

벼 색소체 형질전환을 이용한 글리포세이트 저항성 유전자 *cp4-epsps*의 발현

강경수¹, 김민균^{1*}
¹서울대학교 농생명공학부

Expression of the Glyphosate Resistant Gene, *cp4-epsps*, through Plastid Transformation in Rice (*Oryza sativa* L.)

Kyungsu Kang¹ and Minkyun Kim^{1*}

¹School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

ABSTRACT Heteroplasmic rice plastid transformant was generated using suspension cells as bombardment materials. PCR analyses confirmed incorporation of *aadA* and *cp4-epsps* genes into the rice plastid genome by homologous recombination events via the flanking sequences of the *trnI* and *trnA*. Transplastomic calli were actively proliferated when cultured on AAM2 medium supplemented with various concentrations (500-3000 mg/L) of streptomycin in dark condition, and transplastomic suspension cells showed resistance to nonselective herbicide, glyphosate. Through 'agarose pie selection' method, heteroplastomic calli, containing considerably high level of transplastome and expressing the CP4 EPSPS protein, were obtained. They were further regenerated to green shoots with healthy roots.

Key words: Glyphosate, particle bombardment, rice plastid transformation, streptomycin, suspension culture

서 론

고등식물의 색소체 중 가장 흔한 형태가 엽록체이어서, 색소체 형질전환은 흔히 엽록체 형질전환으로도 불린다. 식물의 색소체 형질전환 방법은 일반적으로 유전자 변형작물 개발에 이용되는 핵 형질전환 방법에 비하여, 외래유전자의 발현 효율이 매우 높으며, 외래 유전자의 유전체내 삽입위치 차이에 따른 position effect 나 gene silencing 의 문제가 없고, 하나의 프로모터를 통해 여러 개의 유전자가 발현될 수 있으며, 화분을 통한 유전자 전이 현상이 없기 때문에 유전자 변형 작물에서 논란이 되고 있는 생태계 교란의 대안이 될 수 있는 장점이 있다 (Daniell and Dhingra 2002; Maliga 2004). 색소체 형질전환은 1990년대 초반에 담배에서 성공

한 이후로 (Svab and Maliga 1993) 최근까지 토마토, 감자, 레스퀘렐라, 콩, 당근, 목화, 페튜니아, 상추 등에서 성공하였다 (Sidorov et al. 1999; Ruf et al. 2001; Skarjinskaia et al. 2003; Dufourmantel et al. 2004; Kumar et al. 2004a; Kumar et al. 2004b; Zubko et al. 2004; Lelivelt et al. 2005). 앞에서 언급된 색소체 형질전환의 성공 사례들은 모두 쌍떡잎 식물인 것이 특징이다. 이에 반하여 외떡잎 식물이면서 곡류인 벼는 경제적인 가치나 식량 작물로서의 유용성에도 불구하고, 조직배양학적인 어려움과 효율적인 형질전환 방법의 부재로 그동안 색소체 형질전환이 성공되지 못하고 있었는데, 최근 본 연구진은 *aadA* 유전자 및 녹색형광단백질을 발현하는 벼 색소체 형질전환체를 만드는데 성공하였으며, 이 유전자들이 T1 세대라도 유전됨을 확인 하였다 (Lee et al. 2006). 담배는 어린 잎을 이용한 반복적인 기관형성을 통해 지속적인 선발압을 가함으로써, 형질전환 초기에는 외래유전자가 도입된 색소체 지놈이 야생형과 공존하다가, 점차 그 차지하

*Corresponding author Tel 02-880-4641 Fax 02-873-3112
E-mail: mkkim3@plaza.snu.ac.kr

는 비율이 높아지게 되며, 최종적으로 모든 엽록체 지놈 copy 가 외래 유전자를 가지는 형태로 바뀌는 homoplasmcy 에 쉽게 도달할 수 있다 (Svab and Maliga 1993). 도입 유전자의 homoplasmcy 는 색소체 형질전환체의 유전적 안정성을 위하여 반드시 필요하다. 반면에 벼는 잎을 이용한 기관형성이 불가능하며, 입자층에 의한 형질전환 캐러스 조직은 선발압이 충분히 가해지지 못한 상태에서 재분화 과정을 거쳐야 하였으며, 재분화된 형질전환체가 토양에 이식된 후에는 태양광에 의한 광화학 반응이나 토양 미생물에 의한 분해 반응 때문에 스트렙토마이신 선발압이 효과적으로 가해 질 수 없었다. 실제로 T1 세대의 벼 색소체 형질전환체는 일부의 엽록체에서 제한적으로 녹색형광을 나타내었으며, PCR 분석에서 극히 일부의 엽록체 지놈 copy 만이 외래 유전자를 가지는 것으로 나타나는 등 여전히 색소체 형질전환체가 heteroplasmic 상태인 한계점이 있었다 (Lee et al. 2006).

본 연구에서는 벼 현탁배양 세포를 재료로 이용하여 비선택성 제초제인 글리포세이트에 저항성을 나타내는 *cp4-epsps* 유전자를 벼 색소체에 형질전환하였다. 또한 다양한 종류의 형질전환체 선발 전략을 시도하여, 야생형 색소체 지놈 보다 형질전환된 색소체 지놈의 비율이 크게 향상된 heteroplasmic 상태의 벼 색소체 형질전환체를 획득하는데 성공하였으며, 이 형질전환체는 스트렙토마이신과 글리포세이트에 저항성을 가지는 표현형을 나타내었다. 본 논문에 기술된 실험 결과와 고찰은 궁극적으로 벼 색소체 형질전환에서 homoplasmcy 에 도달하기 위한 중요한 정보와 가능성을 제시하고 있다.

재료 및 방법

식물 재료 및 현탁 배양

자포니카형 벼 품종인 화청을 이용하였으며, Lee 등 (2002) 과 Lee 등 (2006) 의 방법을 이용하여 캐러스를 유기하였다. 파종 후 N6 배지 (Chu et al. 1975) 에서 한 달간 배양 후에 배형성 캐러스만을 선별하여, Muller 와 Grafe (1978) 가 사용하였던 AA 배지의 다량 및 미량 영양소에 0.5 mg/L nicotinic acid, 0.5 mg/L thiamine-HCl, 0.1 mg/L pyridoxine-HCl, 100 mg/L myo-inositol, 877 mg/L glutamine, 266 mg/L aspartic acid, 288 mg/L arginine, 75 mg/L glycine, 20 g/L sucrose, 2 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L kinetin, 0.1 mg/L gibberellic acid 가 첨가된 pH 5.8 인 AAM1 배지에 접종하여 27°C, 120 rpm 에서 암배양 하였다. 초기에는 3-4 일간격으로 배지를 교체하면서 한 달간 배양 후 500 µm mesh 를 이용하여 현탁배양 세포 및 세포군을 얻을 수 있었으며, 일주일 간격으로 배지를 교체해 주었다.

