

## 제초제 Basta를 이용한 Phosphinothricin Acetyltransferase 유전자로 형질전환된 현사시 3호의 효율적인 선발

오경은, 문흥규<sup>1)</sup>, 박재인, 양덕춘<sup>2)\*</sup>

<sup>1)</sup>충북대학교 산림과학부, 임업연구원 임목육종부,

<sup>2)</sup>경희대학교 생명과학대학 및 한방재료가공연구센터

## An Effective Selection of PAT Gene Transformed *Populus alba* × *Populus glandulosa* No. 3 using Herbicide Basta Treatment

Kyoung-Eun Oh, Heung-Kyu Moon<sup>1)</sup>, Jae-In Park, and Deok-Chun Yang<sup>2)</sup>

School of Forest Resources, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea

<sup>1)</sup>Forestry Administration, Forestry Research Institute, Suwon, 441-350, Korea.

<sup>2)</sup>College of Life Science & Center for Oriental Medicinal Materials and Processig,  
Kyung Hee University, Suwon, 449-701, Korea

### ABSTRACT

This study was conducted to simple transformants selection by herbicide Basta treatment after transformation with *Agrobacterium tumefaciens* MP90/PAT in hybrid poplar(*Populus alba* × *P. glandulosa* No. 3). In preliminary study, we determined that the lethal concentration of herbicide Basta was 1.0mg/L in callus culture, adventitious bud formation and axillary bud elongation experiment. By the treatment of 1.0mg/L Basta, we could be selected the transformed shoots effectively from the various cultures. In addition, the treatment was useful on slection of transformants which are growing in soil pot. Finally, we also confirmed the transformation by PAT assay. Above results show that the herbicide Basta treatment and PAT assay can be a very simple and effective method for the identification of PAT gene transformed hybrid poplar.

**Key words** : Hybrid poplar, herbicide resistant gene, simple selection of transformants,  
herbicide Basta, PAT assay.

### 서언

최근 식물유전공학의 비약적인 발달과 더불어 여

러가지 식물 형질전환용 운반체가 개발되면서 외래 유전자 도입을 통한 신품종 육성법이 새로운 식물육 종방법으로 자리를 잡고 있다(An, 1987; Walter 등,

\* 교신저자 : E-mail : dcyang@khu.ac.kr

1998). 이러한 유용 외래유전자를 식물체내로 도입, 발현시키는 방법 중 가장 효율적이고 보편화된 형질 전환체 유도는 *Agrobacterium*을 이용한 방법이다. 그러나 성공적인 형질전환을 위해서는 재분화 체계와 형질전환 방법의 확립이 중요하며, 이와 더불어 형질전환체와 비형질전환체를 조기에 효과적으로 선발하는 방법이 중요한 요인이다(Yang 등, 1995; Choi 등, 1996). 또한 기존에 사용되어온 항생제 표지유전자는 식물에 따라 내성이 있어 선발 표지유전자 사용에 제한이 따르기도 한다(Vasil 등, 1991).

제초제 저항성 유전자는 제초제 Bialaphos나 Basta의 주성분인 phosphinothricin에 내성을 가지며, phosphinothricin은 식물세포의 glutamine synthetase 작용을 억제시키고, 결국에는 식물세포에 암모니아가 축적되어 고사되는 것으로 밝혀져 있다(Tachibana 등, 1986).

오 등(1999)은 기 연구를 통해 제초제 저항성 유전자 PAT을 이용해 현사시에 안정적으로 도입시킬 수 있음을 보고하였다. 본 연구는 그에 계속된 연구로써 일반적으로 사용하는 제초제 Basta 처리와 PAT assay를 통해 제초제 저항성 유전자 phosphinothricin acetyltransferase(PAT) 유전자를 도입한 현사시 형질 전환체를 조기에 선발하는 효율적인 선발 방법을 제시하고자 하였던 바, 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 식물 재료

기내에서 배양된 현사시 3호의 정아 부분을 MS(Murashige와 Skoog, 1962)배지에 절편체로 이식하여 4~8주간 생장시킨 후 재료로 사용하였다. 모든 실험의 배양조건은 온도  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도 70%,  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 냉백색 형광등으로 1일 16시간 조명하였다.

