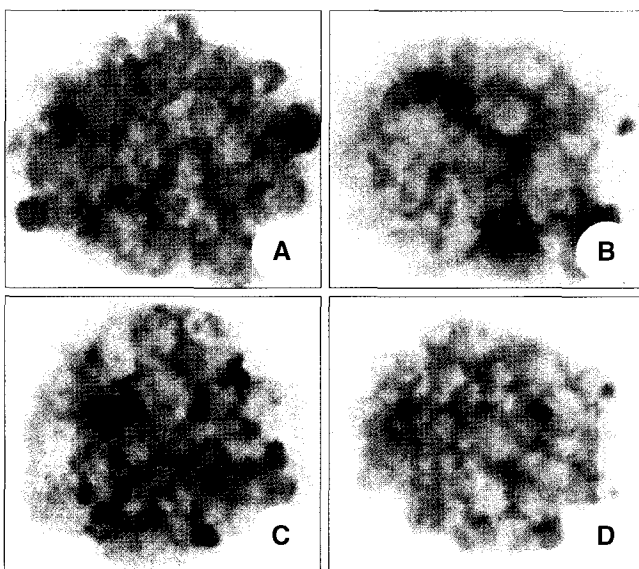


Figure 2. Effect of co-cultivation period on transient GUS expression. Mature seed-derived calli of rice were pre-cultured for 3 days and then infected with *Agrobacterium*. These infected calli were cultured on co-culture medium under the dark condition for different periods of 3 days (A), 6 days (B), 10 days (C), 15 days (D).

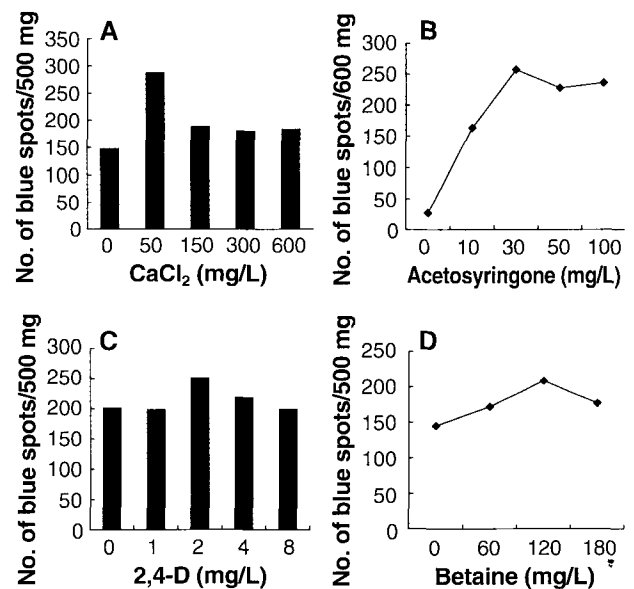


Figure 3. Effect of different co-culture medium conditions on transient GUS expression. Calli pre-cultured for 3 days were co-cultivation with *Agrobacterium* EHA101 (pIG121Hm) on different co-culture medium containing CaCl<sub>2</sub> (A), acetosyringone (B), 2,4-D (C), betaine (D) under the dark condition for 10 days.

체가 각각 54%와 32%로 관찰되었다 (Table 4). 본 연구의 형질전환율은 *Agrobacterium*을 감염시킨 캘러스로부터 형질전환 식물체가 분화된 수를 조사한 것이기 때문에 중간에 hygromycin 저항성 캘러스만을 골라서 식물 재분화 배지에 치상하였을 경우에는 형질전환율은 위의 조사결과보다 훨씬 높은 수치로 관찰될 수 있었다. 지금까지 *Agrobacterium*을 이용한 벼의 형질전환연구는 다양한 유전자를 이용하여 자포니카형 (Hiei et al. 1994; Lee et al. 1998; Kwon et al. 2000)과 인디카형 (Rashid et al. 1996)에 도입하였고, 이러한 형질전환 식물체는 후대에도 그 유전형질이 안정적으로 유지되었다.

**Southern blot 분석**

Hygromycin 저항성 식물체로 분화된 T<sub>0</sub>세대의 형질전환 식물체 7계통을 임의적으로 골라서 1개의 대조구 식물과 함께 염색체 DNA를 추출하고, copy수의 관찰이 가능한 제한효소 *Bam* HI으로 처리한 후 GPAT probe를 이용하여 southern 분석을 실시하였다. 그 결과 모든 형질전환 식물체는 2.0 kb 이상의 위치에서 밴드가 관찰되었으나 대조구 식물체는 어떠한 밴드도 관찰되지 않았다. 또한 형질전환 식물체는 계통에 따라서 밴드수도 1~4개까지 다양하게 나타났다 (Figure 4). Hiei (1994) 등의 벼의 형질전환 연구에서도 형질전환 식물체의 계통에 따라서 copy수가 1~4개까지 관찰되었다. 이와 같이 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 식물체의 copy수가 다양하게 관찰되는 것은 T-DNA가 식물염색체에 도입되어 유전자 재배열이 일어나는 과정에서 발생하는 것으로 생각된다.