벼 색소체 형질전환용 벡터 제작

선발마커로 스트렙토마이신에 저항성을 나타내는 *aadA* 유전자를 가지며, 상동재조합 부위로 벼 색소체 지놈의 *trnI* 와 *trnA* 서열을 가지는 벼 색소체 형질전환용 벡터인 pLD-RCtV (Lee et al. 2006) 에서 *aadA* 유전자와 *psbA* 3'-UTR 사이의 *XbaI* 위치를 이용하여 *cp4-epsps* 유전자를 클로닝하였고, 이를 pLD-RCtV-G10L-CP4 EPSPS로 명명하였다 (Figure. 1). *cp4-epsps* 유전자는 pET-wild-CP4 EPSPS 플라스미드 (Kang and Kim 2006) 를 주형으로 하고, 5'-GCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCTTCACGGTGAAGCAG-3' 와 5'-GCTCTAGATCAGGCAGCCTTCGTATCGGAGAG-3' 를 프라이머로 이용하여 *Pfu* DNA polymerase (Promega, USA) 에 의해 PCR 증폭하였다. 밑줄 그은 서열은 *XbaI* 인식서열이다.

형질전환 및 스트렙토마이신 저항성 캐러스 선발

Langbecker 등 (2004) 의 방법을 변형하여, 벼 현탁배양 세포를 재료로 입자층 형질전환을 실시하였다. AAM1 배지에 접종 후 약 두 달이 경과된 벼 현탁배양 0.3 mL (settle volume) 를 Steritop 45 mm Filter Unit (Millipore, USA) 를 이용하여 70 mm Whatman # 1 거름종이에 고정된 다음 AAM2B 배지 (삼투압 배지 AAM1; 배지에서 gibberellic acid 와 sucrose 는 제외하고, 36.4 g/L sorbitol, 36.4 g/L mannitol 을 첨가한 뒤, 2 g/L phytigel (Sigma, USA) 을 이용하여 굳힌 배지) 에 올려 놓았다. 4 시간 동안 정치한 다음, 형질전환 벡터가 코팅된 0.6 µm 금입자, 1100 psi, 9 cm 거리 조건에서 입자층을 이용하여 형질전환을 실시하였다. 20 시간 동안 추가적으로 삼투압 배지에서 배양한 다음, 300 mg/L 의 스트렙토마이신이 첨가된 고체 AAM2 배지 (AAM1 배지에서 gibberellic acid 만 제외한 다음, 2 g/L phytigel 을 이용하여 굳힌 배지) (AAM2 ST300) 에서 암배양하였다. 이때 형질전환된 현탁배양이 고정되어 있는 거름종이 전체를 한번에 옮겨줌으로써 손쉽게 배지를 교체할 수 있다. 6 주간 배양 후 AAM2 ST500 배지로 옮겨주었으며, 이후 6 주 간격으로 배지를 교체하였다. 입자층 형질전환 실시로부터 약 4 개월 경과 후 스트렙토마이신 저항성 캐러스가 나타났으며, 이들을 선발하여 AAM2 ST500 배지에 치상하였다.

PCR 분석

Doyle 과 Doyle (1987) 의 방법을 이용하여 지놈 DNA 를 분리하였으며, DyNA Quant 200 형광계 (Hoefer, USA) 를 이

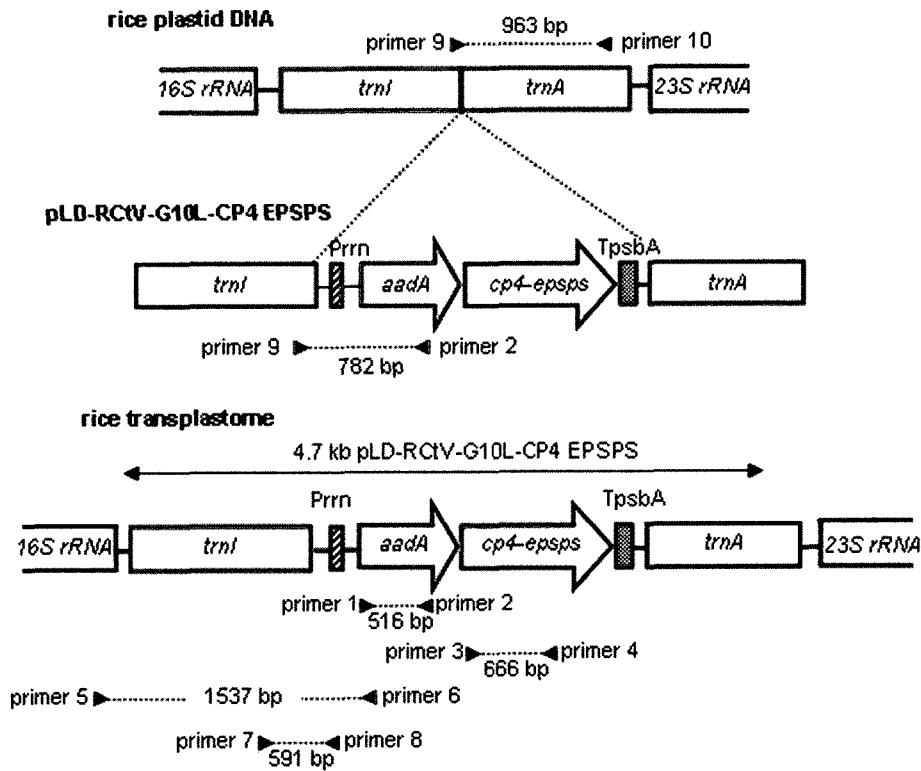


Figure 1. Rice transplastome resulting from the homologous recombination between the rice plastid transformation vector, pLD-RCtV-G10L-CP4 EPSPS, and rice plastid DNA. The *aadA* and *cp4-epsps* genes are driven by the rRNA operon promoter (Prrn). *TpsbA* indicates the 3' UTR of the *psbA* gene. The filled triangles indicate the primer sites used for PCR analyses.

