

第 2 次 年 度
年 次 報 告 書

體細胞 變異體와 遺傳工學 方法을 利用한 林木育種
및 有用 Vector 操作, 導入에 관한 研究 (II)

Studies on the Development of Biotechnology Techniques applied to Forest Tree Breeding Using Selection of Somaclone and Ti-plasmid Vector System, and on Vector Construction for Transformation of Poplar (II)

研 究 機 關

山林廳 林木育種研究所

1991. 7.

科 學 技 術 處

提 出 文

科學技術處長官 貴下

本 報告書를 “體細胞 變異體와 遺傳工學方法을 利用한 林木育種 및 有用
Vector 操作, 導入에 關한 研究” 의 第2 次年度 報告書로 提出합니다.

1991. 7.

研 究 機 關 : 山林廳 林木育種研究所

總括研究責任者 : 盧 義 來

여 백

要 約 文

I. 題 目

體細胞 變異體와 遺傳工學方法을 利用한 林木育種 및 有用 Vector操作, 導入에 관한 研究

II. 研究開發의 目的 및 重要性

現在 全世界的으로 볼때 國際 木材需要는 2000年代까지 年間 0.5 ~ 3% 比率로 점차 증가될 것이나 木材供給은 主要木材 生産國의 山林資源 保護政策 등으로 현재와 같이 圓滑치 못하리라는 分析이 支配的이다. 따라서 年間 木材 總消費量의 85%를 輸入에 依存하는 우리나라의 경우에 있어서는 시급히 國內 木材自給率을 높일 수 있는 綜合的인 對策이 그 어느때보다 절실히 요구되고 있다. 國內林木 蓄積量을 높이기 위해서는 撫育, 施肥등 造林的方法에 의해 育林을 해나가는 것도 중요하지만 이 방법의 문제는 임목의 Genetic potential 그 자체를 향상시키는데 限界가 있다는 점이다. 따라서 보다 높은 生産性을 보이는 有用形質의 林木을 어떠한 育種方法에 의해 開發하느냐가 最大의 關件이 되는 것이다.

그러나 일반적으로 임목은 1년생 草本類와 달리 한 世代의 길이가 길고 繁殖上의 어려움으로 보다 우수한 形質을 지닌 새로운 品種을 개발하는데 많은 時間과 經費를 要한다. 특히 林木育種의 중심이 되어왔던 選拔 및 交雜育種에 있어서 必須 先行條件이라 할 수 있는 主要經濟樹種들에 대한 可用遺傳變異의 幅이 第2次 世界大戰 및 韓國動亂을 前後로 줄어들어 在來의 育種方法에 의한 우수林木의 開發을 더욱더 어렵게 하고 있다.

한편, 최근 십수년간 급속히 발달해온 分子生物學은 微生物은 물론, 高等動

植物에서의 特定遺傳子の 確認과 發現 그리고 遺傳子 操作에 의한 形質轉換 體의 確立을 可能하게 함으로써 이를 既存의 育種方法에 이용하려는 시도가 많이 되고 있다. 그 實例로 農作物의 경우에는는 특정 Virus나 病害虫의 侵入과 成長을 選擇적으로 沮害할 수 있는 遺傳子를 確認하여 이를 遺傳子再組合 技術에 의해 作物의 Genome內에 挿入, 發現시킴으로써 새로운 耐病, 耐虫性 品種을 개발하고 있어, 이 방법에 의한 農作物의 生産性增大 可能性을 밝게 해주고 있다. 그러나 林木의 경우에 있어서는 遺傳子再組合 技法의 實際的 利用에 先行條件이라 할 수 있는 分子生物學 및 Biotechnology技術이 아직 確立되어 있지 않은 상태이기 때문에 이 分野에 대한 研究가 活性化되어 꾸준히 진행된다면 既存의 育種方法에 適用하여 瘠惡 乾燥한 우리나라 山地에 植栽可能하며 높은 生産성을 보일 수 있는 造林樹種을 충분히 開發할 수 있을 것이다.

이에 本 研究에서는 Poplar를 對象으로 Biotechnology技術을 利用, 이러한 造林樹種을 開發하는데 必要한 基礎資料를 提供하기 위하여 細胞 및 組織培養을 통해 耐酸性, 耐乾性の 體細胞變異體를 選拔하고 植物形質轉換技法中 Direct gene transfer system인 Electroporation방법을 이용하는 林木形質轉換 技法을 確立하고 林木 및 其他作物에도 適用possible한 Vector system을 開發하고자 修行되었다.

Ⅲ. 研究開發의 內容 및 範圍

本 研究를 效果的으로 修行하기 위하여 다음 3部分으로 나누어 修行하였다.

1. 體細胞 變異體 選拔 및 根系의 形質轉換

가. *Agrobacterium rhizogenes*의 接種

- 나. Hairy root로부터 再分化
- 다. Opine分析
- 2. Electroporation방법에 의한 현사시나무의 形質轉換
 - 가. Protoplast의 分離
 - 나. Protoplast 培養條件 檢定
 - 다. pBI121 plasmid의 純粹分離
 - 라. 適正 Electroporation條件 檢定 및 GUS遺傳子の 導入
 - 마. GUS遺傳子の 發現檢定 및 形質轉換된 細胞의 培養
- 3. 林木의 形質轉換을 위한 Ti-plasmid Vector system의 開發
 - 가. pBIN 19 및 pDO 432 plasmid의 Hind III DNA節片의 分離
 - 나. DNA ligation을 통한 特定 Reporter 遺傳子를 갖는 Intermediate Vector의 Construction 및 確認

IV. 研究開發 結果 및 活用に 關한 建議

第 2 次年度の 研究實績에 의거한 最終結果는 第 3 次年度에 報告할 것이며 第 2 次年度の 研究結果만을 分野別로 나누어 要約하면 다음과 같다.

1. 體細胞 變異體 選拔 및 根系의 形質轉換

이태리 포플러의 耐酸性 및 耐乾性を 증진시키기 위하여 세포배양을 통하여 器內에서 Al-EDTA와 PEG에 耐性인 cell을 選拔하고 재분화시켜(1次) 이를 *Agrobacterium rhizogenes* strain A4, 15834, 11325로 接種하여 hairy root를 유도하였으며 opine分析을 통해 形質轉換되었음을 確認할 수 있었다. 이상을 綜合해 보면 아래와 같다.

1) Al-EDTA와 PEG에 선발된 이태리포플러 잎과 줄기에 *Agrobacterium rhizogenes* A4, 11325, 15834를 接種하여 뿌리의 形質轉換을 유도하여 성공

적으로 hairy root를 얻었으며 잎보다는 줄기에서 hairy root의 발달이 더 좋았고 특히, A4 strain에서 hairy root가 가장 잘 발달되었다.

2) *A. rhizogenes*의接種에 의하여發生된 hairy root로부터 다량의 식물체를 유도하였으며 strain별로는 A4와 11325에서 10 ~ 15개의 shoot를 발생시켰으며 BAP농도실험에서는 모든 strain에서 0.5 mg/l 처리구가 가장 우수하였다.

3) Agropine type A4, 15834와 Nopaline type인 11325을接種하여發生한 hairy root를分析하여 opine물질을 합성함을 確認하여 形質轉換되었음을 確認하였다.

2. Electroporation方法에 의한 현사시나무의 形質轉換

GUS gene을 가지고 있는 pBI121 plasmid를 electroporation방법을 통해 *Populus alba* × *P. glandulosa*의 protoplast내로 挿入시킨 뒤 protoplast로부터 形質轉換體를 유도하기 위한 實驗結果를 要約하면 다음과 같다.

1) *Populus alba* × *P. glandulosa*의 幼葉 및 callus로부터 protoplast를 분리하기 위한 최적의 조건은 1% cellulase, 0.1% Macerozyme R-10, 0.1% Pectolyase Y-23, 0.5% Hemicellulase, 0.1% BSA의 조성에서 그리고 Callus를 시료로 하였을 경우 5.8×10^6 protoplast/g F.W로 가장 좋게 나타났다.

2) Electroporation을 실시한 결과 Field strength가 500 ~ 667 V/cm, Capacitance는 490 μ F, 그리고 pulse duration은 10 msec인 조건에서 가장 높은 GUS activity를 나타내어 최적의 조건임을 알 수 있었다.

3) Electroporation에 의한 GUS gene의 발현을 시간에 따라 살펴본 결과 7일을 고비로 점차 감소되는 전형적인 transient gene expression의 양상을 나타내었다.

4) Electroporation을 실시한 protoplast를 75 mg/l kanamycin, 0.5 mg/l BAP, 2 mg/l 2, 4-D, 1% Agarose가 添加된 MS배지에서 계대배양 하면서 完全한 transformants의 選拔을 유도했으나 5 mm 정도 자란 이후에는 더이상의 生長을 보이지는 않았다. 따라서 현재 계속적인 재분화 유도를 수행 중이다.

3. 林木의 形質轉換을 위한 Ti-plasmid Vector System의 開發

임목 및 작물의 형질전환을 위한 Vector System의 개발을 위해 必要的한 reporter 유전자의 분리 및 intermediate vector로의 도입에 관한 연구를 수행하였다.

1) pBIN 19과 pDO 432의 HindIII fragment를 ligation시켜 17.3 kb 크기의 intermediate vector를 만들었다.

2) pBINAR과 pDO 432의 BamH I fragment를 ligation시켜 12.6 kb 크기의 intermediate vector를 만들었다. 이 vector는 크기가 작고 다양하게 이용할 수 있는 luciferase 유전자를 report 유전자로 가지고 있어 식물체의 형질전환에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

SUMMARY

I. Title of Project

Studies on the Development of Biotechnology Techniques applied to Forest Tree Breeding using Selection of Somaclone and Ti-plasmid Vector System, and on Vector Construction for Transformation of Poplar.

II. Objectives of Research and its Importance

It is generally prospected that the international wood demands will gradually increase at the rate of 0.5~3.0% until the end of the 21th century. At the same time, due to the national policy of natural forest conservation in timber exporting countries, the wood supply will not be sufficient for the future demands. In our country, the 85% of domestic wood demands has depended upon imports from those countries. Therefore, it is very important to consider a proper countermeasure for the domestic wood self-supply.

For the increase of domestic timber stocks, various silvicultural methods such as tending and fertilization have been generally applied. But these methods have limits because they can merely enhance productivity within the limit of the given genetic potential. Thus we must consider breeding program that can improve genetic potential of trees for useful characteristics.

However, there are also several problems in enhancement of forest productivity by conventional tree improvement. The first problem is that trees have long generation intervals, therefore, it takes more time and much cost to improve them. The second is that we have lost almost all of the good genetic quality stands of major economic tree species. Namely, for building houses and fire wood, trees of excellent form and size have been harvested for several centuries, and so only those trees of poor form and quality left behind. Besides this, heavy exploitation took place during the Japanese colonization and the Korean war. Results of that, our forest land was totally destroyed, and nowadays we have only

relatively small genetic variation to use in tree improvement. These poor conditions prevent us from improving useful trees by conventional tree breeding, today.

Recently, as well-defined biotechnology became available, those techniques combined with conventional plant breeding are considered as the best method to introduce transformed plants with useful characteristics *in vitro*. Actually, many scientists have tried to create anti-viral and anti-insect crop plants by DNA recombination techniques and plant transformation. Hence, we expect that crop productivity will be increased through these ways in the future. For tree species, however, it is still premature and hasty to expect increase of productivity by applying these techniques into tree breeding. Because only a few studies of transformation and gene recombination have been conducted. Thus, it is necessary to conduct various studies on the pattern of special gene expression, detection and purification of useful gene, tissue culture system, construction of plant vector system, and transformation system of woody plants.

With this reason, we have conducted studies on the selection of somatic cellular variants of poplars with acidic and drought tolerance by *in vitro* cell and tissue culture, and the development of transformation techniques by electroporation. We also studied the construction of some vector system applied to forest trees. We confirm that these studies provided useful informations for the improvement of forest trees by applying biotechnology in combination with conventional tree breeding technique.

III. The Content of Research and Scope

1. The selection of somaclone and transformation of root system for poplar improvement
 - 1) Infection of *Agrobacterium rhizogenes* into poplar
 - 2) Regeneration of poplar from hairy root
 - 3) Opine analysis
2. Transformation of poplar by electroporation technique

- 1) Protoplast isolation
 - 2) Test of protoplast culture conditions
 - 3) Purification of pBI121 plasmid
 - 4) Test of electroporation conditions and introduction of GUS gene into protoplast
 - 5) Verify the expression of GUS gene and transformed cell culture
3. Vector construction of Ti-plasmid vector system containing luciferase as a reporter gene
- 1) Purification and isolation of HindIII-digested DNA fragment from pBIN 19 and pDO432 plasmid
 - 2) Detection of intermediated vector with special reporter gene which was constructed by DNA ligation

IV. Results of the studies and some proposals

1. The selection of somaclone and transformation of root system for poplar improvement

We selected and cultured cell lines with tolerance to PEG and Al-EDTA by *in vitro* culture in order to improve acid and drought resistant poplars. We also infected several *Agrobacterium rhizogenes* strains into leaf and stem tissues of above selected poplars. Finally we induced hairy root from those tissues and regenerated transformed whole plants.

- 1) We infected *A. rhizogenes* A₄, 11325, and 15834 strains into leaf and stem tissues of poplar which were considered as drought and acid resistant poplars. And then we could induce hairy root from those transformed stem tissues. The induction of hairy root was easier in transformed stem tissues than in leaf tissues, and was better in A₄ strain than in any other strains.

- 2) We could regenerate transformed whole plant from hairy roots that induced by *A. rhizogenes*. The MS medium with BAP 0.5 mg/l was suitable for culturing and regenerating those transformed plants.

3) Finally, we could detect newly synthesized opine in hairy root tissues which were transformed and induced by agropine type A₄, 15834 strain and nopaline type 11325 strain. Therefore, the induced whole plants were considered as successfully transformed plants by *A. rhizogenes*.