### 균주 및 형질전환

제초제 저항성 유전자는 독일 Hoechst사에서 인공합성한 phosphinothricin acetyltransferase 유전자이며(NCBI Accession NO-A02774), NPT::GUS 선발유

전자와 함께 모두 35S-35S-AMV promoter와 Tnos에 부착되어 형질전환용 binary vector에 재조합되어 있으며, 캐나다 식물 유전공학 연구소 Dr. Keller로부터 분양 받았다. 이 binary vector는 disarmed Ti-plasmid(Hoekema et al, 1986)를 가지고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* MP90/PAT에 들어 있다. 한편, 본 실험의 형질전환은 오 등(1999)의 방법에 의해 수행하였다.

### 제초제 Basta가 현사시 엽절편에 미치는 영향

정상적인 현사시 3호의 엽절편에 미치는 제초제 Basta 액제(경농주식회사)의 최소 억제 농도를 조사하였다. 배지는 캘러스 유도 배지(CIM, callus induction medium, MS medium with 1.0mg/L 2,4-D and 0.2mg/L kinetin, 0.8% Gum-agar), 부정아 유도 배지(SIM, adventitious bud induction medium, WPM(Lloyd 와 McCown, 1981)medium with 1.0mg/L zeatin, 0.8% Gum-agar), MS배지에 BAP 0.2mg/L가 첨가된 액아 유도 배지이며, 각각 Basta(원액 18%)농도를 0, 0.1, 0.5, 1.0, 3.0mg/L로 처리하여 CIM, SIM에는 엽절편을, 액아 유도 배지에는 액아가 1~2개가 볼도록 조제하여 치상하였다. Basta는 배지를 고압 멸균한 후 여과 살균하였다. 배양 4주 후 절편체의 생존 유무 및 액아로부터의 줄기 발생을 관찰하여 제초제로 형질전환체를 선발하고 확인할 수 있는 최적의 선발 농도를 결정하였다.

### 제초제 최소 억제농도를 이용한 형질전환체의 확인

Kanamycin으로 선발되어 형질전환체로 추정되는 8개체(약 70mm 길이)와 비교 식물을 각각 제초제의 최적 선발 농도가 첨가되어 있는 CIM, SIM 및 액아 유도 배지에서 캘러스와 부정아, 액아가 유도되는지의 여부를 조사하였다.

### 제초제 Basta 처리

Basta 1.0mg/L로 선발된 액아를 증식시킨 후 포트 로 옮겨 5주간 순화시켰다. 그리고 Basta 액제를 사용 농도 3mL/L로 조제하여 형질전환체에 살포하였다.

Table 1. Effect of basta on inhibition of callus formation from the leaf explants of *P. alba* × *P. glandulosa*

Basta(mg/L)	No. of explants cultured	Callus formation (%)	Callus growth*
0	31	100	+++
0.1	40	100	+++
0.5	40	85	++
1.0	40	0	-
3.0	40	0	-

\* - : No growth ; ++ : 0.1~0.5cm callus ; +++ : > 0.5cm callus.

**PAT assay**

PAT assay 방법은 D' Halluin 등의 방법(1992)을 변형하여 실시하였다. 형질전환된 조직 0.5g을 1.5 mL eppendorf tube에 넣고 150 μL의 extraction buffer(25mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 0.15mg/mL phenylmethylsulfonyl fluoride, 50mg/ml polyvinyl polypyrrolidone)을 가한 다음 플라스틱봉을 이용하여 4℃에서 미세하게 간 후 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액 120 μL를 새로운 tube에 넣고 이를 조효소 추출액으로 사용하였다.

효소액의 반응은 PPT(50mM)용액 20 μL와 반응 buffer{100mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.4mg/L 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid(DTNB), 0.1mM acetyl-CoA} 950 μL를 섞고, 상기 조효소액 30 μL를 넣어 반응을 시작한다. 반응은 37℃ 수조에서 30분동안 하였으며 spectrophotometer에서 412nm으로 흡광도를 측정하였다. PAT의 1 unit는 37℃조건에서 acetylated PPT/min/mg protein의 μmole값으로 정의하였다.