용하여 농도를 측정하였다. 형질전환 여부를 확인하기 위해 *aadA* 유전자는 primer 1 (5'-GGTGATCGCCGAAGTATCGA-CTCAACTA-3') 과 primer 2 (5'-GGCGAGTTCCATAGCGT-TAAGGTTTCAT-3') 를, *cp4-epsps* 유전자는 primer 3 (5'-CTTCTGGAAGGCGAGGACGTCATCAATA-3') 과 primer 4 (5'-GTTTCATCAGCACGTTGAGGATGGTGAC-3') 를 이용하여 선택적으로 증폭시켰다. 형질전환 벡터의 상동재조합 부위의 바깥쪽에 위치하는 primer 5 (5'-GGGTATTTTGGTTG-ACACTGCTTCACG-3') 와 형질전환 벡터의 *aadA* 부위에 위치하는 primer 6 (5'-GCTCGATGACGCCAACTACCTCTGAT-AG-3') 을 이용한 PCR 분석을 통해, 외래 유전자가 벼 색소체 지놈의 *trnI* 와 *trnA* 부위에 선택적으로 삽입되었음을 확인하였으며, primer 7 (5'-ACCAGAGACCTCGCCCGTGAA-GTAAATC-3') 과 primer 8 을 이용한 nested PCR 을 통하여, 선택적 증폭을 재검증 하였다. 형질전환체의 야생형 색소체 지놈과 형질전환된 색소체 지놈의 상대적인 비율을 나타내는 유전자형 분석 PCR (genotyping PCR) 을 시행하기 위해서는 3 개의 프라이머가 필요한데 primer 9, primer 10 (5'-ACGGG-TTCTACCATAGAGGCCAACGATA-3'), primer 2 를 10:10:1 로 각각 섞어서 사용하였다. 유전자형 분석 PCR 을 위해 50 ng 의 지놈 DNA 와 Top *Taq* DNA polymerase (Corebio, South Korea) 를 이용하여, 처음 96°C 에서 2 분간 변형시킨 다음,

94°C 에서 15 초, 65°C 에서 30 초, 72°C 에서 1 분으로 25 회 반복하고, 이어서 72°C 에서 7 분간 반응시켰다. 실험에 사용된 프라이머의 위치는 Figure 1 과 같다.

추가 선발압 처리 및 선발 방법의 효율성 검증

선발전략 1: 선발 강도를 다르게 처리하기 위하여, 서로 다른 농도 (500, 1000, 3000 mg/L) 의 스트렙토마이신이 포함된 고체 AAM2 배지에 형질전환된 캘러스를 치상한 다음, 6 주간격으로 계대배양하면서 약 14 주간 암배양하였다.

선발전략 2: 형질전환된 캘러스를 고체 AAM1 ST500 배지 (AAM1 배지에 500 mg/L 의 스트렙토마이신을 첨가하고, 2 g/L 의 phytigel 을 이용하여 굳힌 배지) 에서 증식시켜 얻은 friable 캘러스를 액체 AAM1 ST500 배지에 접종하여 현탁배양 세포를 유기하였으며, 10 일 간격으로 배지를 교체하면서 약 10 주간 배양하였다. 이후 서로 다른 농도의 스트렙토마이신과 글리포세이트를 처리한 액체 AAM1 배지에서 10 일 간격으로 배지를 교체하면서, 약 한 달간 배양하였다.

선발전략 3: 액체 AAM1 ST500 배지에서 배양된 1 mL 의 형질전환된 현탁 배양 상층액과 3 mL 의 원형질체 배지 (Li and Murai 1990) 의 general protoplast medium 에서 비타민을 제외한 배지) 를 섞은 다음, 4 mL 의 2.5% SeaPlaque agarose

(Cambrex, USA) 가 포함된 원형질체 배지를 첨가하여 아가로스 파이 (agarose pie) 를 제작하였으며, 아가로스 파이는 액체 원형질체 배지에 담가서 암배양하였다. 이때 아가로스 파이 및 배양용 원형질체 배지 내에 다양한 농도 (0, 500, 1000 mg/L) 의 스트렙토마이신을 동일하게 처리하고, 형질전환된 현탁배양을 양육세포로 사용하였다. 10 일 정도 배양 후 양육 세포는 제거하였으며, 2 주 간격으로 동일한 농도의 스트렙토마이신이 포함된 원형질체 배지를 교체하면서 6 주간 배양하면 현탁배양 세포로부터 증식된 캘러스가 나타나는데, 이를 동일한 농도의 스트렙토마이신이 포함된 고체 AAM2 배지로 선별적으로 치상한 후, 6 주간 추가 배양하였다.

다양한 방법으로 선발압을 가한 형질전환 캘러스 혹은 현탁 배양 세포로부터 지놈 DNA 를 분리하고, 유전자형 분석 PCR 방법으로 분석하였다. 야생형 색소체 지놈과, 형질전환된 색소체 지놈에 의해 나타난 PCR 밴드의 상대적인 밀도는 Frog Gel-Print System (Corebio, South Korea) 과 TotalLab 소프트웨어 (Nonlinear, UK) 를 이용하여 분석하였다.

ELISA 분석

100 mg (생중량) 의 캘러스 또는 잎을 막자와 막자사발 내에서 액체 질소를 이용하여 갈고 1 mL 의 추출 완충용액 (0.1 M Tris-HCl pH 8.3, 0.5 M NaCl, 5 mM EDTA) 을 첨가한 다음, 4°C 에서 혼합하면서 1 시간 동안 추출하였다. Trait RUR Bulk Soybean test kit (Strategic Diagnostics, USA) 를 이용하여, 5 분간 반응시켜 결과를 비교하였다.

식물체 재분화

500 mg/L 의 스트렙토마이신을 첨가하고, 18 g/L 의 Washed agar (Sigma, USA) 혹은 4 g/L 의 gelrite (Duchefa, Netherlands) 를 이용하여 굳힌 벼 재분화 배지 (Lee et al. 2006) 에 캘러스를 치상한 다음, 27°C, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 16 시간 광주기 조건에서 2 달간 배양하였다. 형성된 싹은 Magenta box 내에 스트렙토마이신이 포함된 MS 배지 (MS 다량 및 미량 영양소, 비타민, 30 g/L 의 sucrose 를 함유하고, 2 g/L 의 phytigel 을 이용하여 굳힌 배지) 로 옮긴 다음 같은 조건에서 배양하여, 뿌리 형성을 유도하였다.

결과 및 고찰

형질전환 벡터 구축

선발마커인 *aadA* 유전자와 제초제 저항성 *cp4-epsps* 유전

자는 *Prrm* 프로모터에 의해 polycistronic 하게 발현되며 각각 리보솜 결합부위로 *rbcL* (Svab and Maliga 1993) 과 *gene 10* 리더 서열 (Studier et al. 1990) 을 가진다. 비선택성 제초제인 glyphosate 에 저항성을 가지는 *cp4-epsps* 유전자는 *Agrobacterium* sp. strain CP4 로부터 유래하였으며, 상업적인 목적의 제초제 저항성 작물 개발에 이용되었다 (Padgett et al. 1996). 진핵세포 내 세포소기관인 색소체의 전사 및 번역과정은 원핵세포와 유사한 특징을 가지는데, 특히 16S ribosomal RNA 프로모터 (*Prrm*) 는 색소체 내에서 과발현되는 동시에, 원핵생물인 대장균에서도 잘 발현될 수 있다 (Daniell et al. 1998; Silhavy and Maliga 1998). 10 mM 또는 20 mM 의 글리포세이트가 포함된 M9 최소 배지 (Miller 1972) 에서 pLD-RcTV 를 가지는 대장균 형질전환체는 전혀 성장하지 못하는 반면, pLD-RcTV-G10L-CP4 EPSPS 를 가지는 대장균 형질전환체는 정상적인 성장을 보여, 형질전환 벡터로부터 CP4 EPSPS 가 정상적으로 발현될 수 있음을 확인하였다 (결과 미제시).