2. Transformation of poplar by electroporation technique

We studied the transformation of *Populus alba* × *glandulosa* by electroporation technique.

1) The combined treatment of 1.0% cellulase, 0.1% Macerozyme R-10, 0.1% pectolyase Y-23, 0.5% hemicellulase, and 0.1% BSA was the optimal condition for protoplast isolation from young leaves and calli of *Populus alba* × *glandulosa*. The protoplast yield was 5.8×10^6 protoplast/g F.W. at this condition.

2) The highest GUS gene activity was detected at the combination of 500~667 V/cm (Field strength), 490 μ F (Capacitance), and 10ms(Pulse duration). It was shown that this condition was the optimal condition of transformation of poplar by electroporation technique.

3) We examined the GUS gene expression level of electroporated protoplasts according to the time course. The GUS gene expression level was decreased after 7-day, which was the typical transient gene expression pattern.

4) Electroporated protoplasts were cultured on MS media containing 75mg/1 kanamycin, 0.5mg/1 BAP, 2mg/1 2,4-D, and 1% agarose. We tried to select the transformant, but the cell colonies did not grow more than 5mm in diameter. Thus, we are trying to induce the whole plant from cell colonies.

3. Vector construction of Ti-plasmid vector system containing luciferase as a reporter gene

1) The 17.3kb intermediate vector was constructed which was composed with pBIN19 and pDO432 Hind III fragment. The pDO432 Hind III fragment contains luciferase gene

2) The 12.6kb intermediate vector was constructed which was composed with pBINAR

and pDO432 BamH I fragment. This vector has small size and it is available for many kind of experiments. It will be useful for transformation of forest trees and many other plants.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	17
Chapter 2. Selection of Somaclone and Transformation of Root systems for Poplar Improvement	23
Section 1. Introduction	25
Section 2. Materials and Methods	28
Section 3. Results and Discussion	31
Section 4. Abstract	38
Chapter 3. Transformation of Poplars by Electroporation Techniques ...	43
Section 1. Introduction	45
Section 2. Materials and Methods	48
Section 3. Results and Discussion	57
Section 4. Abstract	66
Chapter 4. Vector Construction of Ti-plasmid Vector System Containing Luciferase as a Reporter Gene	69
Section 1. Introduction	71
Section 2. Materials and Methods	73
Section 3. Results and Discussion	77
Section 4. Abstract	84

여 백

總 目 次

第1章 緒 論	17
第2章 體細胞 變異體 選拔 및 根系의 形質轉換	23
第1節 緒 言	25
第2節 材料 및 方法	28
第3節 結果 및 考察	31
第4節 摘 要	38
第3章 Electroporation 方法에 의한 현사시나무의 形質轉換	43
第1節 緒 言	45
第2節 材料 및 方法	48
第3節 結果 및 考察	57
第4節 摘 要	66
第4章 林木의 形質轉換을 위한 Ti-plasmid Vector System의 開發 ...	69
第1節 緒 言	71
第2節 材料 및 方法	73
第3節 結果 및 考察	77
第4節 摘 要	84

여 백

第 1 章 緒 論
INTRODUCTION

여 백

第 1 章 緒 論

일반적으로 임목은 1년생 초본류와는 달리 한 世代의 길이가 길기 때문에 보다 우수한 형질을 지닌 새로운 品種을 개발하는데 많은 시간과 경비를 요한다. 특히 임목육종의 중심이 되어왔던 選拔 및 交雜育種에 있어서 必須 선행조건이라 할 수 있는 主要經濟 樹種들에 대한 可用 遺傳變異의 幅이 제 2차 세계대전 및 한국동란을 전후로 급격히 줄어들어 在來의 육종방법에 의한 우수임목의 개발을 보다 어렵게 하고 있다.

한편, 최근 십수년간 급속히 발달해온 분자생물학은 미생물은 물론, 고등동 식물에서의 특정 유전자의 확인과 발현 그리고 유전자 조작에 의한 형질전환체의 確立을 可能하게 함으로써 이를 既存의 육종방법에 이용하려는 시도가 많이 시도되고 있다. 이러한 유전자 재조합기술을 이용한 식물체의 형질전환 방법에는 크게 2가지로 나누어 볼 수 있는데 ① *Agrobacteria*의 Ti-plasmid 또는 viral vector를 이용한 gene transfer system과 ② Electroporation 등 naked DNA Transformation이 바로 그것이다. 이중 어느 방법이 가장 效率的이라고 단정지을수는 없는데 그 이유는 사용되는 대상식물체의 종류에 따라 위의 두가지 방법에 의한 형질전환체의 確立與否가 결정되기 때문이다. 다만 보편적으로 생각되어지고 있는 것은 농작물의 경우 주요 경제작물인 단자엽의 벼과식물을 제외한 수종들에 있어서 *Agrobacteria*의 Ti-plasmid를 이용하는 것이 비교적 안정적으로 그리고 效率的으로 외래 DNA를 식물체의 Genome에 挿入시킬 수 있다고 한다. 그러나 농작물의 品種改良에서 주요대상수종은 *Agrobacteria*에 infection이 잘되지 않는 단자엽 식물이기 때문에 Electroporation과 같은 Direct gene transfer system도 그 나름대로의 중요성과 의미를 지닌다고 하겠다. 임목의 경우에 있어서는 대부

분의 목본식물이 雙子葉 식물이기 때문에 Ti-plasmid를 이용한 형질전환 방법이 效率的이라고는 하나, 소나무와 같이 Resin을 많이 가지고 있는 수종들에 있어서는 Agrobacteria에 의한 infection이 수월하지 않기 때문에 문제가 되고 있으며 무엇보다도 농작물에서와 같은 수준의 연구결과 集積이 이루어져 있지 않기 때문에 아직까지 이렇다할만한 성과를 보여주지 못하고 있다.

식물체의 형질전환방법이 무엇이든간에 DNA 재조합기술을 실질적으로 農林業에서의 新品種 개발에 이용하기 위해서는 몇가지 선행조건이 따른다고 볼 수 있다. 첫째로는 식물체의 Genome내로 挿入할 유용유전자의 확인과 그 발현기작의 糾明이며, 둘째로는 확인된 유전자의 도입을 위한 效率的인 Gene transfer system의 개발이며, 마지막으로 세번째는 형질전환된 세포 또는 조직으로부터의 적정배양방법에 의한 Whole plant의 유도가 바로 그것이다. 일년생작물의 식물형질전환 분야에 있어서는 사용될 유전자의 확인과 Vector system의 개발 그리고 조직배양을 통한 재분화 기법이 상당수준까지 도달되어 있어 앞서 言及한 선행조건들중 상당한 부분을 충족시켜 주고 있기 때문에 유용형질을 지닌 새로운 식물체의 創出可能性을 점차 밝게 해주고 있다. 그러나 임목의 경우는 유용유전자의 확인은 물론이고 적정 Gene transfer system의 개발도 이루어져 있지 않기 때문에 유전자 재조합기술을 당장 直接的으로 임목육종에 적용시킬 단계는 아니며, 따라서 다년생인 임목을 대상으로 하는 새로운 Vector system의 개발과 아울러 Gene transfer system의 確立을 단계적으로 추진, 수행하는 것이 유용임목의 開發 可能性을 높여주는 첩경이라고 생각된다.

현재 전세계적으로 볼때 국제목재수요는 2000년대까지 연간 0.5~3% 比率로 점차 증가될 것이나 목재공급은 주요목재 생산국의 산림자원보호 정

책등으로 현재와 같이 원활치 못하리라는 분석이 지배적이다. 따라서 연간 국내목재 총소비량의 85%를 수입에 依存하는 우리나라의 경우에 있어서는 유용형질을 지닌 임목의 개발이 그 어느때보다 절실히 요구되고 있는 실정이나 앞서 言及한 바와 같이 많은 시간과 경비를 요하는 既存의 육종방법으로는 단시일내에 이 문제를 해결할 수는 없기 때문에 농작물에서 어느정도 성과를 보이고 있는 유전자 재조합기술의 도입이 더욱더 必要한 것이다.

이에 본 연구는 속성수로써 우리나라 주요 조림수종인 Poplar를 대상으로 제 1차년도 연구에 이어 세포 및 조직배양을 통해 瘠惡地에서 우수한 생장을 보이는 다수의 체세포 변이체를 선발하고 Direct gene transfer system의 하나인 Electroporation을 이용, 외래유전자를 插入, 발현시킬 수 있는 일련의 임목형질 전환기법을 確立하며 동시에 插入 및 發現效率이 높은 임목형질전환용 Vector system의 개발을 목표로 하여 수행되었는 바, 여기에서 얻어진 결과는 먼저 瘠惡地에 식재 可能하고 빠른 생장을 보이는 poplar 新品種育種에 적용할 수 있는 유전공학적 기법을 제시해 줄 수 있을 것이며 또한 Poplar이외의 임목형질전환 연구에 많은 도움을 주리라 생각된다.

여 백

第 2 章 體細胞 變異體 選拔 및 根系의 形質轉換

Selection of somaclone and Transformation of Root systems for Poplar Improvement

研究機關名：山林廳 林木育種研究所

研究責任者：盧 義 來

研 究 員：具 永 本

李 成 奎

金 卿 淑

여 백

第1節 緒 言

지금까지 各國에서 研究한 結果에 의하면 培養細胞에서 얻어진 變異細胞株의 數는 많으나 그중에 確實이 突然變異에 의한 것이라고 判斷되는 것의 수는 少數에 不過하다. 나머지 變異들은 細胞水準에서의 變異이건, 再生된 植物體에서 나타난 것이건 모두 合하여 variant 즉, 變異體라고 해서 突然變異體와 區別하고 있다. 變異細胞中에서 染色體異常에 起因된 것은 遺傳子 突然變異 以外에는 다른 性質의 것이지만 遺傳的인 突然變異임에는 틀림이 없으므로 設사 植物體分化가 않되었다 해도 突然變異에 包含시켜야 한다고 報告되고 있다(27). 1981년 Larkin과 Scowroft에 의하여 Somaclonal variation이라는 用語가 定立된 이래 農作物의 경우는 母體에 비하여 優秀한 生長을 보이는 다수의 體細胞 變異體들이 選拔된 바 있으며(14), 林木의 경우는 初步的인 段階에 있다. somaclonal variation의 原因이야 무엇이든 aseptic culture system에서 자주 나타나는 現象이고 그 出現頻度は 培養期間이 길면 길수록 變異가 잘 나타난다고 報告되고 있으며(23), 이를 利用하여 品種改良의 重要한 手段으로 活用하고 있다(3, 24). 林木에서 보면 잣나무털늑病에 대한 抵抗성을 細胞培養을 통하여 選拔하고 있으며(9), 포플러의 경우 *Septoria musiva*에 대한 抵抗性 變異體選拔의 手段으로 活用하고 있다(19). 또한 細胞培養을 통하여 器內에서 PEG (polyethylene Glycol)에 耐性細胞를 選拔하므로써 water stress나, drought tolerance에 강한 品種을 選拔하고 있다(11, 24).

土壤中 養分の 變化는 化學反應과 生物活動에 의한 두가지 過程에 의해서 이루어 지는데, 이것이 pH에 의해서 크게 影響을 받고 있다. pH는 養分變化의 調整者라 할수 있으나 이와 반대로 化學反應과 生物活動의 結果로서

pH自體도 變化하는 複雜한 過程이 土壤中에서 전개되고 있다. 強酸性下에서는 Aluminium (Al)이 活性化되어 Al^{+++} 또는 $Al(OH)^{++}$ 가 되고 硅酸鹽粘土鑛物의 陰性에 의하여 吸着되는데, 吸着된 Al이온의 일부는 콜로이드로부터 解離하여 土壤溶液에 Al^{+++} 이 溶出되고 이 이온이 加水分解하여 $Al^{+++} + H_2O \rightarrow Al(OH)^{++} + H^+$ 수소이온을 만든다. 이때문에 強酸性 土壤이 갖는 水素이온은 주로 Al^{+++} 에 基因하는 것이다(26).

一般的으로 Al毒性的 被害는 pH 5.5 以上에서는 잘 나타나지 않고, 酸度가 낮은 5.0 以下에서 被害가 심하며, Al 溶出이 급격히 增加하여 나타나는 被害症狀는 磷酸의 缺乏症狀와 매우 비슷하고 細胞分裂을 抑制하며, Root tip의 生長이 抑制되고 뿌리 끝부분이 뭉뚝하고 주걱모양을 하는 特性을 나타내어 結果적으로 旱魃의 被害에 敏感한 反應을 나타낸다(10, 22). 林木의 경우에서는 뿌리와 줄기生長이 減少한다고 報告하고 있다(16).

특히 林木에서 포플러屬은 生物工學 研究의 重要한 資料로 活用되고 있으며(5), 이러한 研究結果를 根據로하여 1次年度에는 Al과 PEG에 耐性인 細胞를 選拔하고 再分化하여 植物體를 誘導하였다. 2年次에는 이를 基礎로하여 耐酸性 및 耐瘠地性を 增進하기 위하여 *Agrobacterium rhizogenes*를 接種하여 뿌리의 形質轉換을 試圖하였다.

*A. rhizogenes*는 rhizobiaceae屬에 속하는 Gram-negative 土壤細菌으로 雙子葉 植物에서 廣範圍한 病原性を 나타내며(12), 주로 植物體의 傷處部位에 細菌이 感染되면 이 細菌이 가진 大形の root inducing(Ri) plasmid의 DNA 일부(T-DNA)를 植物體 genome으로 轉移시킴으로써 hairy root를 유기하게 되고 遺傳的인 形質轉換이 이루어 진다고 報告하고 있다(4). *A. rhizogenes*가 *A. tumefaciens*보다 有利한 것은 Ri-plasmid에 의하여 유기된 hairy root는 植物體의 再分化가 可能하며 部分的(地下部)으로만 形質

轉換시켜 植物改良에 利用할 수 있다는 것이다(4). Ti-plasmid나 Ri-plasmid가 植物의 genome에 挿入되는 部分을 T-DNA라고 하는데 그 속에 있는 遺傳子들이 發現되어 나타나는 代表的인 產物은 opine과 植物홀몬이며 (25), opine은 構造에 따라 agropine, nopaline, octopine, agrocinopine로 區分된다(21).