**형질전환 식물체의 후대검증**

T<sub>0</sub> 세대에서 외형적으로 정상이고 종자의 채종이 가능한 6 계통의 형질전환 식물체로부터 T<sub>1</sub>세대의 종자를 채종하여 hygromycin을 포함한 배지에 치상하고 각 종자의 저항성 검증을 시도하였다. 그 결과 5계통에서는 저항성과 감수성의 비율이 멘델의 이론적 분리비에 적합한 3 : 1로 분리되었다. 그러나 1계통은 저항성과 감수성의 비율이 1 : 15로 관찰되었다 (Table 5). 이러한 비정상적 분리비는 벼 (Hiei et al. 1994)와

**Table 4.** Transformation efficiency by *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (GPAT cDNA) in rice (*Oryza sativa* L. Dong-jin).

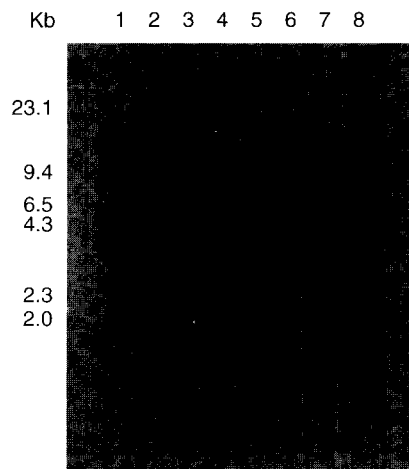
Experiment	No. of callus co-cultivated (A)	No. of transgenic plant (B)	Efficiency (B/A) (%)
1	110	59	53.6
2	74	26	35.1

Mature seed-derived calli of rice after pre-culture for 3 days were cultured in the dark on co-culture medium containing 50 mg/L CaCl<sub>2</sub>, 30 mg/L acetosyringone, 2 mg/L 2,4-D, betaine 120 mg/L for 10 days. Shoot formed from regeneration medium containing hygromycin after 4 weeks.

옥수수 (Ishida et al. 1996)의 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 식물체의 후대에서도 보고되었다.

이상의 연구결과를 종합해 보면 본 연구에서 검토된 벼의 형질전환 체계는 GPAT 유전자를 이용하여 형질전환을 시행한 결과에서도 알 수 있듯이 고효율의 형질전환 식물체를 만드는 데 매우 적합하다고 생각되며, 또한 도입된 유전자도 후대에 안정적으로 유전된다는 것을 알 수 있었다. 그리고 이와 같이 고빈도의 형질전환율은 쌍자엽 식물의 담배, 애기장대와 같이 단자엽식물의 형질전환에 있어서 모델식물로 사용할 수 있으리라 기대된다.

사사- 본 연구는 농업진흥청 바이오 그린 사업과 KISTEP의 G7 과제의 연구비 지원에 의해 수행된 결과임.



**Figure 4.** Southern blot analysis of seven transgenic plants (Lane 2-8) and control plant (Lane 1). Each genomic DNA was digested with *Bam*HI and allowed to hybridize to GPAT cDNA (1.4 kb) probe. An arrow indicates the positive band position. Molecular markers are indicated on the left.

**Table 5.** Expression of hygromycin resistance gene in selfed progeny of transgenic rice.

Lines	No. of seed tested	No. of plant		Expected ratio	P
		Hyg <sup>R</sup>	Hyg <sup>S</sup>		
1	105	7	98	1:15	0.032
2	60	41	19	3:1	1.4
3	95	69	26	3:1	0.28
4	42	29	13	3:1	1.17
5	68	55	13	3:1	1.25
6	105	74	31	3:1	1.26

Seedlings longer than 5 cm were classified as resistant. These resistant seedlings grew in 1/2 MS medium containing 50 mg/L hygromycin for 2 weeks while sensitive seedlings did not. Hyg<sup>R</sup> : hygromycin resistance, Hyg<sup>S</sup> : hygromycin sensitive. Significant at the 5% level based on  $\chi^2$  tests