형질전환체 선발

벼 현탁배양은 다량의 배형성 세포를 빠른 시간 내에 손쉽게 얻을 수 있는 장점이 있다. Lee 등 (2006) 은 벼 색소체 형질전환을 위해 2-3 주된 캘러스를 재료로 이용하였기 때문에, 입자충 형질전환이나 형질전환체 선발과정을 거칠 때 각각의 캘러스를 개별적으로 옮겨주어야 하는 번거로움이 있었다. 하지만 현탁배양 세포를 형질전환 재료로 이용할 시에는 많은 양의 현탁배양 세포를 거름종이에 고정된 상태로 입자충 형질전환과 선발과정을 거치기 때문에, 처리 과정에서 시간과 노력이 절약된다. 또한 벼 캘러스는 암상태 배양 시에 스트렙토마이신에 의한 증식저해가 매우 약하게 나타남에 비하여 (Lee et al. 2006), 벼 현탁배양은 암상태에서 스트렙토마이신에 대한 감수성이 벼 캘러스에 비하여 높게 나타났다 (결과 미제시).

입자충 형질전환을 실시한 후 스트렙토마이신을 넣지 않은 AAM2 배지에서 배양한 결과, 벼 현탁배양은 활발하게 캘러스로 증식이 되었다 (Figure 2B). 곧 입자충에 의한 물리적인 스트레스가 벼 현탁배양의 증식에 미치는 영향은 미미하였다. 형질전환을 실시하지 않은 야생형의 현탁배양 세포는 스트렙토마이신 처리에 의하여, 증식이 저해되거나 검게 고사되었다 (Figure 2C). 입자충 형질전환 실시 후 스트렙토마이신이 포함된 AAM2 배지에서 암상태 배양하면, 4 개월 경과 후 스트렙토마이신에 저항성을 보이는 캘러스가 증식되어 육안으로 구별할 수 있었다 (Figure 2D). 약 70 회의 입자충법을 실시하였으며, 이로부터 독립적인 18 개의 스트렙토마이신 저항성 캘러스를 얻을 수 있었다.

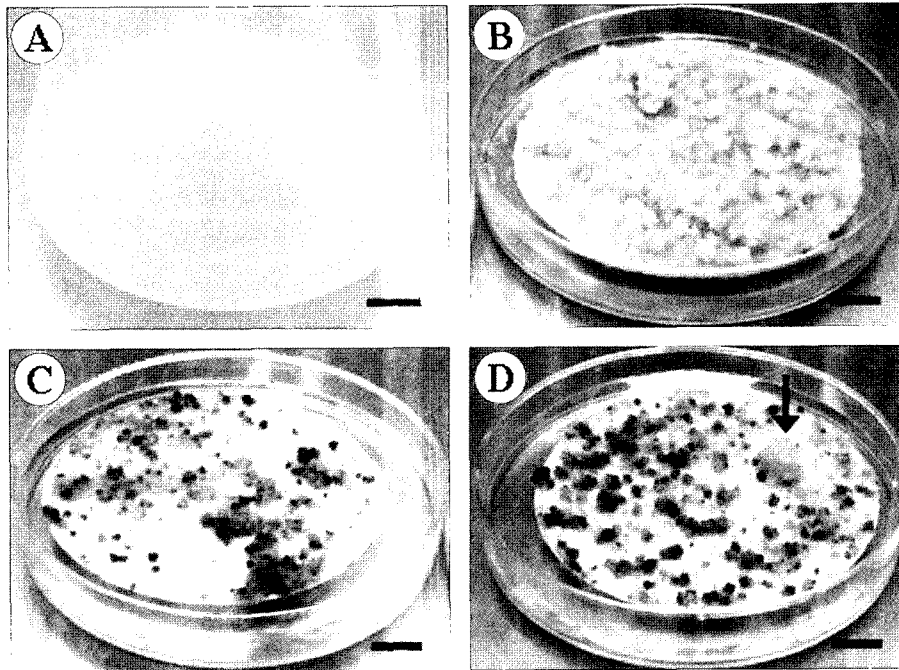


Figure 2. Selection of the transplastomic callus. A, Rice cell suspension culture as a bombardment material; B, Calli propagated from bombarded suspension cells after 4 months' incubation on AAM2 medium containing no streptomycin; C, Suspension cells cultured on AAM2 medium containing 500 mg/L of streptomycin for 4 months without bombardment; D, Calli (indicated by an arrow) induced from the bombarded suspension cells after 4 months' incubation on AAM2 medium containing 500 mg/L of streptomycin. Bar = 10 mm.

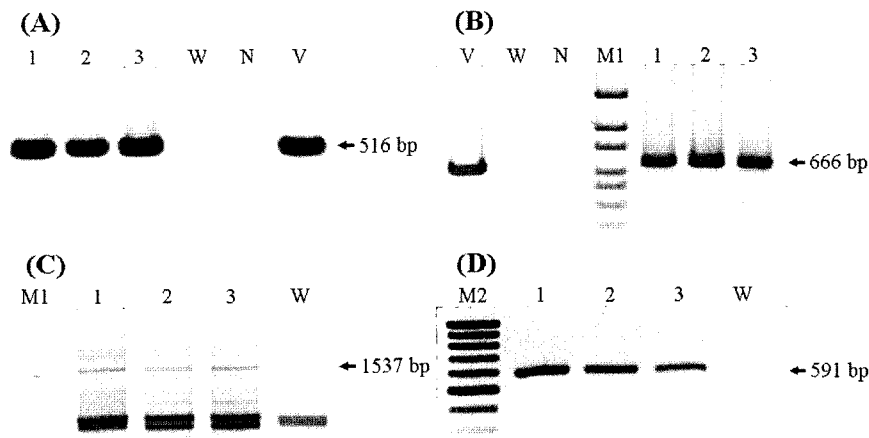
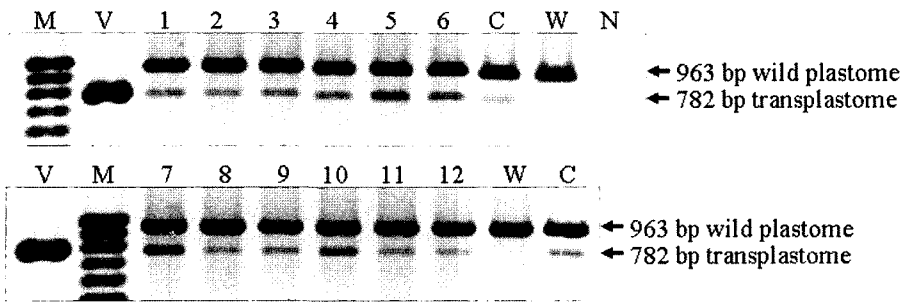