*A. rhizogenes*에 의한 形質轉換을 試圖한 研究結果를 알아보면, 雙子葉植物에서 寄主범위에 관한 實驗은 De Cleene(8)가 溫室에서 202種의 植物을 對象으로 하여 18%인 37種에서 hairy root를 얻었으며, 1988년 Mugniger(18)는 *A. rhizogenes* A4를 利用하여 44種의 植物에서 形質轉換된 組織을 얻었다. 特히 그는 形質轉換된 *Anagallis arvensis*을 土壤에 심어 正常的인 生長을 하였지만 長日에서는 正常植物에 比하여 開花가 잘되지 않음을 보고한 바있다. David와 Temp(7)는 cauliflower의 組織培養苗에 接種하였을 때 agropine type strain이 manopine type strain에 比하여 보다 많은 hairy root를 얻었음을 報告하였다. 이외에도 作物의 경우 *A. rhizogenes*을 接種하여 hairy root로부터 再分化하여 形質轉換體를 얻었으며 이들은 branch root의 發達이 優秀함을 報告하였다(1). Lambert等(13)은 사과나무의 增殖方法을 改良하기 위하여 *A. rhizogenes*을 利用하여 改良可能性을 究明하고, 形質轉換된 뿌리와 正常的인 줄기를 가지는 chimeric plant를 얻었으며, Moore等(17)은 사과나무에 *A. rhizogenes*을 接種하여 正常的인 나무보다 耐乾性이 增進되었음을 報告하였다.

變異體를 利用하여 耐酸性 및 耐乾性 즉, Aluminium에 耐性인 變異體를 器內에서 選拔하고(1年次), 이를 利用하여 *A. rhizogenes*에 의한 뿌리의 形質轉換을 試圖하여 앞으로 우리나라의 瘠惡한 山地에 植栽할 수 있는 포플러類 品種育成의 基礎資料로 活用하는데 그 目的이 있다.

第2節 材料 및 方法

1. 材 料

가. 樹 種 : 이태리포플러 (*Populus euramericana*)

나. 菌 株 : *Agrobacterium rhizogenes*

· A 4

· 11325

· 15834

2. 方 法

가. *Agrobacterium rhizogenes*의 系統과 培養

Agropine type系統인 *A. rhizogenes* A4, 15834와 nopaline type인 11325를 Yeast extract manitol agar배지 (yeast extract 1g, manitol 10g, K₂HPo₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, NaClO 0.1g, FeCl₃ 0.004g, agar 15g/ℓ : pH 6.8)에 28℃ 暗條件下에서 2日間 培養한 後 使用하였고, 保存은 같은 培地에서 24時間 培養한 것을 冷藏庫에 保管하여 每 20日마다 繼代培養을 하였다.

나. *A. rhizogenes*接種

이태리포플러의 細胞를 Al-EDTA 1.0 mM과 PEG 15%에서 選拔하여 再分化시킨 個體를 MS培地에 培養한 後 試料의 잎과 줄기部分에 無菌狀態에서 傷處를 내고 2日間 자란 菌을 接種하여 MS基本培地에 24℃ 暗條件下에서 24時間 培養한 後 滅菌水로 2回 洗滌하고 滅菌한 filter paper로 水分을 除去한 後 試料의 表面에 남아있는 菌을 除去하기 위하여 1/2 MS+cefotaxime 500 mg/ℓ培地에 3~4回 옮겨 줄기와 잎 表面에 있는

菌이 完全히 除去된 後 MS基本培地로 옮겼다.

다. *A. rhizogenes* 接種後 植物體 表面에 남아있는 殘留菌 除去를 위한 適正 抗生劑 濃度 究明

이태리 포플러에 *A. rhizogenes* strain A4, 11325, 15834를 接種하여 MS 培地에 24時間 培養한 後 組織에 남아있는 菌을 除去하기 위하여 1/2 MS 培地에 cefotaxime 100, 200, 300, 400, 500, 600 mg/l 을 各各 添加하여 1回用 petridish에 분주하고 接種된 組織을 5日間 培養하여 殘留菌의 狀態를 調査하였다.

라. Hairy root로부터 植物體 再分化

A. rhizogenes strain A4, 11325, 15834를 接種하여 發生된 hairy root로부터 植物體 再分化를 위하여 MS培地를 基本으로 하여, BAP를 0, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0 mg/l 을 各各 添加한 培地에 hairy root를 培養하여 6週後 再分化된 shoot數를 調査하였다.

마. Opine分析

*A. rhizogenes*를 接種하여 發生한 hairy root는 MS基本培地로 옮겨 培養할 때 phytohormone없이도 生長을 繼續하므로 正常根에서 不定根을 發生하는 性質의 差異로 形質轉換을 確認할 수 있으므로 이것을 化學적으로 證明하기 위하여 opine을 分析하였다.

分析方法是 Petit等(1983)의 方法을 若干 修正한 方法으로 hairy root 200 mg에 0.1 N Hcl 200 μ l 을 添加하여 유리棒으로 잘 갈아, 元心分離機에서 12,000 rpm으로 10分間 分離하여 上等液을 利用하였다. 이렇게 準備된 試料를 Whatmann paper 3MM위에 spot하여 300 V에 2時間 電氣泳動시켰다. 전개액은 formic acid : acetic acid : water (5:15:80)으로 하여 pH 2.0으로 調整하여 使用하였다. 이때 agropine standard는 mannopine 10 μ g

을 100 ml dimethyl-sulfoxide에 녹인후 water bath에서 30 分間 加熱한
後 40 ml의 물을 添加하여 10 ml Dowex 50w×8 resin (H⁺ form)에 거르
고 蒸溜水로 씻은 後 5%의 ammonia水로 씻어낸 다음 溶液을 蒸發시킨
後 使用하였다. 電氣泳動이 끝난 다음 完全히 乾燥하여 染色液 A(0.25 g
AgNO₃+ 20 ml aceton)에 한번 沈積한 다음 完全히 乾燥하여 染色液 B
(10 ml의 20% NaOH+ 90 ml methanol)에 沈積한 後 乾燥하였다. 乾燥
된 paper는 2 g sodium thiosulphate+ 500 ml H₂O의 固定液에 固定시킨
다음 흐르는 물에 1時間以上 洗滌하였다.

Nopaline分析은 *A. rhizogenes* strain 11325 를 接種하여 發生한 hairy
root 200 mg에 0.1 N Hcl 200 μl 添加하여 유리棒으로 갈아 遠心分離機의
12,000 rpm에 5 分間 遠心分離하여 上等液을 使用하였다. Whatmann paper
3MM위에 上等液을 spot하여 400 V에 2時間 電氣泳動하였다. 展開液은
agropine分析時의 溶液과 同一하였고, 電氣泳動이 끝난 다음 完全히 乾燥하여
染色液(2 mg phenanthrenequinone + 10 ml absolute ethanol + 1 g NaOH
+ 10 ml 60% ethanol)에 거꾸로 한번 담근後 乾燥하여 흐르는 물에 1
時間 洗滌하여 UV light (366nm)에서 觀察하였다.

第3節 結果 및 考察

(1) *Agrobacterium rhizogenes* 接種

A. rhizogenes strain A4, 15834, 11325를 YEM 培地에 2日 동안 培養한 後 잎과 줄기에 接種한 結果는 그림 1, 2에 나타난 바와 같다. *A. rhizogenes*를 接種한 試料는 植物 ฮอร์โมน 없이, 抗生劑 (cefotaxime 500 mg/l)만 添加한 1/2 MS 培地에서 7~8日이 經過하면서 hairy root가 發生하기 시작하였다. Al-EDTA 1.0 mM에서 選拔한 個體에 接種하여 發生된 hairy root는 잎보다 줄기에서 發生率이 顯著히 높았으며 strain 別로 比較해 보면 A4에서 가장 높은 接種率을 보였으며 (photo.1), 15834와 11325는 接種 20日까지는 15834에서 약간 높았으나 30日부터는 11325에서 더 많

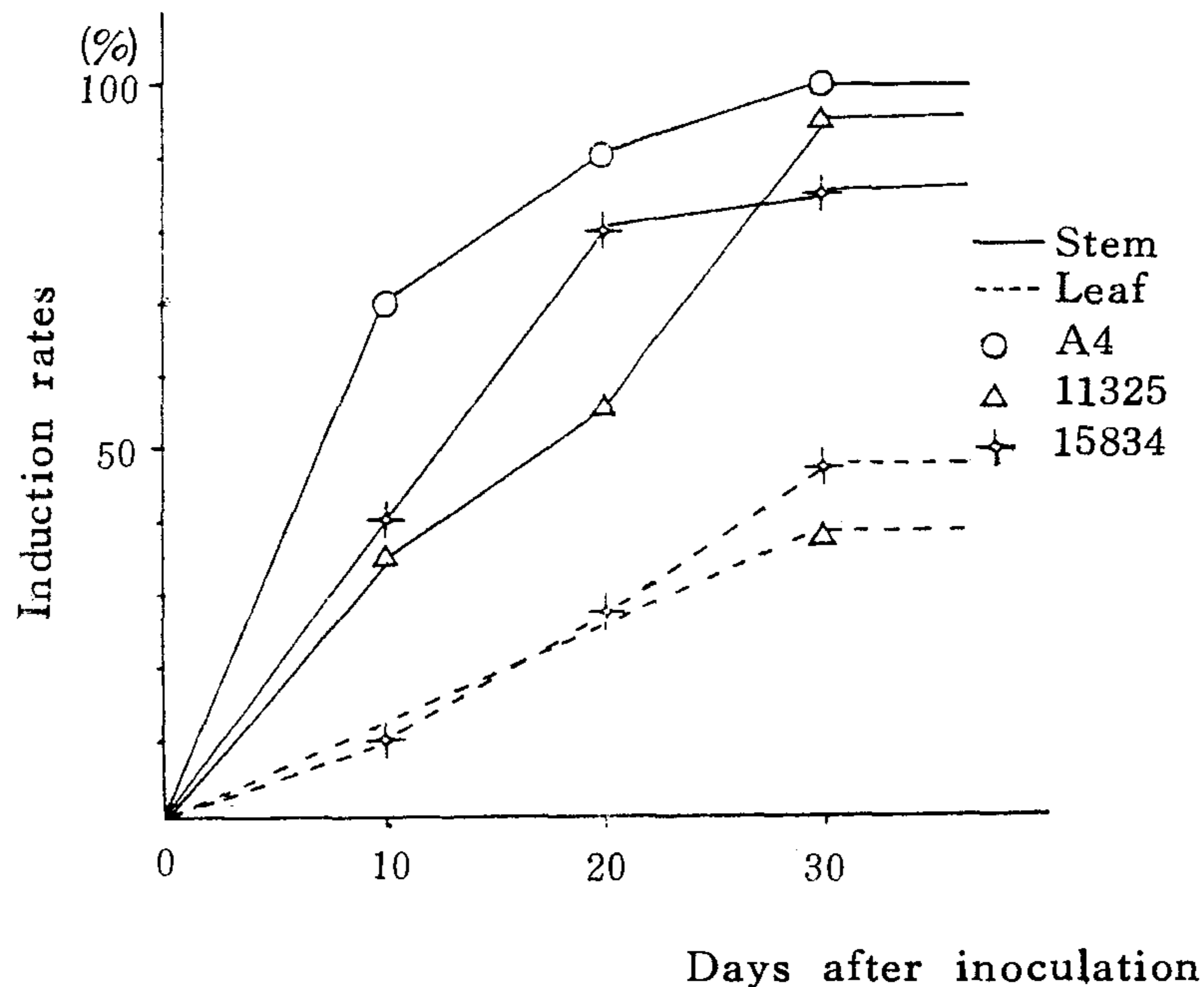


Fig.1. Induction rates of hairy root on the leaf and stem of *Populus euramericana* selected in Al-EDTA medium.

은 hairy root가 발생되었다. David와 Tempe (1988)의 報告에 의하면 꽃 양배추의 組織培養苗에 *A. rhizogenes* strain別 接種에서 manopine type strain에서 보다는 agropine type strain에서 hairy root 發達이 좋았다고 報告한 바 있으며, 이 結果와 比較해 보면 agropine type A4, 15834 strain은 줄기의 接種에서 nopaline type 11325에서 보다 比較的 hairy root 發達이 優秀하였다. 이와 반대로 잎에서의 hairy root 發生率은 A4에서 전혀 發生되지 않았고 15834와 11325에서만 發生되었다(Fig.1). 한편 PEG 15%에서 選拔한 cell line에서도 잎보다는 줄기에서 hairy root의 發生率이 높았고, strain 別로 보면 11325에서 가장 높아, Al-EDTA에서 選拔한 것과는 相反된 接種 結果를 보였다. 잎에서는 15834에서만 hairy root가 發生되었고 A4와 11325에서는 發生되지 않았다(Fig. 2).