## 적 요

*Agrobacterium*을 이용한 벼의 효율적인 형질전환을 위하여 몇 가지 형질전환 조건을 조사하였다. 그리고 조사된 최적의 형질전환 방법을 이용하여 내한성에 관련된 GPAT 유전자를 식물에 도입하였다. 형질전환 조건은 GUS 발현을 통하여 조사되었다. 본 실험에서는 벼 (*Oryza sativa* L. cv. Dongjin)의 성숙 종자 유래 캘러스를 3일간 전배양한 후 *Agrobacterium*을 접종하였다. 접종이 끝난 캘러스는 50 mg/L CaCl<sub>2</sub>, 30 mg/L acetosyringone, 2 mg/L 2,4-D, 120 mg/L betaine이 첨가된 공동배양 배지 위에서 암조건으로 10일간 공동배양하여 높은 GUS 발현을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 방법으로 GPAT 유전자를 식물에 도입한 결과 54%의 높은 형질전환율을 나타내었다. 형질전환 식물체를 southern 분석한 결과 wild type 식물체에서는 GPAT 유전자가 검출되지 않았으나, 형질전환 식물체에서는 GPAT 유전자가 검출되었다. 또한 GPAT 유전자로 형질전환된 5계통의 T1 세대에서 hygromycin에 대한 저항성과 감수성의 유전비율이 3 : 1로 분리되었다. 따라서 본 실험의 결과에서 검토된 고빈도의 형질전환 시스템은 단자엽 식물의 형질전환에 있어서 모델계로 이용될 수 있으리라 기대된다.

## 인용문헌

- Barro F, Cannell ME, Lazzeri PA, Barcelo P (1998) The influence of auxins on transformation of wheat and tritordeum and analysis of transgene integration patterns in transformants. *Theor Appl Genet* 97:684-695
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alk aline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523
- Cheng M, Fry JE, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan YC (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 115:971-980
- Cervera M, Pina JA, Juárez J, Navarro L, Pe L. (1998) *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Rep* 18:271-278
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sin* 18:659-668
- Henry Y, Vain P, De Buyser (1994) Genetic analysis of in vitro plant tissue culture responses and regeneration capacities. *Eutiphyea* 79:45-58
- Hiei Y, Ohta S, Komari T and Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6:271-282
- Isida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol* 14:745-750
- Jefferson RA, Kavanaugh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker for higher plants. *EMBO J* 6:3901-3907
- Jia SR, Yang MZ, Ott R, Chua NH (1989) High frequency transformation of *Kalanchoe lacineata*. *Plant Cell Rep* 8:336-340
- Kwon YS, Lee HS, Kim KM, Lee BH, Jo JK, Sohn JK (2000) Effects of variety and acetosyringone influencing transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Korean J Plant tissue culture* 27:95-100
- Lee HY, Lee CH, Kim HI, Han WD, Choi JE, Kim JH, Lim YP (1998) Development of bialaphos-resistant transgenic rice using *Agrobacterium tumefaciens*. *Korean J Plant tissue culture* 21:99-103
- Lee SC, Jeon JS, Jung KH, An GH (1999) Binary vectors for efficient transformation of rice. *Korean J Plant Biology* 42:310-316
- Montoro P, Teinseree N, Rattana W, Kongsawadworakul P, Michaux-Ferriere N (2000) Effect of exogenous calcium on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer in *Hevea brasiliensis*(rubber tree) friable calli. *Plant Cell Rep* 19:851-855
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Oh MJ, Kwon YS, Sohn JK (2000) Genetic analysis of the ability of callus formation and plant regeneration in seed culture of rice, *Kor J Plant tiss Cult* 27:77-82
- Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, Hinata K (1996) Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. *Plant Cell Rep* 15:727-730
- Sangwan RS, Bourgeois Y, Brown S, Vasseur G, Sangwan-Norreel B (1992) Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 188:439-456
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:505-517
- Shure M, Wessler S and Fedoroff N (1983) Molecular identification and isolation of the Waxy locus in maize. *Cell* 35:225-233
- Toriyama K, Hinata K (1985) Cell suspension and protoplast culture in rice. *Plant Sci*, 41:179-183
- Uchimiyama H, Toriyama K (1991) Transformation in rice. In : Bajaj YPS(ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 14, Rice. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp415-421
- Yokoi S, Higashi SI, Kishitani S, Murata N, Toriyama K (1998)

Introduction of the cDNA for *Arabidopsis* glycerol-3-phosphate acyltransferase(GPAT) confers unsaturation of fatty acids and chilling tolerance of photosynthesis on rice. *Mol Breeding* **4**:269-275

**Yokoi S, Toriyama K** (1999) Transgenic Rice(*Oryza sativa* L.) *Bio in*

*Agricul and Forestrv.* **46**:3-13

**Zhang J, Xu RJ, Elliott MC, Chen DF** (1997) *Agrobacterium*-mediated transformation of elite Indica and Japonica rice cultivars. *Mol Biotec* **8**:2232-2231

(접수일자 2002년 3월 23일)