Figure 3. PCR analyses of streptomycin resistant calli derived from bombarded suspension cells. PCR analysis indicates the presence of the 516 bp *aadA* gene fragment (A) and the 666 bp *cp4-epsps* gene fragment (B) in all three of the streptomycin resistant calli. (C) The 1537 bp DNA fragment was amplified by PCR using one internal primer which binds to the *aadA* gene, and second primer, which binds to the native plastid genome adjacent to the flanking sequences utilized in homologous recombination. (D) Nested PCR analysis to confirm the amplification of the 1537 bp DNA fragment appeared in (C). M1, 100 bp DNA size marker (Biosesang, South Korea); M2, 100 bp DNA size marker (Corebio, South Korea); 1-3, transplastomic callus; W, wild type callus; N, non-template control; V, transformation vector, pLD-RcT_v-G10L-CP4 EPSPS as a positive control.

스트렙토마이신 저항성 캘러스의 색소체 형질전환 여부 확인

PCR 분석을 통하여 독립적인 18 개의 스트렙토마이신 저항성 캘러스 중에서 실제 형질전환된 개체는 하나임을 확인하였다. 벼 색소체 형질전환체는 *aadA* 유전자와 *cp4-epsps* 유전자 선택적인 프라이머 세트로부터 각각 516 bp 와 666 bp 의 증폭된 DNA 절편이 얻어져, 이 형질전환체는 두 유전자

를 포함하고 있음을 알 수 있었다 (Figure 3A, B). 벼의 야생형 색소체 지놈에서 형질전환 벡터의 상동 재조합 부위로부터 바깥쪽에 위치한 프라이머와 *aadA* 유전자에 위치하는 프라이머 세트를 이용한 PCR 분석에서 1537 bp 크기의 PCR 산물이 나타났으며 (Figure 3C), 이는 외래유전자가 상동재조합 부위를 통해 선택적으로 삽입되었음을 의미한다. 또한 1537 bp 의 PCR 산물은 nested PCR 분석을 통해 선택적인 증폭을 재확인 할 수 있었다 (Figure 3D). 결론적으로 색소체 지놈의



Relative	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	W	C
Relative H value	141	100	137	171	336	239	192	66	82	149	71	62	0	100

Figure 4. Genotyping analysis of the transplastomic calli and suspension cells for monitoring their heteroplasmic status (the ratio of transplastome: untransformed plastome) to estimate transplastome sorting efficiency of the different selection methods. PCR amplification showing the presence of the 782 and 963 bp fragments, representing the transplastome and untransformed plastome, respectively. Lanes 1-3: transplastomic calli cultured on semi-solidified AAM2 medium supplemented with 500, 1000, and 3000 mg/L of streptomycin, respectively; lanes 4-6: transplastomic calli re-propagated from suspension cells that were subjected to an additional selection cycle in agarose pie containing 0, 500, and 1000 mg/L of streptomycin, respectively; lanes 7-12, transplastomic suspension cells in liquid AAM1 medium supplemented with 500 mg/L of streptomycin (7, 10), 50 and 100 mg/L of glyphosate (8, 9), 500 mg/L of streptomycin plus 50 mg/L of glyphosate (11), 500 mg/L of streptomycin plus 100 mg/L of glyphosate (12); C, control transplastomic calli (before applying the additional selection cycles); M, 100 bp DNA size marker (Corebio, Korea); W, wild-type callus; N, non-template control. The relative 'H' value represents the level of transplastome relative to untransformed plastome, as compared to that of the control transplastomic calli.

상동 재조합을 통한 스트렙토마이신 저항성 형질전환 캘러스임을 확인하였다.

다양한 종류의 추가적인 선발 방법의 효과 검증

색소체 형질전환이 확인된 스트렙토마이신 저항성 캘러스는 암상태에서 스트렙토마이신이 포함된 배지에서 활발히 증식되었다 (결과 미제시). 하지만, 이 형질전환 캘러스를 스트렙토마이신이 포함된 재분화 배지에서 광상태 배양하면, 녹색을 띠지 않는 알비노 타입의 신초가 형성되었다 (Figure 7F). 야생형의 어린 신초를 스트렙토마이신이 포함된 배지에서 광상태 배양할 경우 검게 고사하는데 비하여 (Figure 7E), 알비노 타입의 신초가 형성되는 것은 형질전환체가 낮은 강도의 스트렙토마이신 저항성을 가지고 있음을 의미한다. 즉, 알비노 타입의 신초는 스트렙토마이신에 의해 색소체내 번역 과정이 저해되어 광합성 기구가 정상적으로 만들어지지 못하였기 때문에 나타난 현상으로 생각된다. 실제로 벼 캘러스는 스트렙토마이신에 대한 감수성이 암상태에 비하여, 광상태 배양에서 보다 뚜렷이 나타났다 (Lee et al. 2006). 이는 벼 캘러스 증식에서 색소체의 기능이 암조건 보다 광조건에서 보다 더 요구됨을 의미한다. 그리고 알비노 타입의 신초를 형성하는 캘러스의 경우, 비록 형질전환은 되었지만 야생형 색소체 지놈에 비하여 형질전환된 색소체 지놈의 비율이 매우 낮은 heteroplasmic 상태이기 때문에 *aadA* 유전자의 발현양은 광상태에서도 스트렙토마이신에 저항할 만큼 충분하지 않았

을 것으로 생각된다. 실제, 같은 방법으로 AAM2 ST500 배지에서 추가적인 암상태 계대배양을 실시한 뒤에도 여전히 알비노 타입의 신초만이 재분화되었다. 따라서 광상태에서도 스트렙토마이신에 저항하여 결과적으로 엽록소를 함유하는 녹색의 신초를 얻기 위해서는, 야생형 색소체 지놈에 비하여 형질전환된 색소체 지놈의 비율을 획기적으로 증가시킬 필요가 있었다.

형질전환된 색소체 지놈의 비율을 증가시키기 위해 크게 다음의 세 가지의 전략을 사용하였다 첫째, 암상태 캘러스 계대배양에서 선발압인 스트렙토마이신 농도를 높여주는 방법, 둘째, 스트렙토마이신 저항성 캘러스를 다시 현탁 배양화하고 현탁 배양 상태로 스트렙토마이신과 글리포세이트 등을 선발제로 처리하는 방법, 셋째, 아가로스 파이를 이용하여 형질전환된 현탁 세포군만을 선별적으로 증식시키는 방법 등이다. 서로 다른 종류의 추가적인 선발압을 14 주간 가한 다음, 야생형의 색소체 지놈과 형질전환된 색소체 지놈의 비율을 유전자형 분석 PCR 을 통해 모니터링 하였다. 이때 '형질전환된 색소체 지놈에 의한 PCR 밴드%' / '야생형 지놈 증폭에 의한 PCR 밴드%' 비율을 H 값 (H value; heteroplasmic status index) 으로 정의하고, 추가적인 선발압을 가하기 전의 형질전환 캘러스를 기준점 (100) 으로 하여 상대적인 H 값 (relative H value) 을 비교하였다 (Figure 4).