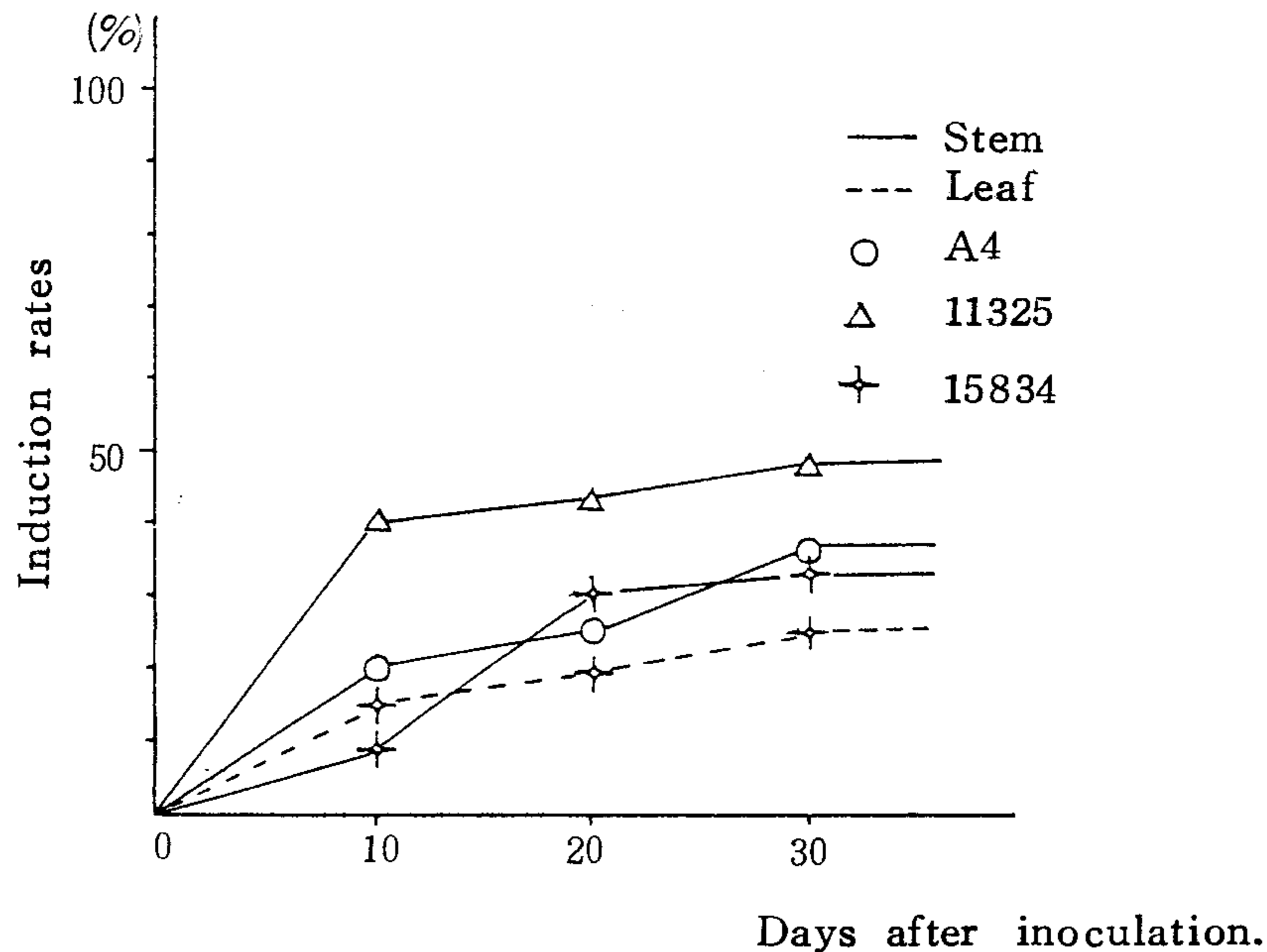


Fig.2. Induction rates of hairy root on the leaf and stem of *Populus euramericana* selected in PEG medium.

(2) *A. rhizogenes* 接種後 植物體 表面에 남아 있는 殘留菌 除去

뿌리를 發生시키는 形質의 遺傳子가 들어 있는 *A. rhizogenes* (A4, 15834, 11325) 接種後 줄기와 잎의 表面에 남아 있는 餘分の 박테리아를 除去하기 위하여 抗生劑 種類인 cefotaxime을 濃度別로 實驗한 結果 Table 1에 나타난 바와 같다. 1/2 MS 培地에 cefotaxime 100, 200, 300, 400, 500, 600 mg/l를 各各 添加하여 接種된 줄기 및 잎을 培養하여 5日後 菌이 남아있는 狀態를 調査한 結果 줄기와 잎 모두 cefotaxime 500과 600 mg/l에서 박테리아가 完全히 除去되었다. 高濃度の 抗生劑를 處理한 경우에는 選拔後 植物體再分化에 問題가 있으므로 可能的 낮은 濃度를 使用하는 것이 바람직하다. 이러한 結果로 本 實驗에서는 抗生劑 濃度를 cefotaxime 500mg/l를 添加한 培地에서 박테리아를 除去하였다.

Table 1. Concentration of cefotaxime for sterilization of explant inoculated with *Agrobacterium*

Cefotaxime conc. (mg/l)	Growth of <i>A. rhizogenes</i>		
	A 4	15834	11325
100	++++	++++	++++
200	++	+++	++
300	++	+++	++
400	+	+	+
500	-	-	-
600	-	-	-

* +++++ : excellent, +++ : good, ++ : fair, + : slight,
- : negative

(3) hairy root로 부터 植物體 再分化

A. rhizogenes strain A4, 11325, 15834 를 接種하여 發生된 hairy root 에서 植物體 再分化는 strain 別로는 A4, 11325 에서 10 ~ 15個의 不定芽 를 發生하여 比較的 再分化가 잘 이루어졌으나 Photo. 2), 15834 strain 의

Table 2. Regeneration from hairy roots of *Populus euramericana* selected in Al-EDTA and PEG medium.

Agrobac. Strain	Strain types	BAP conc. (mg/ℓ)	Number of shoot	
			Al-EDTA	PEG
A 4	agropine	0.0	3	1
		0.2	7	12
		0.5	10	10
		0.8	6	6
		1.0	1	2
11325	nopaline	0.0	2	3
		0.2	4	10
		0.5	7	15
		0.8	5	8
		1.0	1	1
15834	agropine	0.0	0	0
		0.2	0	0
		0.5	3	2
		0.8	1	1
		1.0	0	0

hairy root에서는 2~3개의 적은不定芽만 발생되었다. BAP 농도별로 비교하여 보면 MS 기본培地에 0.2 mg/l 와 0.5 mg/l 을添加한培地에서 다른培地에比하여越等하게 많은 shoot를 발생시켜優秀하게 나타났으며, 특히 0.5 mg/l 의培地에서 *A. rhizogenes* strain과 相關없이 가장 좋았고, 그 以上の濃도가 增加될수록 不定芽 分化는 減少하였다 (Table 2).

Brillanceau 등 (1989)도 A4, 15834 등의 strain을 利用하여 hairy root로부터 再分化 하여 形質轉換된 植物體를, 國內에서는 현사시와 사시나무에 A4 strain을 接種하여 形質轉換된 植物體를 報告한 바 있다 (6, 15). 특히 사과나무 (17)의 경우 *A. rhizogenes* 接種에 의한 形質轉換으로 耐乾성이 增進된다는 報告가 있으므로, 形質轉換된 이태리포플러가 耐乾성이 增進될 것으로 期待된다.

(4) Opine 分析

*A. rhizogenes*에 의해 發生된 hairy root를 1次的으로 形質轉換 與否를 確認하기 위하여 MS 基本培地에 hairy root를 培養한 結果 形質轉換된 hairy root는 生長 hormone 없이도 잘 發育되었고 發生된 hairy root를 electroporesis 方法으로 opine을 檢定한 結果, agropine type strain A4와 15834를 接種하여 發生된 hairy root를 spot한 部分은 agropine standard로 spot한 部分과 같은 位置에 agropine이 나타났고, nopaline type strain인 11325의 hairy root에서는 nopaline standard를 spot한 部分과 일치하는 位置에 나타났다 (사진 3, 4). 이것은 Petit 등 (1983)의 結果와 같았으며, *A. rhizogenes* strain A4, 15834, 11325를 이태리포플러에 接種하므로써 各各 agropine 과 nopaline를 合成하게 되었음을 알 수 있었다.

Hooykaas (1984)에 依하면 opine 合成活動은 *Agrobacterium* 接種後 29~36 시간이 必要하며 形質轉換된 組織의 生長과 관련을 가지는 物質이라고

報告한 바 있다. 本 研究의 結果로 Hooykaas의 報告와 비슷한 結果를 얻어 形質轉換을 確認할 수 있었다.

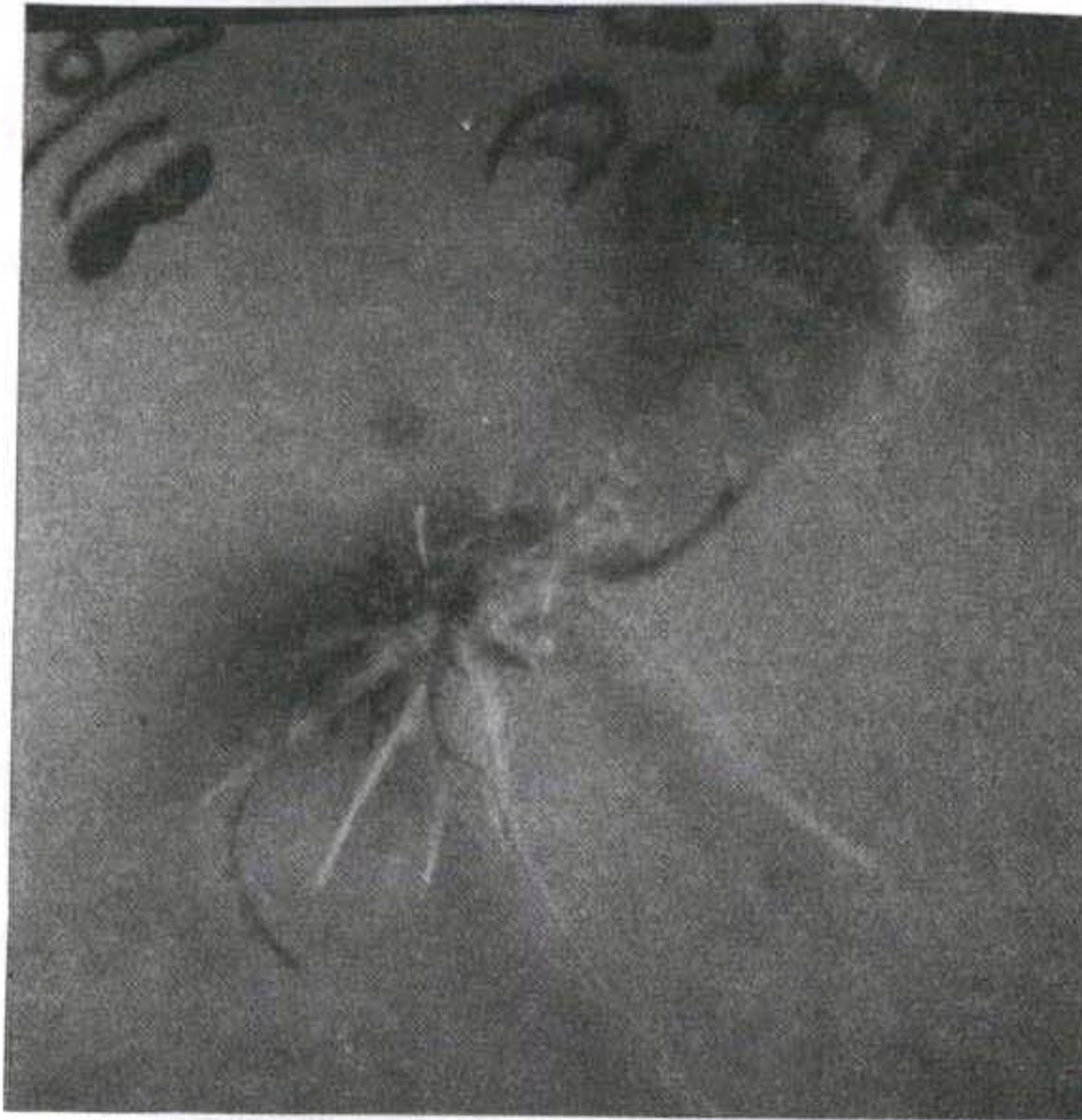


Photo.1. Hairy roots induced by *A. rhizogenes* A4 on the stem of *Populus euramerica*.