**결과 및 고찰**

**제초제 Basta가 현사시 엽절편 캘러스의 생장억제에 미치는 영향**

제초제 Basta가 현사시 엽절편에서 캘러스 유도, 부정아 유도 및 액아 유도에 어떠한 영향을 주는지와 정상적인 기내 현사시 엽절편의 제초제에 대한 최소 억제농도를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 제초제 무처리 시는 대부분 잎 절단면을 따라 캘러스

가 형성되었으며, 다량의 적색 안토시아닌 색소를 보이는 캘러스와 녹색의 캘러스가 형성되었다. Basta 0.1mg/L가 첨가된 배지에서는 제초제 무처리와 거의 같은 유사한 현상을 보였으나 배양 시간이 지날수록 고사가 심했다. Basta 0.5mg/L에서 절단면에서 부분적으로 작은 캘러스로 발생하여 성장하였는데 이러한 캘러스는 생장이 매우 느리고, 일부는 백화되어 고사되기도 하였다. 또한 Basta 1.0mg/L과 3.0mg/L에서는 절편이 모두 백화 현상을 보이며 고사하였다. 이상의 결과로 형질전환된 현사시를 재료로 제초제 처리를 통한 선발은 Basta 1.0mg/L이면 충분하다고 사료된다.

**제초제 Basta가 현사시 엽절편 부정아 유도에 미치는 영향**

Basta 처리가 엽절편 부정아 유도에 미치는 영향은 Table 2와 같다. 제초제 무처리 시에는 절단면과 주맥부분에 다수의 적색을 띤 캘러스가 생성되며, 부정아가 유도되었다. Basta 0.1mg/L가 첨가된 배지에서는 주맥부분에 일부 캘러스가 유도되었으나, 검게 고사되었고, 전반적으로 절편이 연노랗게 변하며 고사되었다. 제초제 0.5mg/L처리 시에는 0.1mg/L과 유사하였지만, 절편이 백색화를 보이며 고사되는 정도가 심했다. 농도 1.0mg/L과 3.0mg/L에서는 전혀 캘러스 형성 없이 엽절편이 완전히 고사되었다. 따라서 본 실험 결과, 형질전환체의 엽절편에서 부정아 유도를 위한 제초제의 선발 농도는 캘러스 유도와 마찬가지로 Basta 1.0mg/L이면 충분하다고 생각되었다.

Table 2. Effect of Basta on inhibition of adventitious bud induction from the leaf explants of *P. alba* × *P. glandulosa*

Basta(mg/L)	No. of explants cultured	Shoot formation (%)
0	35	80%
0.1	40	0
0.5	40	0
1.0	40	0
3.0	40	0

Table 3. Effect of Basta on shoot elongation from the axillary buds of *P. alba* × *P. glandulosa*

Basta(mg/L)	No. of explants cultured	Shoot elongation (%)
0	24	100
0.1	24	100
0.5	29	59
1.0	28	0
3.0	26	0

#### 제초제 Basta가 현사시 액아 유도에 미치는 영향

액아 유도배지조건에서 제초제 처리에 대한 줄기 증식 결과는 Table 3과 같다. 비교구에서는 모든 액아로부터 다경줄기가 유도되었다. 제초제 농도 0.1mg/L에서는 모든 액아가 신장했으나 비교구보다는 길이 생장이 저조했다. 제초제 0.5mg/L에서는 신초의 생장이 현저히 감소되면서 점차 고사되었다. 1.0mg/L과 3.0mg/L에서는 캘러스 유도 및 부정아 유도에서 관찰된 것처럼 치상 후 1주부터 줄기가 검게 변하며 고사되었다.

이상 제초제를 이용한 캘러스 형성, 부정아 유도 및 액아 유도의 최소 억제 농도는 Basta 1.0mg/L에서 충분하였기에 형질전환체에 대한 제초제 처리 선발 농도는 Basta 1.0mg/L로 결정하여 사용하였다.