형질전환이 확인된 캘러스는 고농도 (1000 mg/L 또는 3000 mg/L) 의 스트렙토마이신이 포함된 배지에서 암상태 배양 시 정상적으로 증식되었다 (결과 미제시; Lee et al. 2006).

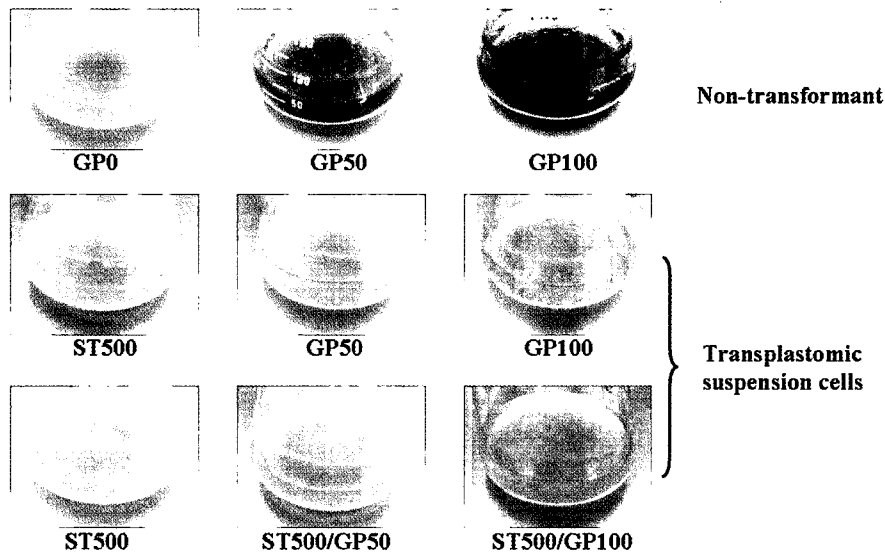


Figure 5. Glyphosate resistance test of transplastomic suspension cells. Wild type and transplastomic suspension cells were cultured for 19 days in liquid AAM1 medium supplemented with the different concentrations of the selection chemicals indicated down the pictures. Concentration units of streptomycin (ST) and glyphosate (GP) are mg/L.

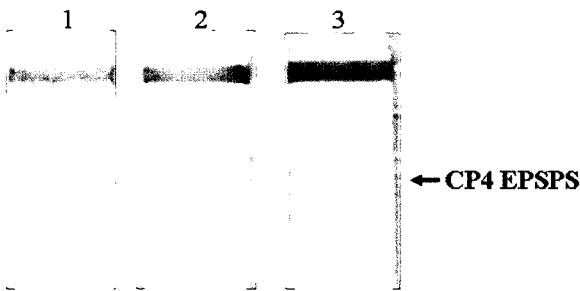


Figure 6. Lateral flow strip ELISA test of transplastomic callus. Lane 1, wild type mature leaf as a negative control; lane 2, the recombinant CP4 EPSPS expressed in *E. coli* lane 3, transplastomic calli re-propagated from suspension cells through agarose pie selection.

그러나 암상태 캘러스 계대 배양에서 단순히 스트렙토마이신 농도를 높여주거나 (Figure 4, lanes 1-3), 현탁배양 상태로 선 발압을 가하는 방법으로는 형질전환된 색소체 지놈의 비율을 크게 높일 수 없었다 (Figure 4, lanes 7-12). 육안으로 확인되는 크기의 캘러스는 무수히 많은 세포들로 구성되어 있다. 스트렙토마이신 저항성 캘러스는 다수의 비형질전환된 세포와 함께 극히 일부의 형질전환된 세포들이 원형질체연락사 등으로 유기적으로 연결되어 있을 것으로 생각된다. 암상태에서 스트렙토마이신은 선발 강도가 강력하지 않아서, 형질전환된 일부의 세포가 형질전환 되지 않은 세포를 스트렙토마이신의 독성으로부터 막아 주기 때문에 (Khan and Maliga 1999) 형질 전환되지 않은 부분도 여전히 증식된다. 따라서 특별히 야생형 세포를 제거하는 과정이 결여된 상태로, 단순히 캘러스 계대 배양을 반복하거나 현탁배양을 거치는 것만으로는 형질전환된 색소체 지놈의 비율을 효과적으로 증가시킬 수 없는 것

으로 판단된다.

반면 아가로스 파이 내에서 스트렙토마이신을 포함시켜, 형질전환된 현탁배양 세포군을 선별적으로 증식시킨 경우, 형질전환된 색소체 지놈의 비율이 현저하게 증가됨을 확인할 수 있었다 (Figure 4, lane 5). 특히 아가로스 파이에 500 mg/L의 스트렙토마이신을 가한 경우 H 값이 가장 높게 나타났으며, 이는 Lee 등 (2006) 에서의 결과보다 형질전환된 색소체 지놈의 비율이 훨씬 향상된 결과였다. 실제 ELISA 분석 결과, 아가로스파이 선발 방법을 통해 증식된 스트렙토마이신 저항성 캘러스는 CP4 EPSPS 를 단백질 수준에서도 발현하고 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 6). 이러한 결과는 벼 색소체 지놈에 제초제 저항성 유전자를 직접 형질전환하여, 단백질 수준에서 발현을 확인하고 제초제 저항성 형질을 확인한 최초의 결과이다.