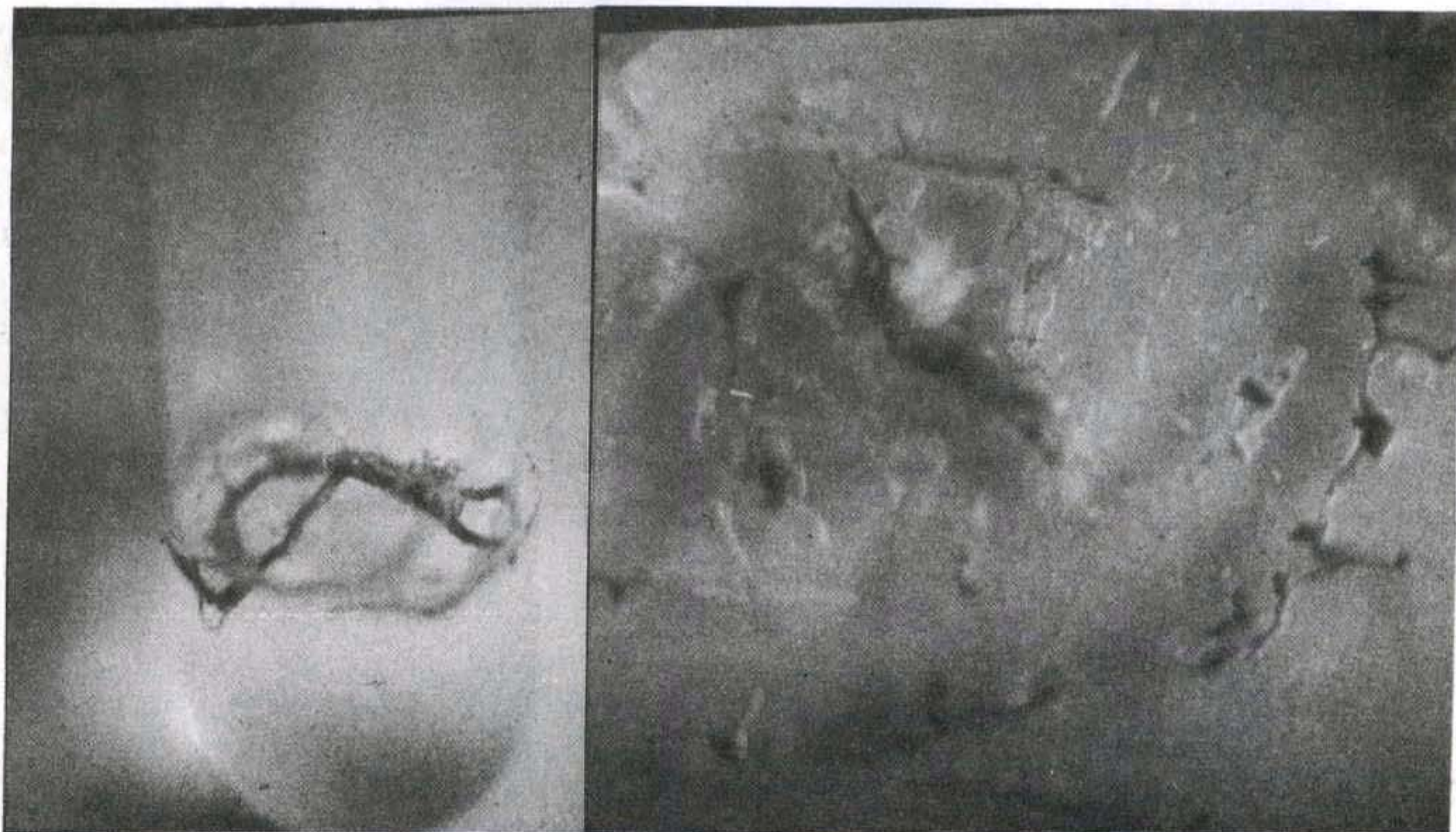


Photo.2. Shoot regeneration from transformed hairy root on MS medium with BAP $0.5\text{mg}/\ell$

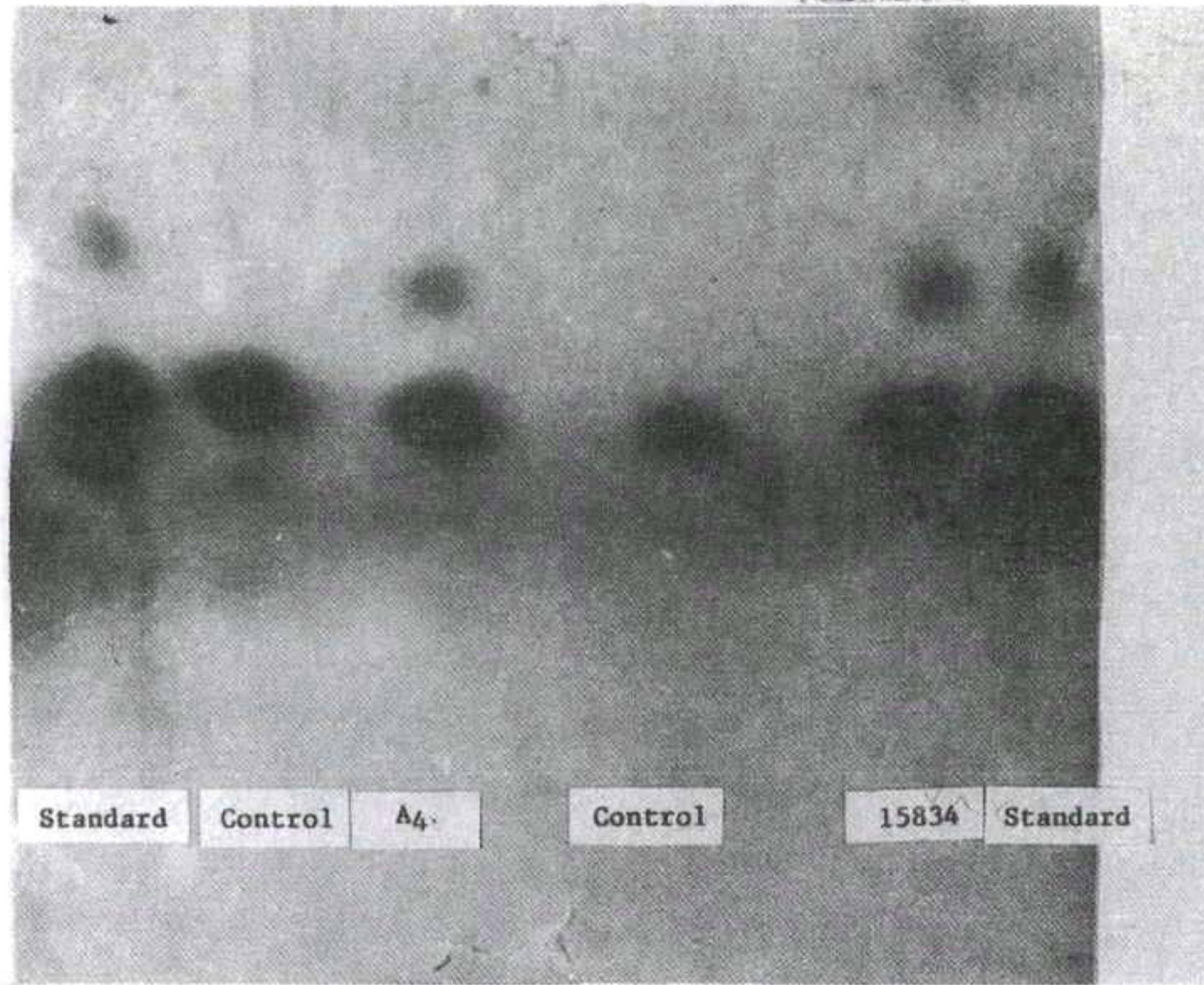


Photo.3. Detection of opine (agropine type)
contained in hairy root.

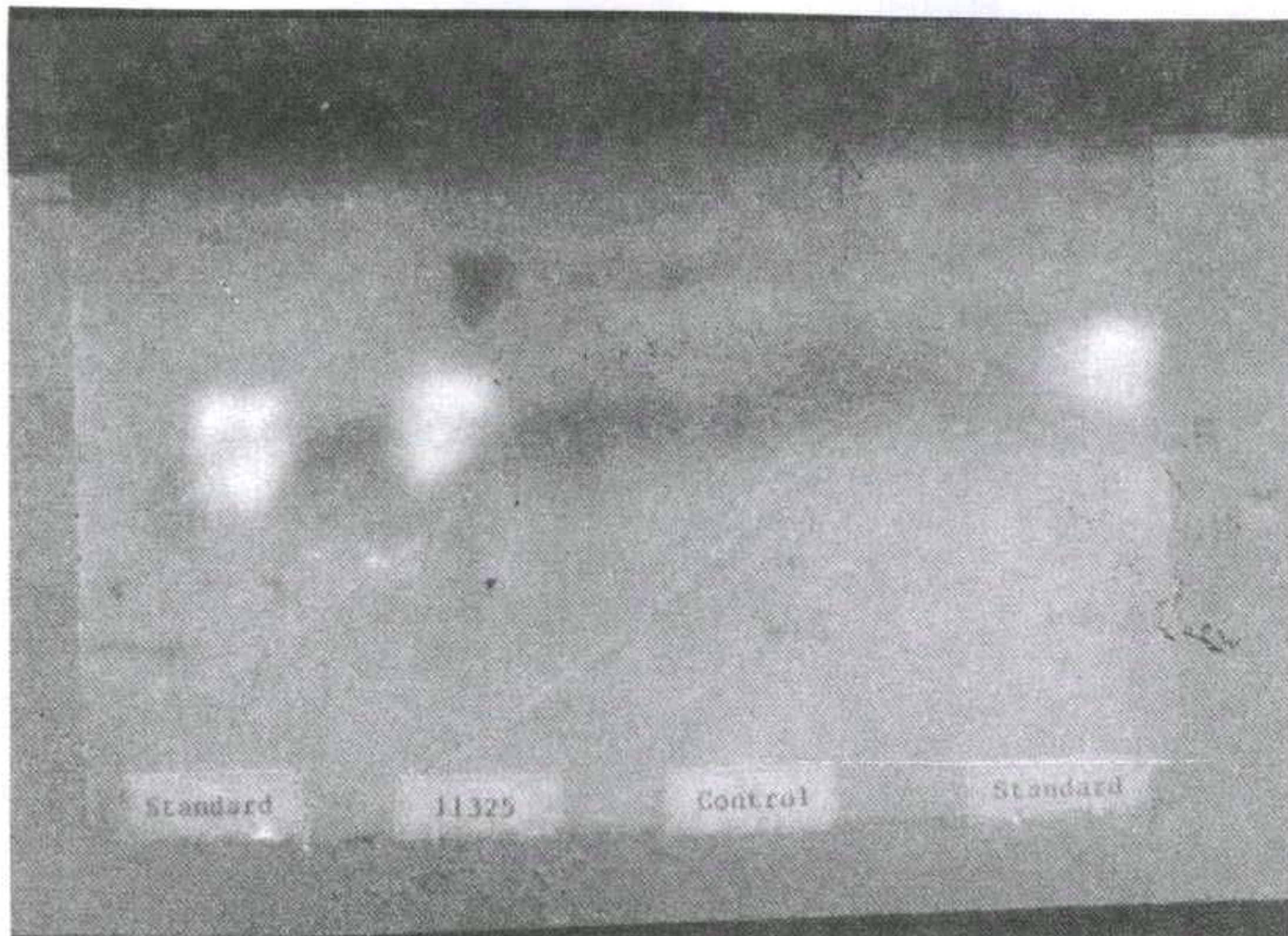


Photo.4. Detection of opine (nopaline type)
contained in hairy root.

第4節 摘要

이태리포플러의 耐酸性 및 耐乾性を 增進시키기 위하여 細胞培養을 通하여 器內에서 Al-EDTA 와 PEG에 耐性인 cell을 選拔하여 再分化시켜(1次年) 이를 利用하여 根系의 形質轉換을 위하여 *Agrobacterium rhizogenes* strain A4, 15834, 11325을 接種하여 hairy root을 成功的으로 얻었으며, opine을 分析하여 形質轉換 되었음을 確認할 수 있었다. 이를 綜合해 보면 아래와 같다.

1. Al-EDTA 와 PEG에 選拔된 이태리포플러 잎과 줄기에 *Agrobacterium rhizogenes* A4, 11325, 15834를 接種하여 뿌리의 形質轉換을 誘導하여 成功的으로 hairy root를 얻었고, 잎보다는 줄기에서 hairy root 발달이 더 좋았으며, 特히 A4 strain에서 hairy root가 가장 잘 발달되었다.

2. *A. rhizogenes*의 接種에 의하여 發生된 hairy root로 부터 多數의 植物體를 誘導하였으며, strain別로는 A4와 11325에서 10~15개의 shoot를 發生시켰고, BAP 添加 培地에서는 모든 strain에서 0.5mg/l가 가장 優秀하였다.

3. Agropine type A4, 15834와 Nopaline type인 11325을 接種하여 發生한 hairy root을 分析하여 opine 物質을 合成함을 確認하여 形質轉換 되었음을 確認하였다.

引用文獻

1. Beach, K.H. and P.M. Gresshoff 1988. Characterization and culture of *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots of forage legumes. *Plant Science* 57 : 73–81.
2. Brillanceau, M.H., C. David, and J. Tempe 1989. Genetic transformation of *Catharanthus roseus* G. Don by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports* 8 : 63–66.
3. Chaleff, R.S. and T.B. Ray. 1984. Herbicide-resistant mutants from tobacco cell culture. *Science* 223 : 1148–1151.
4. Chilton, M.D., D.A. Tepfer, F. Delvalt, and J. Tempe 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DAN into the genome of the host plant root cells. *Nature* 295 : 432–434.
5. Chun, Y.W., N.B. Klopfenstein, H.S. McNabb Jr. and B. Hall 1988. Biotechnological applications in *Populus* species. *Jour. Korean For. Soc.* 77(4) : 467–483.
6. Chung, K.H. 1989. Transformation of *Populus alba* × *P. glandulosa* by *Agrobacterium rhizogenes*. MS Thesis. Univ. of Kyungbook, Korea.
7. David, C. and J. Tempe 1988. Genetic transformation of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. Botrytis) by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports* 7 : 88–91.
8. De Cleene, M. and J. De Ley 1981. The host range of infectious hairy root. *Bot. Rev.* 47 : 417–194.
9. Diner, A.M., R.L. Mott and H.V. Amerson 1984. Cultured cells of white pine show genetic resistance to axenic bilister rust byhae. *Science*, Vol. 224 : 407–408.
10. Foy, C.D. 1974. Effect of aluminium on plant growth. Page 601–642 in Carson, E.W. ed *The plant root and its environment*, Univ. Press of Virginia, Charlottesville
11. Handa, A.K., R.A. Bressan, S. Handa and P.M. Hesegawa. 1982. Characteristics of cultured tomato cells after prolonged exposure to medium containing polyethene glycol. *Plant Physiol.* 69 : 514–521.
12. Hooykass, P.J.J. and R.A. Schilperoort. 1983. The molecular genetics of crown-gall tumorigenesis *Adv. Genet.* 22 : 209–283.