#### 제초제 Basta를 이용한 형질전환체의 확인

본 실험에서는 제초제 Basta를 직접 선발매체로의 이용 가능성을 알아보기 위하여 kanamycin 대신 Basta 최소 억제농도인 1.0mg/L를 이용, 형질전환체를 선발하였다. 엽절편과 균주의 2일간 공조배양 뒤 균을 제거하기 위한 cefotaxime과 제초제 Basta를 처리한 CIM에서 엽절편으로부터 직접 제초제에 내성을 가지는 캘러스를 유도해 보았으나, 15일 후 거의

모든 엽절편들이 갈변화되며 고사되었다. 이로써 제초제 최소 억제농도를 이용한 캘러스 유도시에는 엽절편의 형질전환된 세포들까지 고사시켰으므로 제초제는 선발 매체로서 적합하지 못하였다. 아마도 이런 현상은 Basta 1.0mg/L 처리시에는 엽절편을 빠르게 고사시키므로 Basta에 저항성을 갖는 캘러스를 전혀 유도할 수 없었다고 생각된다. 그러나 재분화된 형질전환체의 2차 선발표지로서 제초제 Basta의 사용은 매우 빠르고 효과적이었다. 약 12~16주동안 증식된 성숙한 기내 형질전환식물체 가운데 임의로 선발한 8개체(약 70mm 길이)와 비교 식물을 재료로 Basta 1.0mg/L가 첨가된 CIM, SIM 및 액아 유도 배지에 4주간 배양하였다. 이 가운데 형질전환된 8개체 중 2개체는 캘러스, 부정아유도 및 액아유도에 제초제의 영향을 받지 않고 가능하여 제초제를 이용한 형질전환체 선발의 가능성을 보였다. 그러나 비교 식물은 모두 고사되었다. 선발된 형질전환체의 엽절편 유래 캘러스 형성은 각각 30개 엽절편에서 모두 캘러스가 유도되어 제초제 무첨가 배지와 다름없는 유사하였고, 성장도 매우 왕성하였다(Fig. 1). 그러나 비형질전환체는 비교 식물과 마찬가지로 모든 절편이 백화되어 고사되었다. 형질전환체를 이용한 부정아 유도에서는 모든 엽절편에서 절단면과 주맥 부위

에서 부분적으로 연한 갈색, 녹색 또는 적색의 캘러스가 유도되었고, 절편에 따라서는 줄기도 유도되었다. 비교구에서는 Basta 농도 0.1mg/L 처리시에도 부정아가 유도되지 않았지만, 고농도인 1.0mg/L에서 부정아가 유도되었다는 것은 배양체가 형질전환체임을 시사한다. 배양 1주 후 형질전환체의 엽절편은 녹색의 캘러스와 부정아가 유도된 반면, 비형질전환체의 엽절편은 부분적으로 흑반점을 보이며 고사되었다. 한편, 형질전환체의 엽절편에서 배양 4주 후의 부정아 유도는 저조했지만, 녹색을 띠며 생존되었고, 1차 계대배양 후에는 다수의 부정아가 유도되었다.

액아 유도에서도 캘러스, 부정아 유도와 마찬가지로 형질전환체만이 액아가 유도되었다. 배양 1주 후부터 액아가 성장되어 4주 후에는 30~50mm 정도로 자랐다(Fig. 1). 그러나 비형질전환체는 모두 줄기가 부분적으로 고사되어 4주 후에는 완전히 검게 고사되었다.

Filho 등(1994)과 Akama 등(1995)도 기내에서 phosphinothricin이나 basta를 이용하여 선발한 것이 kanamycin으로만 선발한 것보다 훨씬 효율적이고 형질전환체를 선발하는데 매우 빠르다고 하였는데, 이같은 내용은 본 실험에서도 확인되었다. 또한 비형질전환체는 Akama 등(1995)의 결과에서처럼 제초제만의 처리로 단기간에 제거할 수 있어 저비용으로 형질전환체를 선발하는 효과적인 방법으로 생각된다. 한편, 제초제 처리로 선발된 개체는 비교 식물과 유사한 성장을 보여주었는데, 차후 포장 이식 등을 통해 계속된 관찰이 요구된다. 기타 제초제 Basta를 이용한 형질전환체 선발은 여러 식물에서 보고된 바 있다. Filho 등(1994)은 *bar* 유전자로 감자의 품종별 형질전환 시 고농도의 kanamycin으로 형질전환체를 1차 선발하고, 2차로 10mg/L phosphinothricin이 첨가된 배지에서 저항성을 갖는 형질전환체를 다시 선발했으며, 이어 온실에서 자란 형질전환체에 제초제를 살포하여 선발된 것을 재확인하였다. Akama 등(1995)도 20mg/L phosphinothricin 첨가 배지에서 잠정적인 형질전환체를 다시 선발하여 제초제 Basta 처리에 내성을 갖는 *Arabidopsis*를 만들 수 있었다.