아가로스 파이 선발 방법을 통해 증식된 캘러스를 500 mg/L의 스트렙토마이신이 포함된 재분화 배지를 이용하여 재분화 시킨 결과, 스트렙토마이신이 포함되지 않은 아가로스 파이로부터 증식된 캘러스는 여전히 알비노 타입의 신초를 형성하는 반면 (Figure 7C), 스트렙토마이신이 포함된 아가로스 파이에서 증식된 캘러스는 약한 연두색의 신초를 형성하였다 (Figure 7D). 또한 약한연두색의 신초를 200 mg/L 또는 500 mg/L의 스트렙토마이신이 포함된 뿌리 형성배지에서 배양 시, 약한 녹색의 신초와 함께 뿌리를 왕성하게 형성하였다 (Figure 7G, H). 반면 야생형의 신초는 500 mg/L의 스트렙토마이신이 포함된 배지에서 배양 시, 신초가 고사하면서 뿌리가 전혀 형성되지 않았으며 (Figure 7E), 추가적인 아가로스 파이 선발을 거치지 않은 형질전환체는 뿌리성장이

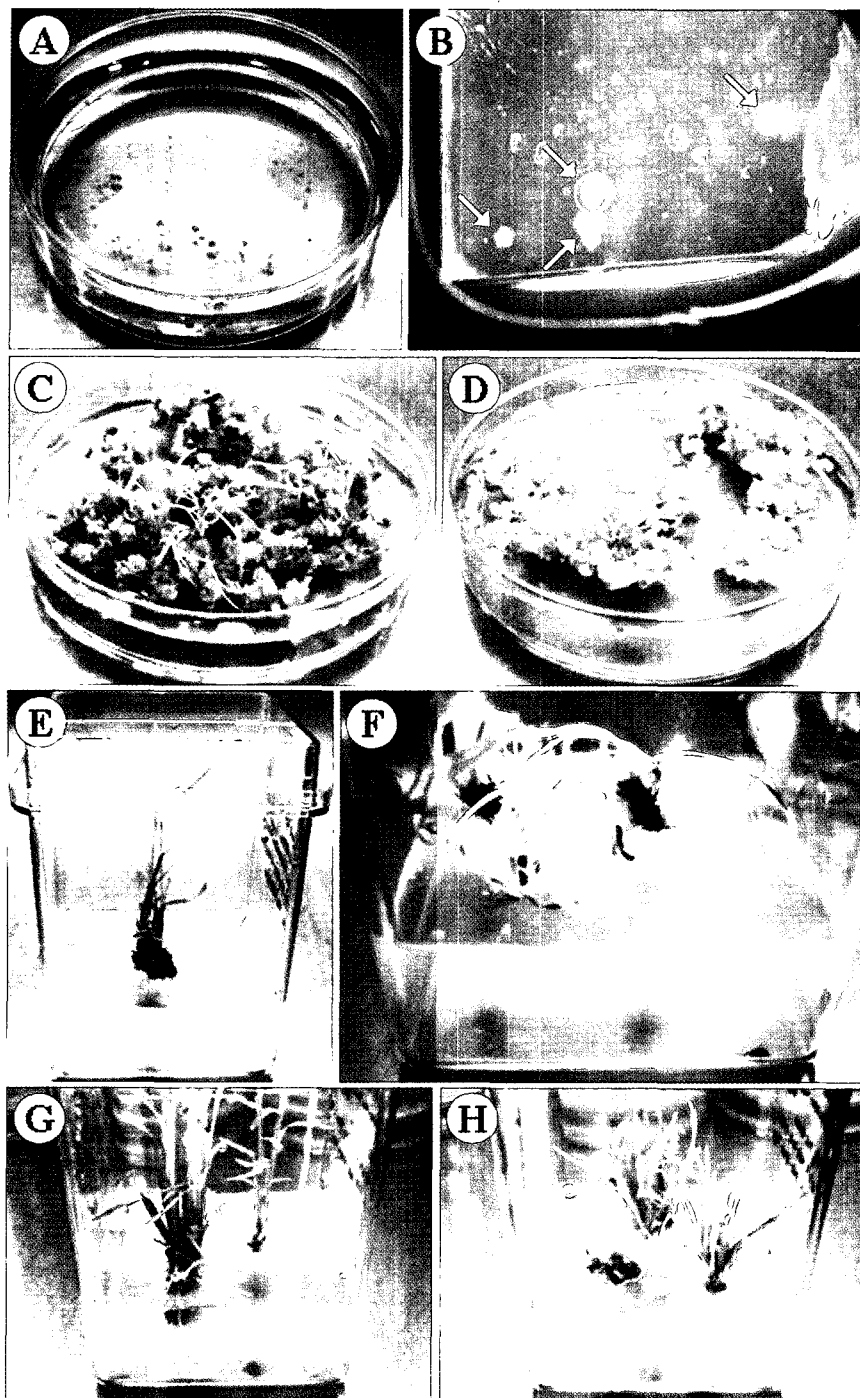


Figure 7. Agarose pie selection and generation of transplastomic plants. Transplastomic calli (marked with arrows) re-propagated from bombarded suspension cells that were subjected to an additional selection cycle in agarose pie containing 500 mg/L of streptomycin (A, B). Shoots were induced from transplastomic calli that had been re-propagated from bombarded suspension cells through the additional selection cycle in agarose pie containing 0 and 500 mg/L of streptomycin, respectively (C, D). A wild-type green plantlet became bleached and died after 8 weeks of incubation on rooting medium containing 500 mg/L of streptomycin (E). Albino shoots were induced from transplastomic calli that had been re-propagated from bombarded suspension cells without agarose pie selection. Roots were not produced after 4 weeks of culture on rooting medium containing 500 mg/L of streptomycin (F). Pale-green plantlets were regenerated from transplastomic calli that were subjected to an additional selection cycle in agarose pie containing 500 mg/L of streptomycin. Roots appeared after 4 weeks of culture on rooting medium supplemented with 200 and 500 mg/L of streptomycin, respectively (G, H).

부진한 알비노 타입의 신초를 형성하였다 (Figure 7F). 이러한 녹색 신초와 뿌리는 형질전환된 색소체 지놈의 비율이 현재

히 증가되어, *aadA* 유전자 발현량이 광상태에서도 스트렙토마이신에 저항할 정도로 증가되었기 때문에 형성된 것으로

생각된다. 따라서, 이러한 아가로스 파이 선발 전략은 벼 색소체형질전환에서 *homoplasm*y 상태로 유도하기 위해 주요한 하나의 방법으로 판단된다.

그러나, 스트렙토마이신이 포함된 뿌리형성 배지에서 두 달 이상을 배양하는 경우 녹색은 점차 사라져, 알비노 타입과 유사한 형태로 바뀌어버리는 한계점이 존재하였다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 다음 두 가지 방법을 제시할 수 있다. 첫째, 현탁 배양과 아가로스 파이 선발 전략을 여러 차례 번갈아 반복하는 방법이다. 즉, 아가로스 파이에서 증식된 캘러스를 고체 AAM1 ST500 배지에서 증식시켜 현탁배양이 용이한 friable 캘러스를 만든 다음, 액체 AAM1 ST500 배지에 접종하여 현탁 배양을 유지하고, 이로부터 얻어진 현탁 배양 세포를 아가로스 파이 내에서 선발과정을 다시 거치고, 이러한 일련의 과정을 여러 번 반복하는 것이다. 이러한 선발 과정의 반복은 담배 형질전환에서 어린 잎의 기관형성 능력을 이용하여 반복적인 선발압을 가하는 방법에 견주어 볼 수 있다 (Svab and Maliga 1993). 둘째, 원형질체를 이용한 아가로스 파이 선발 전략이다. 캘러스는 무수히 많은 세포가 연결되어 구성되며, 현탁 배양 세포군은 약 10-100 개 정도의 세포로 구성된다 (결과 미제시). 반면, 원형질체를 나출하는 경우 하나의 독립적인 세포로 존재하기 때문에 원형질체를 재료로 아가로스 파이 선발을 거칠 경우, 야생형 세포로부터 형질전환된 세포만을 선별적으로 선발하는 효율 (sorting efficiency) 이 크게 증가될 수 있을 것이다.