13. Lambert, C. and D. Tepfer. 1991. Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create chimeric apple trees through genetic grafting. *Biotechnology* vol. 9 : 80–83.
14. Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft 1981. Somaclonal variation-a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60 : 197–214.
15. Lee, B.S., Y. Youn, S.K. Lee, W.Y. Choi, and Y.J. Kwon 1989. Transformation of *Populus davidiana* Dode by *Agrobacterium rhizogenes*. *Res. Rep. Inst. For. Gen.* 25 : 149–153.
16. McCormick, L.H. and K.C. Steiner. 1978. Variation in aluminium tolerance among six Genera of trees. *Forest Sci.* Vol. 24 4 : 565–568.
17. Moore, L., G. Warren and G. Strobel 1979. Involvement of a plasmid in the hairy root disease of plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid.* 2 : 617–626.
18. Mugnier, J. 1988. Establishment of new axenic hairy root by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reprot.* 7 : 9–12.
19. Ostry, M.E. and D.D. Skilling. 1988. somatic Variation in resistance of *Populus* to *Septoia musiva*. *Plant Disease* 72 : 724–727.
20. Petit, A., C. David, G.A. Dahl, J.G. Ellis, P. Guyon, F. Casse-Delbart and J. Tempe. 1983. Further extention of the opine concept ; plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* cooperate for opine degradation. *Mol. Gen. Genet.* 190 : 204–214.
21. Pythound F., V.P. Sinkar, E.W. Nester, and M.P. Gordon, 1987. Increased virulence of *Agrobacterium rhizenens* conferred by the vir region of pTiBo 542 : application to genetic engineering of poplar. *Biotechnology* vol. Vol. 5 : 1323–1327.
22. Roy, A.K., a. Sharma, and G. Talukder. 1988. Some aspect of aluminium toxicity in plants. *Bot. Rev.* 54 : 144–178.
23. Skilling, D.D. and M.E. Ostry. 1986. Biotechnologies – the potential role of somaclonal variation in forestry. USDA For. Serv. North-Western Station NE General Technical Report 111 : 17–19.
24. Tal. M. 1983. Selection for stress tolerance. Page 461–488 in D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada eds *Handbook of plant cell culture*. Vol. 1 Macmillan Publshing

Co., New York

25. 金仁洙. 1986. 植物 遺傳子 運搬體의 開發. 慶北大學校 開校 40周年 紀念. Symposium 特輯號: 147-158.
26. 吳旺根. 1977. 最近 土壤學. 一潮閣
27. 韓昶烈, 李世永. 1985. 遺傳工學. 一潮閣

여 백

第 3 章 Electroporation 方法에 의한
현사시나무의 形質轉換

The Transformation of Populus alba × P. glandulosa by Electroporation

研究機關名 ; 서울大學校 農科大學

研究責任者 ; 玄 正 悟

研 究 員 ; 金 龍 律

孫 碩 奎

金 仁 植

여 백

第 1 節 緒 言

고등식물체에 외래 유전자를 도입시키는 방법에는 T-DNA mediated Gene Transfer System과 Direct gene Transfer System 2가지로 크게 나누고 있는데 전자의 경우는 쌍자엽 식물에 Infection되어 자신의 DNA 일부를 기주 식물체의 Genome내에 삽입시키는 Agrobacteria를 이용하는 것이며 (Zambryski 등, 1989) 후자의 경우는 다시 ① PEG 등 주로 식물체의 세포막 투과성을 변형시킬 수 있는 특정 Chemical을 이용, 식물체의 원형질체에 직접 DNA를 도입시키는 방법 (Lorz 등, 1985)과 ② 식물세포막에 전기적 충격을 주어 막 투과성을 순간적으로 변화시켜 DNA를 집어넣는 방법 (Electroporation) (Fromm 등, 1986). 그리고 ③ DNA를 미세한 금속 입자로 coating한 후 Particle Gun을 이용하여 조직 세포의 핵 안으로 쏘아넣는 Particle Bombardment 방법 (Klein 등, 1988)으로 나누어 볼 수 있다. 그 밖에도 Microinjection 방법 (Neuhaus 등, 1987)과 꽃가루를 DNA와 혼합한 후 수정시켜 DNA를 도입하는 방법 (Ohta, 1986) 등 매우 다양하나 이러한 방법들 중 모든 식물체에 적용할 수 있는 보편성있는 System은 아직 확립되어 있지 않기 때문에, 결국 외래 유전자의 도입 방법은 대상 식물체의 특성에 따라 결정된다고 볼 수 있다.

식물체의 형질전환에 관련된 연구결과를 종합해보면, 형질전환의 효율 즉, 도입된 외래유전자가 식물체내의 Genome에 삽입되어 발현되는 측면과 도입 방법의 단순함을 비교해 볼 때, T-DNA mediated Gene Transfer System이 다른 어떤 형질전환 체계보다도 효율적이며 간편하기 때문에 많이 이용되는 편이나 Agrobacteria의 기주범위가 쌍자엽 식물에 국한되어 있다는 단점이 있어 곡류와 같은 주요 경제작물 식물의 형질전환 연구에는 Electroporation

과 같은 Direct gene transfer system을 이용하고 있다. 한편, 임목의 경우에 있어서는 대다수의 임목이 쌍자엽 식물이어서 Agrobacteria를 이용한 형질전환이 비교적 많이 활용되고 있으나 소나무과에 속하는 몇몇 주요 목재 자원용 수종들은 Resin 등의 존재로 Agrobacteria의 infection이 용이하지 않기 때문에 이들 수종들에 대하여서는 단자엽의 곡류 식물에서와 같이 Electroporation과 같은 형질전환방법의 확립이 매우 필요하다고 하겠다.

현재까지 임목을 대상으로 Electroporation 방법을 이용, 형질전환시킨 연구 보고는 Gupta 등(1988)에 의한 Douglas fir(*Pseudotsuga menziesii*)와 Loblolly Pine(*Pinus taeda*)의 형질전환 연구와 Wilde 등(1989)의 Yellow poplar(*Liriodendron tulipifera*) 형질전환 연구뿐, 곡류 및 기타 미생물에서와 같이 활발히 연구되고 있지는 않은 실정이다. 그러한 주요 이유로서는 무엇보다도 임목의 형질전환 연구분야에 있어서 Agrobacteria를 이용한 형질전환 방법이 주류를 이루고 있기 때문이며, 둘째로는 원형질체 분리 및 배양 등 Electroporation에 필요한 제반 기초연구 조건의 확립 즉, 세포배양 기술의 축적과 기자재의具備 없이는 완벽한 연구결과를 기대할 수 없기 때문이라 생각된다. 그러나 앞서 언급한 바와 같이 소나무 등 국내 주요 침엽수 수종들의 형질전환에 있어서는 아직까지 Electroporation 方法 이외의 효율적인 형질전환 체계가 정립되어 있지 못하므로 Electroporation에 의한 임목의 형질전환 체계는 그 나름대로의 중요성과 의미를 지닌다고 하겠다.

이에 본 연구에서는 Direct gene transfer system인 Electroporation에 의한 현사시 형질전환 방법의 확립을 위해, ① 현사시 원형질체의 순수분리 및 배양조건을 검정하고, ② Electroporation시 최대 형질전환율을 보일 수 있는 제반 처리조건 즉, Pulse time, Pulse Duration, Field Strength, Capacitance 등을 확인하는데 주된 목적을 두고 수행되었다. 특히 임목에 있어서

의 제반 형질전환체계를 확립하기 위한 본 특정과제 연구의 총체적 연구흐름에 있어서 제 1차년도 “Agrobacteria에 의한 임목의 형질전환 연구”와 대별될 수 있는 “Direct gene transfer system”을 본 년도의 연구주제로 삼아 수행했으므로 년차적인 연구결과를 상호 비교할 수 있어 제 3차년도에서 수행될 유용 유전자의 실제적 활용에 많은 도움을 주리라 생각된다

第2節 材料 및 方法

1. 材 料

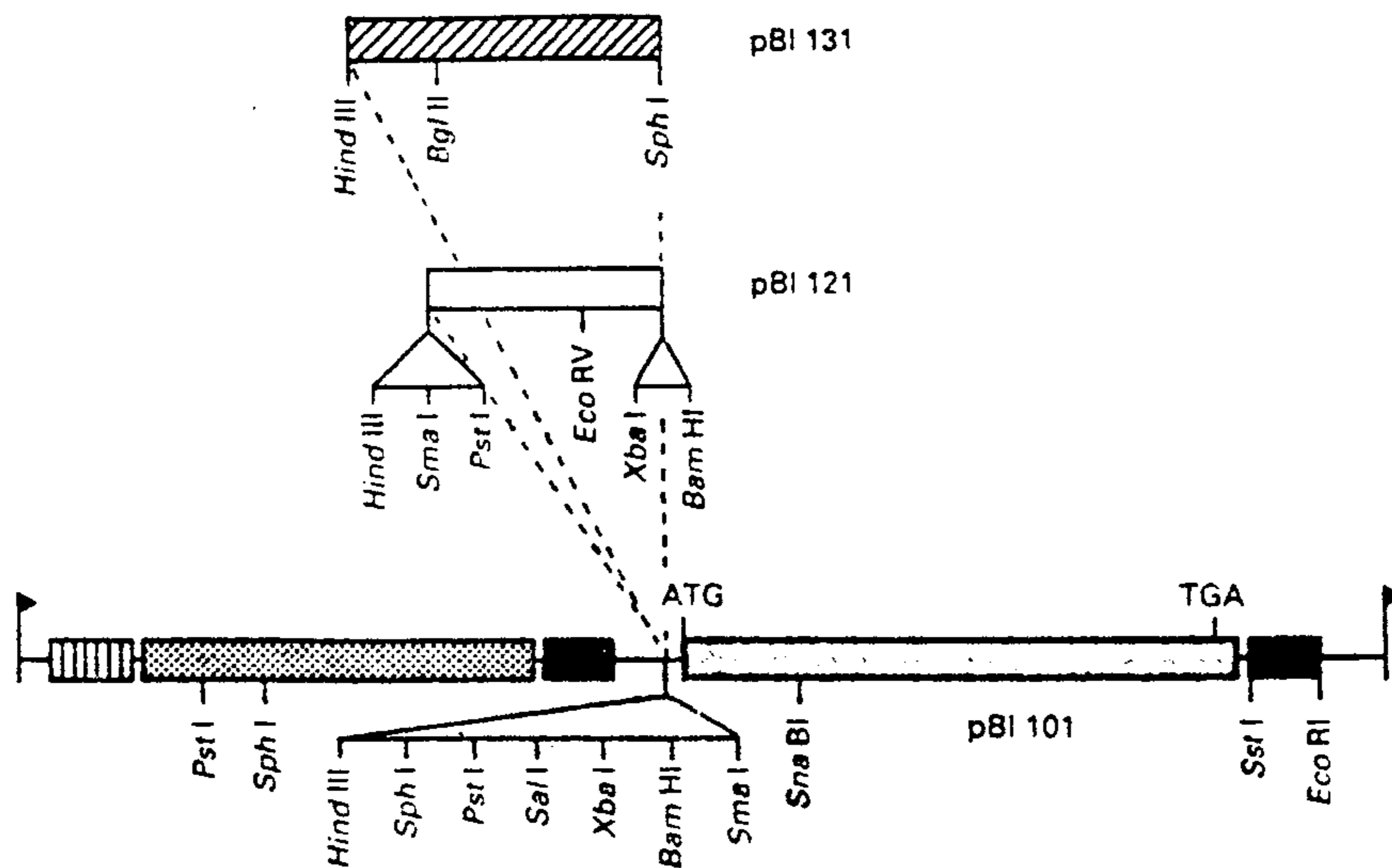
가. Plant material

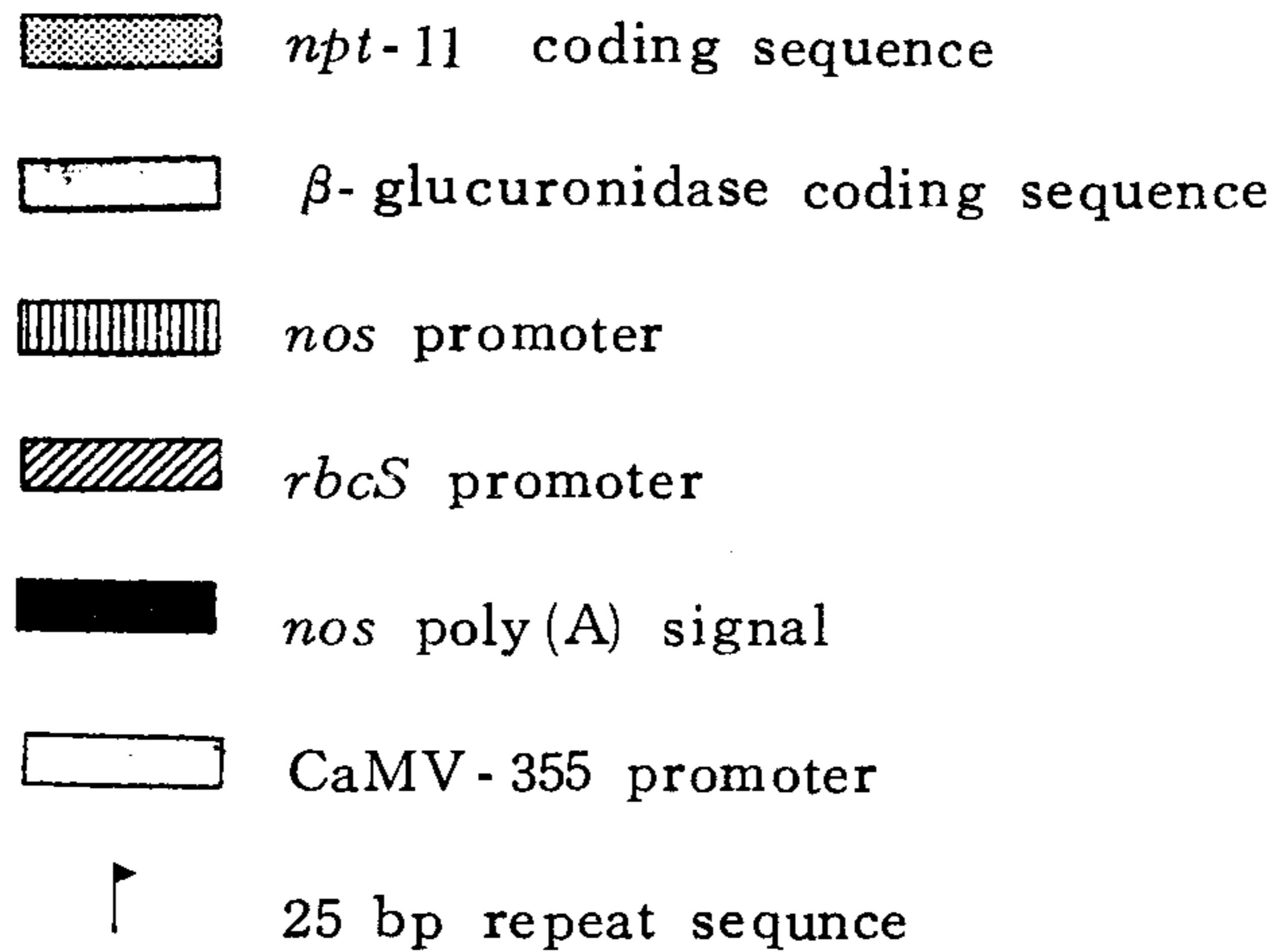
본 실험을 위하여 경기도 수원시 소재 임목육종연구소내에 식재되어 있는 *Populus alba* × *P. glandulosa* F₁의 sprout를 수집, 이를 온실에서 무성번식시킨후 이로부터 엽조직을 채취하여 0.2% HgCl₂와 5% commercial bleach로 표면소독을 하고, 조직배양을 통해 얻은 explant와 callus를 protoplast 나출에 이용하였다.