Rathore 등(1993)은 PEG를 이용한 DNA 흡수법으로 선발된 원형질체 유래 캘러스로부터 Basta에 내성을 가지는 벼를 재분화시켰다. 벼와 같은 단자엽 식물에서는 항생제 kanamycin으로는 선발이 어렵기 때문에 이들은 벼의 형질전환을 위해 제초제 저항성 유전자를 이용하여 완벽하게 형질전환된 세포를 선발할 수 있었다는 결과로 *bar* 유전자가 좋은 선발 표지인 것을 입증하였다. 이상의 결과들은 제초제 저항성 유전자가 형질전환의 필수 단계인 선발 과정에서 선발 표지로 이용될 수 있음을 보여준 것이다. 그리고 식물체내로 multiple 유전자의 도입 등을 목표로 할 때 유전자 재조합으로 제초제 저항성 유전자를 선발 표지로 사용한다면 효과적일 것으로 기대된다.

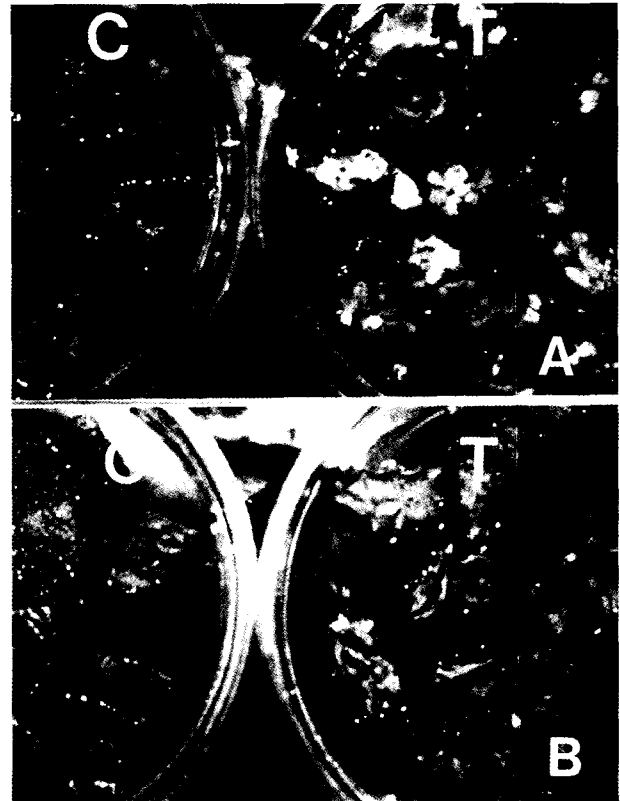


Fig. 1. Selection of normal(A-C) and transformed(A-T) shoots on the SIM medium containing 100mg/L kanamycin, and transgenic plants(B-T) and control plants(B-C) treated by herbicide Basta in vitro. Normally growing transformed plants, whereas control plants were died after 10 days of Basta treatment.

Table 4. PAT enzyme activity in crude extracts prepared from transgenic and normal potato leaves

Plant No.	Activity (10 <sup>6</sup> units/min/mg protein)
1	1670
2	1987
3	2764
4	2315
5	1260
6	4360
7	1289
8	3189
Control	n.d.

n.d.: not detected.

#### PAT assay

형질전환체와 대조식물체의 조효소 추출액을 이용하여 PAT assay를 시도한 결과 대조식물체에는 PAT 효소의 활성을 볼수 없었으나 형질전환체 모두 PAT 효소의 활성을 보였다. PAT에 의해 유리된 CoA는 DTNB와 반응하며, 동량의 자유 5-thio-2-nitrobenzoic acid를 생성하며, 이 화합물 1M은 412nm과장에서 13,600의 흡광계수를 가진다. Sample과 PPT를 처리하지않은 control의 흡광도 차이를 13.6으로 나눈값은 PPT처리에 의한 DTNB 환원치인  $\mu$  mole/min값과 일치한다. 본 실험과 마찬가지로 Akama 등(1995)도 bar 유전자의 발현 정도를 검정한 결과 형질전환체에서는 PAT enzyme activity가 양성을 보였지만, 비형질전환체에서는 전혀 측정되지 않았다. 또한 본 실험에서 특히 PAT-6는 PAT 효소활성이 다른 형질전환체보다 강하였는데(Tabla 4), 이러한 결과는 외부 유전자를 식물염색체내로 도입시 삽입되는 염색체의 부위에 따라 발현의 정도가 다르게 되기 때문인 것으로 사료된다.