색소체 형질전환체의 글리포세이트 저항성 검증

글리포세이트는 비선택성 제초제인 Round-up 의 활성 성분인데, 방향족 아미노산의 생합성에 관여하는 시킵산 경로를 저해함으로써 살초 기작을 나타낸다 (Malik et al. 1989). 캘러스 유도용 배지에서 글리포세이트는 캘러스의 증식을 저해하지 않았는데, 이는 캘러스 유도용 배지가 casein hydrolysate 를 포함하여 방향족 아미노산을 공급하기 때문이다. Casein hydrolysate 를 제외한 캘러스 유도용 배지에서 100 mg/L의 글리포세이트는 캘러스의 증식을 명백하게 저해하였다 (결과 미제시). 한편, 현탁배양에 이용되는 AAM1 배지는 방향족 아미노산을 함유하지 않기 때문에 아미노산 조성의 조정 없이 글리포세이트 선발압을 가할 수 있다. 야생형의 현탁배양에 50 mg/L 또는 100 mg/L 의 글리포세이트를 가할 경우, 현탁 배양 세포는 검게 고사하였으며, 시간이 경과함에 따라 현탁배양 전체가 완전히 검은색으로 변하였다 (Figure 5). 반면 형질전환된 현탁배양은 50 mg/L 의 글리포세이트가 포함된 배지에서도 정상적으로 생육이 가능하였으며, 100 mg/L 의 글리포세이트가 포함된 배지에서도 극히 일부의 현

탁배양세포가 검게 고사하기도 했지만, 여전히 증식과 생육이 활발하였다 (Figure 5). 이는 앞서 기술한 색소체 형질전환체가 CP4 EPSPS 단백질을 발현하는 것 (Figure 6) 과 일치한다. 한편, 500 mg/L 의 스트렙토마이신 만이 포함된 경우 생육저해는 전혀 나타나지 않았으며, 스트렙토마이신과 글리포세이트를 동시에 처리한 경우에도 정상적인 생육이 가능하였다 (Figure 5). 끝으로, 현탁배양 상태로 선발압을 가할 때 글리포세이트 처리는 스트렙토마이신만을 처리한 경우와 비교하여 H 값이 낮음을 확인하였다 (Figure 4; lanes 7, 10 vs lanes 8, 9, 11, 12). 따라서 스트렙토마이신이 글리포세이트에 비하여 현탁배양에서 형질전환체 선발에 보다 효과적인 물질임을 알 수 있었다.

사 사

이 연구는 과학기술부 작물유전체기능연구사업단의 지원 (CG1520) 으로 수행되었으며, 강경수는 교육인적자원부 BK21 사업의 지원을 받았음.

인용문헌

Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hus C, Yin KC, Chu CY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* 18: 659-668

Daniell H, Datta R, Varma S, Gray S, Lee SB (1998) Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nat Biotechnol* 16: 345-348

Daniell H, Dhingra A (2002) Multigene engineering: dawn of an exciting new era in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 13: 136-141

Doyle J, Doyle J (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15

Dufourmantel N, Pelissier B, Garcon F, Peltier G, Ferullo JM, Tissot G (2004) Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Mol Biol* 55: 479-489

Kang K, Kim M (2006) The single amino acid changes in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4 and *Synechocystis* sp. PCC-6803 alter enzyme activity and glyphosate sensitivity. *Agric Chem Biotechnol* 49: 65-68

Khan MS, Maliga P (1999) Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nat Biotechnol* 17: 910-915

Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004a) Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol* 136: 2843-2854

- Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004b) Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Mol Biol* 56: 203-216
- Langbecker CL, Ye GN, Broyles DL, Duggan LL, Xu CW, Hajdukiewicz PT, Armstrong CL, Staub JM (2004) High-frequency transformation of undeveloped plastids in tobacco suspension cells. *Plant Physiol* 135: 39-46
- Lee K, Jeon H, Kim M (2002) Optimization of a mature embryo-based *in vitro* culture system for high-frequency somatic embryogenic callus induction and plant regeneration from japonica rice cultivars. *Plant Cell Tiss Org Cult* 71: 237-244
- Lee SM, Kang K, Chung H, Yoo SH, Xu XM, Lee SB, Cheong JJ, Daniell H, Kim M (2006) Plastid transformation in the monocotyledonous cereal crop, rice (*Oryza sativa*) and transmission of transgenes to their progeny. *Mol Cells* 21: 401-410
- Lelivelt CL, McCabe MS, Newell CA, Desnoo CB, van Dun KM, Birch-Machin I, Gray JC, Mills KH, Nugent JM (2005) Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Mol Biol* 58: 763-774
- Li Z, Murai N (1990) Efficient plant regeneration from rice protoplasts in general medium. *Plant Cell Rep* 9: 216-220
- Malik J, Barry G, Kishore G (1989) The herbicide glyphosate. *Biofactors* 2: 17-25
- Maliga P (2004) Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 55: 289-313
- Miller JH (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Muller AJ, Grafe R (1978) Isolation and characterization of cell lines of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase. *Mol Gen Genet* 161: 67-76
- Padgett SR, Re DB, Barry GF, Eichholtz DE, Delannay X, Fuchs RL, Kishore GM, Fraley RT (1996) New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup Ready gene. In: Duck SO, (eds), *Herbicide-Resistant Crop: Agricultural, Economic, Environmental, Regulatory and Technological Aspects*, CRC press, Boca Raton, pp 53-84
- Ruf S, Hermann M, Berger I, Carrer H, Bock R (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat Biotechnol* 19: 870-875
- Sidorov V, Kasten D, Pang SZ, Hajdukiewicz P, Staub J, Nehra N (1999) Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J* 19: 209-216
- Silhavy D, Maliga P (1988) Plastid promoter utilization in a rice embryogenic cell culture. *Curr Genet* 34: 67-70
- Skarjinskaia M, Svab Z, Maliga P (2003) Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed Brassicacea. *Transgenic Res* 12: 115-122
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn J, Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth Enzymol* 185: 60-89
- Svab Z, Maliga P (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 913-917
- Zubko MK, Zubko EI, van Zuilen K, Meyer P, Day A (2004) Stable transformation of petunia plastids. *Transgenic Res* 13: 23-530

(접수일자 2006년 7월 1일, 수리일자 2006년 8월 20일)