나. Plasmid 및 Agrobacterium strain

본 실험에 사용된 pBI 121 plasmid는 Fig.1에서 보는바와 같이 Reporter 유전자로써 β - glucuronidase를 coding하고 있는 GUS gene을 갖고 있다. 이 유전자의 발현을 위해 Promoter와 Terminator로써 CaMV 35 S Promoter와 Nos terminator를 사용하고 있으며 selection marker로서는 NPTII gene이 Nos Promoter와 Nos terminator 사이에 삽입되어 있다. 한편, Plasmid의 증식을 위해 Agrobacterium LBA 4404를 사용하였다.

A





B The pBI 101 series fusion junctions, with the pUC19 polylinker sequence followed by the GUS coding sequence is as follows: the GUS initiator is boldface, the *Bam* HI site is underlined:

pBI 101.1 : AAG CTT GCA TGC CTG CAG GTC GAC TCT AGA
 GGA TCC CCG GGT GGT CAG TCC CTT AGA TTA
pBI 101.2 : A AGC TTG CAT GCC TGC AGG TCG ACT CAT
 GAG GAT CCC CGG GTA TCC CTT ATG TTA ...
pBI 101.3 : AA GCT TGC ATG CCT GCA GGT CGA CTC TAG
 AGG ATC CCC GGG TAC GGT CAG TCC CTT ATG
 TTA ...

Fig.1. *The GUS gene fusion system*: (A) Structure of basic GUS gene fusion vector pBI 101 with examples of its use with two plant gene promoter sequences. (B) Nucleotide sequence of fusion junctions in polylinker of GUS gene fusion vectors.

다. Electroporation kit

본 실험에 사용된 electroporation kit는 Hoefer Scientific Co. 제품으로 최대 500 V, 400 mA 까지 공급될 수 있으며 Capacitance (μ F)는 100에서 1200 까지, pulse time은 μ sec 에서 msec 단위까지 조절이 가능하다. 그리고 Main

Body는 4개의 electroporation chamber로 구성되어 있다.

라. Fluorometer

GUS assay를 위해 사용된 fluorometer는 TKO-100 mini-fluorometer로 Hoefer Scientific Co. 제품인데, 365 nm에서 Excitation spectrum peak를 그리고 492 nm에서 Emission peak를 보임에 따라 GUS 유전자에 의해 만들어지는 β -glucuronidase를 매우 정확하게 detect할 수 있다.

2. 方 法

가. Agrobacterium 균주의 배양

pBI 121 plasmid를 가지고 있는 LBA 4404 strain을 kanamycine이 들어 있는 YEB 고체배지 (beef extract 5g, yeast extract 1g, Sucrose 5g, MgSO₄ 0.24g, Agar 12g, D.D.W 1ℓ)에 streaking하여 다수의 colony를 얻은 후 이를 다시 YEB 액체배지에서 overnight culture하여 plasmid 분리에 이용하였다. 특히 실험의 정확성을 유지하기 위해 YEB 고체배지에 X-GLUC를 처리하고 난 뒤 Blue colony로 변한 것을 선발함으로써 GUS 유전자가 정상적으로 발현되고 있는 Agrobacteria strain만을 회수하였다 (Fig.2).

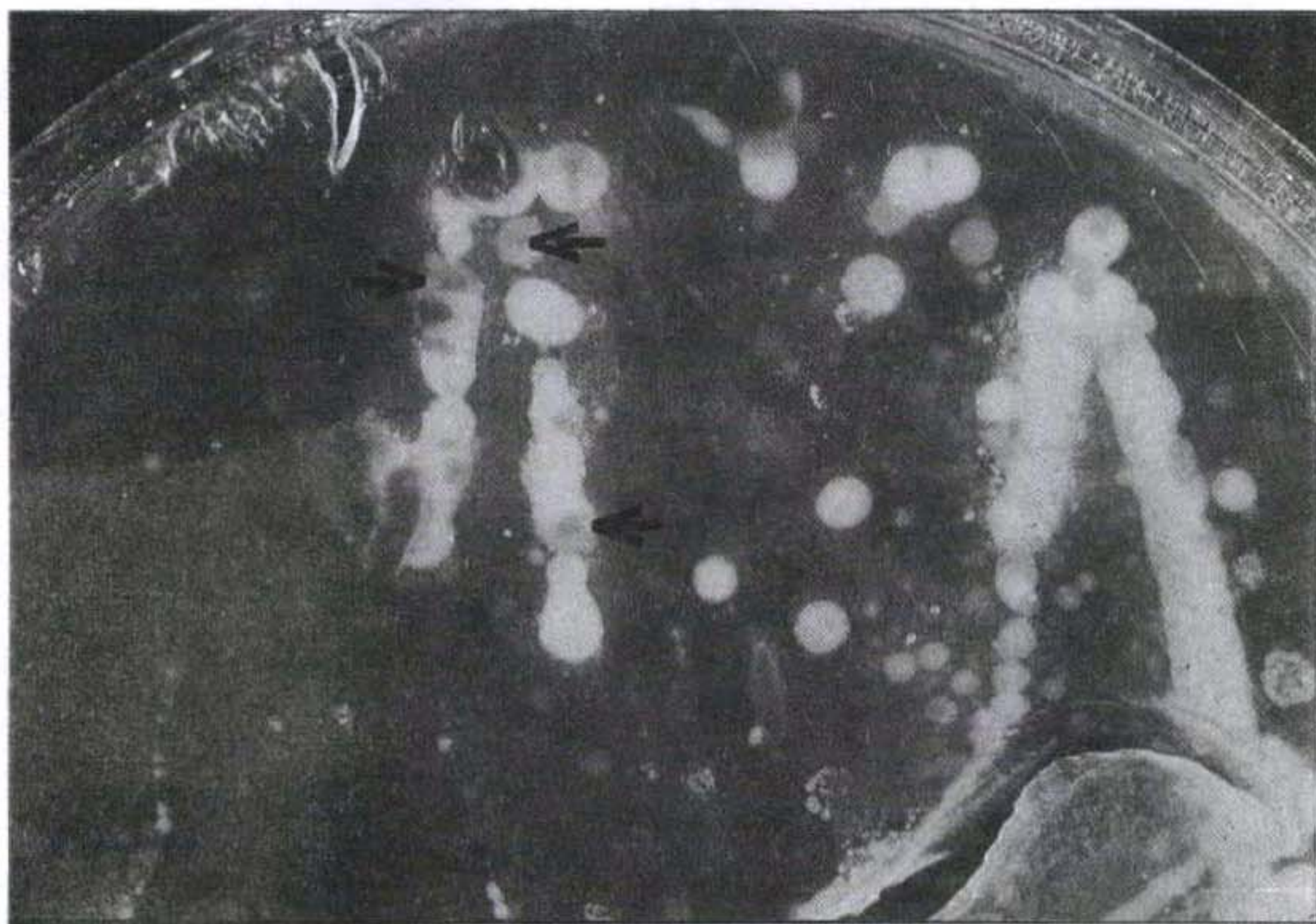


Fig.2. Blue colony of LBA4404 Agrobacteria strain under selection media containing 100 mg/ℓ kanamycine and 0.033 mg/ℓ X-GLUC.

나. Protoplast 의 분리 및 배양

1) Protoplast의 분리

Protoplast 분리의 적정조건을 찾아내고자 Cellulase(Boehringer Mannheim Co.)와 Macerozyme R-10(Yakult Co.)의 농도가 각각 0.5 ~ 2.0 %, 0.1 ~ 0.2 %가 되는 다양한 효소처리 조합을 조성하여 처리한 뒤 원형질체 수확량과 상태를 조사하였다 (Table 1). 그리고 원형질체의 효과적인 분리를 위하여 부수적으로 0.5 % Hemicellulase와 0.1 % Pectolyase Y-23를 첨가하였고 특히 enzyme의 protease activity를 억제하기 위해 0.1 % BSA (Bovine Serum Albumin)를 첨가하였다. 모든 사용된 효소는 CPW 용액 (250 mg/l MgSO₄, 100 mg/l CaCl₂ · 2 H₂O, 170 mg/l KH₂PO₄, 30 mg/l Ca (NO₃)₂, 0.7 M Mannitol, pH 5.8)에 녹여 처리하였다.

Table 1. Enzyme Combinations for protoplast isolation (단위 : %)

Enzyme combination	A	B	C	D	E
Cellulase R-10	0.5	1.0	0.5	1.0	2.0
Macerozyme R-10	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2

또한, 시료의 종류와 enzyme 처리시간에 따른 protoplast의 수확율을 조사하기 위하여 기내배양된 explant의 幼葉과 callus를 Table 1에 나타난 조합과 같은 농도에서 incubation시간을 달리하여 비교하였다.

Protoplast를 분리하기 위해 표면 살균한 시료 1 g을 10 ml의 enzyme solution에 침적시켰는데 이때 callus는 enzyme solution내에서 유리막대를 이용하여 마쇄하였고 엽조직은 1 ~ 5 mm 정도의 크기로 잘게 썰은후 enzyme solution을 처리하였다. 이 용액을 25 °C, dim light 下에서 15 ~ 20 h 정도 incubation한 뒤 45 ~ 65 μm의 stainless steel mesh로 걸러내어 debris를

제거하고, 1.5 ml Eppendorf tube에 옮긴후 100 × g로 5분정도 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액을 제거하고 침전된 Protoplast를 CPW solution으로 2~3회 세척하였고 이를 다시 21% Sucrose 용액이 담겨져 있는 Eppendorf tube의 상층에 부은후 100 × g로 원심분리하여 상층에 떠있는 순수한 protoplast만을 회수하였다. 순수분리된 protoplast의 밀도는 Haemocytometer를 이용하여 측정한 뒤 0.01% fluorescent diacetate로 염색하여 viability를 현미경으로 관찰하였다.

2) Protoplast의 배양

순수분리된 protoplast를 배양하기 위해 0.5 mg/l BAP, 2.0 mg/l 2,4-D, 1% Agarose가 첨가된 MS배지에서 protoplast를 embedding시켰다. 이때 protoplast의 최종농도가 0.5×10^5 protoplast/ml가 되도록 하였으며 Agarose가 첨가된 MS배지가 40°C 정도로 되었을 때 protoplast를 첨가하여 embedding하였다. Embedding한 Agarose MS 고체배지에서 1주일 정도 원형질체를 키운 후 동일조성의 MS액체배지에 옮겨주면서 배양하였고 microcallus가 형성되면 callus 유도배지나 shoot 유도배지로 옮겨 재분화를 꾀하였다.

다. Plasmid DNA 분리

pBI121 plasmid를 순수분리하기 위해 kanamycine이 첨가된 배지에서 자란 LBA 4404 strain의 single colony를 YEB 액체배지에서 24시간 배양한 후 배양액을 1.5 ml Eppendorf tube에 넣고 12,000 × g에서 2분간 원심분리하였다. 원심분리후 Vacuum aspirator를 이용하여 상등액을 제거하고 cell pellet만을 회수했다. 얻어진 pellet으로 부터 Alkali lysis 방법에 의한 minipreparation을 통해 pBI121 plasmid를 순수분리하였고 (Birnboim and Doly, 1979; Maniatis, 1989) 전기영동에 의해 그 size를 측정하였다.

라. Electroporation

electroporation을 하기 위해서 protoplast를 electroporation buffer (200 mM MgCl₂, 140 mM NaCl, 0.75 mM Na₂HPO₄, 5 mM Glucose, 0.5 mM KCl, pH 7.5)에 resuspending시켜 최종농도가 1×10^5 protoplast / ml이 되도록 하였고, plasmid DNA의 농도는 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3$ DNA molecule / protoplast로 조절하였다. protoplast와 plasmid DNA mixture를 electroporation chamber에 옮긴후 미리 결정된 Field strength, Capacitance, Pulse time 등의 처리 조합 (Table 2)에 따라 electroporation을 한 다음, protoplast를 0 °C에서 5 ~ 10 분정도 식히고 kanamycin 이 첨가된 MS-Agarose 배지에 embedding시켜 배양했다. 그리고 일부는 시간별 GUS 유전자의 발현 정도를 알아보기 위하여 0.7 M Mannitol이 첨가된 MS 액체배지에서 배양을 하였는데, 계대배양중 배지의 osmolarity는 점차로 낮추어 protoplast의 Cell wall 형성 및 세포분열이 용이하도록 하였다.