#### 적요

본 연구는 개량 포플러 현사시 3호를 재료로 제초제 저항성 유전자 PAT으로 형질전환시킨 다음 제초

제 Basta 처리에 의한 효율적인 형질전환체 선발을 목적으로 시험되었다. Basta 처리에 따른 캘러스유도, 부정아유도 및 액아유도 시험을 통해 조직치사농도는 1.0mg/L로 결정할 수 있었으며, 이 농도처리에 의해 형질전환체의 조기선발에 사용하였다. 이 농도처리로 비형질전환체는 모두 고사되었지만, 형질전환체는 정상적으로 반응을 보이며, 생육이 가능하였다. 한편, 형질전환체에 제초제를 직접 살포한 결과, 정상적 생육이 가능했고, PAT activity 측정 결과에서도 양성 반응을 나타내어 현사시 3호 세포내에 PAT 유전자가 정상 발현됨이 확인되었다. 이로써 현사시에 PAT 유전자 도입 및 발현을 위하여 제초제 Basta 처리와 PAT assay가 매우 효과적인 것으로 나타났다.

#### 인용문헌

- Akama, K., H. Puchta, and B. Hohn. 1995. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the *bar* gene as selectable marker. *Plant Cell Rep.* 14(4) : 450-454.
- An, G. 1987. Binary Ti vector for the plant transformation and promoter analysis. *Methods in Enzymol.* 153 : 292-305.
- Choi, K.H., J.H. Chon, H. S. Kim, Y.H. Joung, D.C. Yang, and H. Joung. 1996. An effective method for the selection of transgenic potato using mouse adenosine deaminase gene. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 23 : 161-165.
- D' Halluin K., De Block M., Denecke J., Janssens J., Leemans J., Reynaerts A., Botterman J. 1992. *Methods Enzymol.* 216 : 415-426.
- Filho, E.S.P., L.F.A. Figueiredo, and D.C.M. Neshich. 1994. Transformation of potato(*Solanum tuberosum*) cv. Mantiqueira using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Rep.* 13 : 666-670.
- Hoekema, A., M.J.J Van Haaren, A.J Felinger, P.J.J

- Hooykaas, and R.A Schiperoort. 1986. Non-oncogenic plant vectors for use in the *Agrobacterium* binary vector system. *Plant Mole. Biol.* 5 : 85-89.
- Lloyd, G., and B. McCown. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel(*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 30 : 421-427.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
- Oh, K.E., D.C. Yang, H.K. Moon, and J.I. Park. 1999. Transformation of *Populus alba* × *Populus glandulosa* using phosphinothricin acetyltransferase gene. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 26(3) : 163-169.
- Rathore, K.S., V.K. Chowdhury, and T.K. Hodges. 1993. Use of *bar* as a selectable marker gene and for the production of herbicide-resistant rice plants from protoplasts. *Plant Mole. Biol.* 21 : 871-884.
- Tachibana K., T. Watanabe, Y. Sekizawa, and T. Takematsu. 1986. Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. *J. Pesticide Sci.* 11 : 33-37.
- Vasil V., S.M. Brown, D. Re, M.E. Fromm, I.K. Vasil. 1991. Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension culture of wheat. *Bio/tech.* 9 : 743-747.
- Walter C., L.J. Grace, A. Wagner, D.W.R. White, A.R. Walden, S.S. Donaldson, H. Hinton, R.C. Gardner, and D.R. Smith. 1998. Stable transformation and regeneration of transgenic plants of *Pinus radiata* D. Don. *Plant Cell Rep.* 17 : 460-468.
- Yang D.C., S.S. Han, and E.S. Yoon. 1995. Adenosine deaminase gene: possible selectable marker for tobacco transformation. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 22 : 235-240.
- (접수일 2004. 1. 02)  
(수락일 2004. 1. 30)