Table 2. Range of electroporation conditions using this experiment.

Volts	Filed strength (V/cm)	Capacitance (μ F)	Pulse time
200 ~ 500 V	500 ~ 1000 V/cm	100 ~ 1200 μ F	10 μ sec
			100 μ sec
			1 m sec
			10 m sec
			100 m sec

마. 형질전환의 검정

GUS gene의 product인 β -glucuronidase를 detection하는 방법으로는 크게 histochemical assay와 fluorometric assay 2가지가 있다 (Jefferson 등, 1987).

histochemical assay는 substrate 로 X-GLUC (5-bromo - 4 - chloro - 3 - indolylglucuronide) 를 이용하는데, β -glucuronidase가 이를 분해하여 indoxyl derivative가 만들어지게 되면 파란색의 색변화 반응이 나타나므로 쉽게 GUS 유전자의 발현 유무를 검정할 수 있으나, 이러한 변화는 식물조직 세포 자체등 여러가지 factor에 따라 좌우된다는 단점이 최근에 많이 보고 되고 있다 (Hu 등, 1990). 이에 비해서 fluorometric assay는 GUS gene의 product인 β -glucuronidase 효소의 substrate 로 4-MUG (4-methyl umbelliferyl glucuronide) 를 사용하며 이것이 4-MU (4-methyl umbelliferone) 로 전환되면 long wave UV light 下에서 형광을 띄게 되는데, 이때 발생하는 형광을 fluorometer로 측정하여 GUS gene의 발현을 확인하는 방법으로 sensitivity가 histochemical assay에 비해서 100배 내지 1000배나 높고 한 시점에서의 total gene product를 정량으로 결정할 수 있어, GUS gene의 발현을 time course에 따라 측정할 수 있다는 잇점이 있다. 따라서 본 연구에서는 형질전환된 현사시 protoplast의 gene expression을 관찰하기 위해 fluorometric assay를 실시하였으며 그 과정은 다음과 같다.

electroporation 후 배양하던 protoplast를 Eppendorf tube에 넣어서 100 $\times g$ 로 원심분리하여 회수한 후 여기에 500 μl 의 GUS extraction buffer를 넣고 마쇄한다. 이것을 12,000 $\times g$ 에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 새로운 Eppendorf tube에 넣고 여기에 GUS fluorometric assay buffer를 500 μl 첨가한다. 그리고 다시 37 $^{\circ}C$ 에서 15시간동안 incubation시킨 다음 200 μl 를 뽑아 cuvette에 넣고 0.5 M Na_2CO_3 를 800 μl 첨가, 반응을 종결시킨 뒤, long wave UV light (365 nm)하에서 fluorescence를 측정하였다. 이때 fluorometer를 이용하여 fluorescence를 측정하기 전에 미리 4-MU의 농도를 여러가지로 하여 Fluorometer를 calibration한 다음 여기

서 얻어진 graph를 이용하여 각 Sample의 fluorescence 측정값으로부터 4-MUG가 4-MU로 전환된 농도를 산출함으로써 GUS gene의 발현을 간접적으로 추정할 수 있었다 (Fig.3).

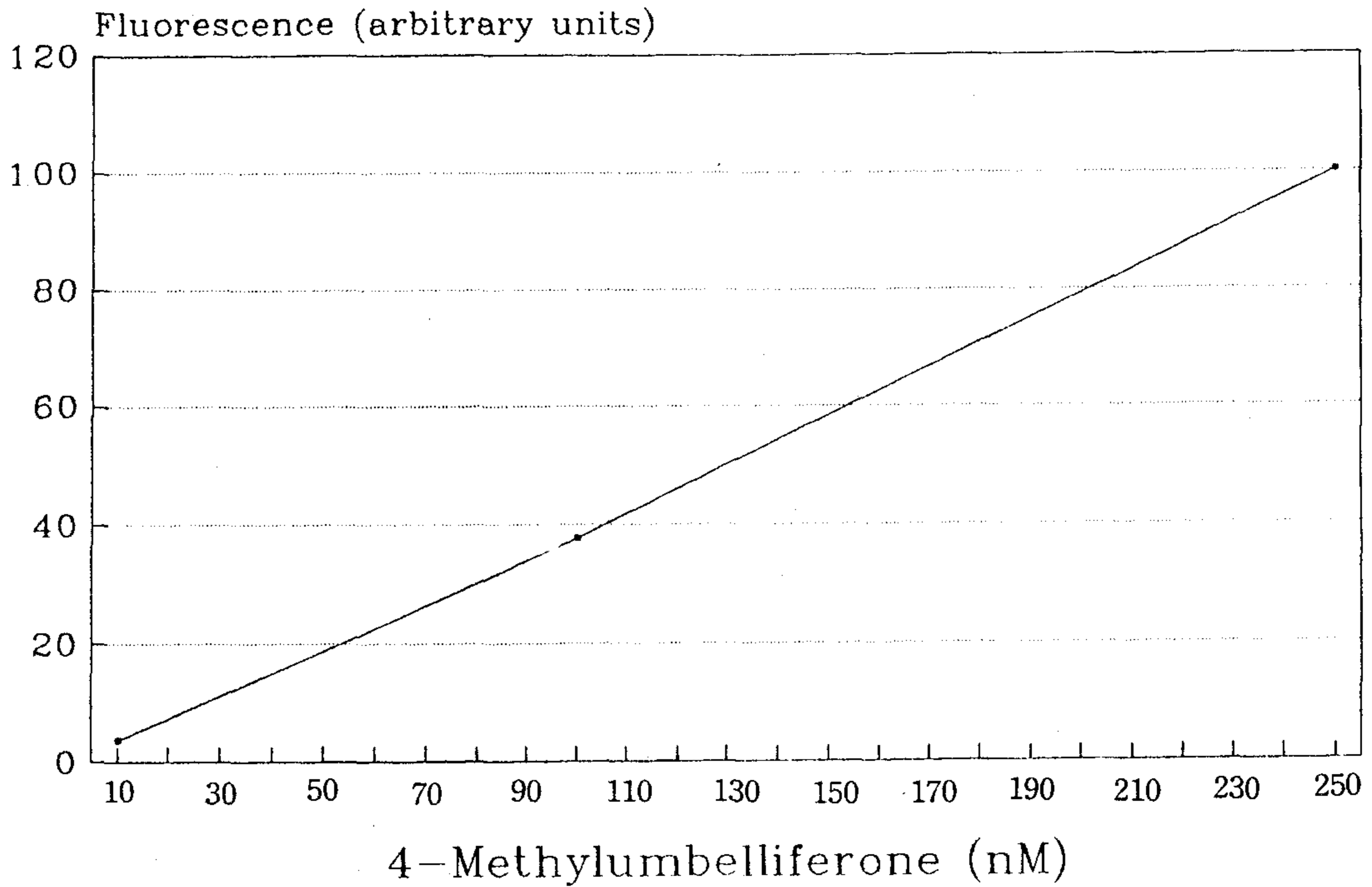


Fig.3. Fluorometer calibration curve

Fluorometric assay에 사용된 시약 및 용액의 조성은 Table 3과 같다.

* 200 mM NaPO ₄ ; mixture of 0.2 M NaH ₂ PO ₄ (39 ml and 0.2 M Na ₂ HPO ₄ (61 ml), pH 7.0	
* GUS extraction buffer ; 200 mM NaPO ₄ pH 7.0	25.0 ml
0.5 M EDTA pH 7.0	2.0 ml
Triton X-100	0.1 ml
Sarkosyl	0.1 g
β-mercaptoethanol	69.75 μl
* 1 mM 4-methyl umbelliferone(4-MU)	
* GUS fluorometric buffer; GUS extraction buffer containing 1 mM 4-methyl umbelliferyl glucuronide(4-MUG)	
* 0.2 M Na ₂ CO ₃	

Table 3. The buffer composition used in fluorometric GUS assay

이상의 실험 방법을 요약하면 Fig.4에 도식한 바와 같다.

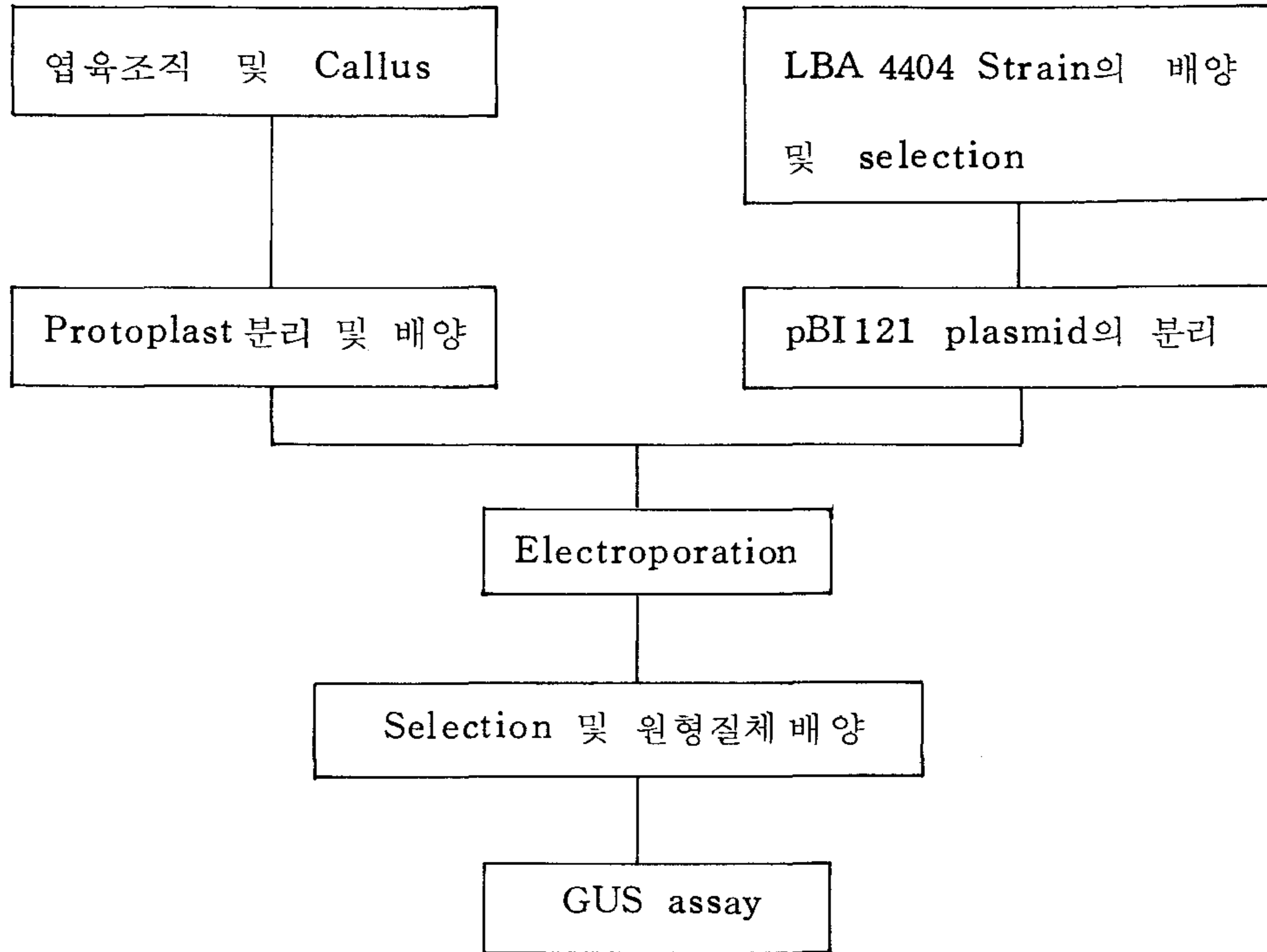


Fig.4. The flow chart of experimental procedure for transformation of *Populus alba* × *P. glandulosa* using electroporation technique

第3節 結果 및 考察

1. Protoplast의 분리

protoplast를 나출시키기 위해서 배양을 통해 얻은 어린잎과 callus를 시료로 사용하였으며 Table 4에서 보는바와 같이 cellulase와 macerozyme을 여러가지 농도로 처리하고 incubation 시간을 달리하여 protoplast의 수확량을 비교하였다.

Table 4. Protoplast yield at different enzyme concentrations and plant sources. (단위 : $\times 10^5/g \cdot F.W$)

enzyme 조합 처리시간	A		B		C		D		E	
	L	C	L	C	L	C	L		L	C
4	0.2	0.4	1.8	1.4	-	0.6	0.2	0.2	1.2	1.6
8	1.2	1.0	2.6	4.0	1.4	1.0	0.4	0.2	1.8	3.8
12	2.6	2.0	4.6	5.8*	1.8	1.6	1.4	0.6	2.0	3.6
16	3.0	3.2	4.4	5.0*	2.6	2.8	1.8	0.8	2.6	2.8
20	2.4	3.6	-	2.0	2.4	3.6	1.6	1.4	2.8	1.8

A ; 0.5 % Cellulase , 0.1 % Macerozyme

B ; 1.0 % Cellulase , 0.1 % Macerozyme

C ; 0.5 % Cellulase , 0.2 % Macerozyme

D ; 1.0 % Cellulase , 0.2 % Macerozyme

E ; 2.0 % Cellulase , 0.2 % Macerozyme

(L: leaf explant. C: Callus. at 25 °C , dim light, 50 rpm)

protoplast의 수확량은 1.0% cellulase, 0.1% macerozyme의 농도에서 가장 좋게 나타났으며 시료별로는 callus를 이용한 것이 leaf를 이용한 것보다 대체로 높은 수확량을 나타내고 있다. 그리고 incubation time을 비교해본 결과 12~16시간 정도 처리한 경우가 높은 수확량을 나타내었다. (Fig.5.).

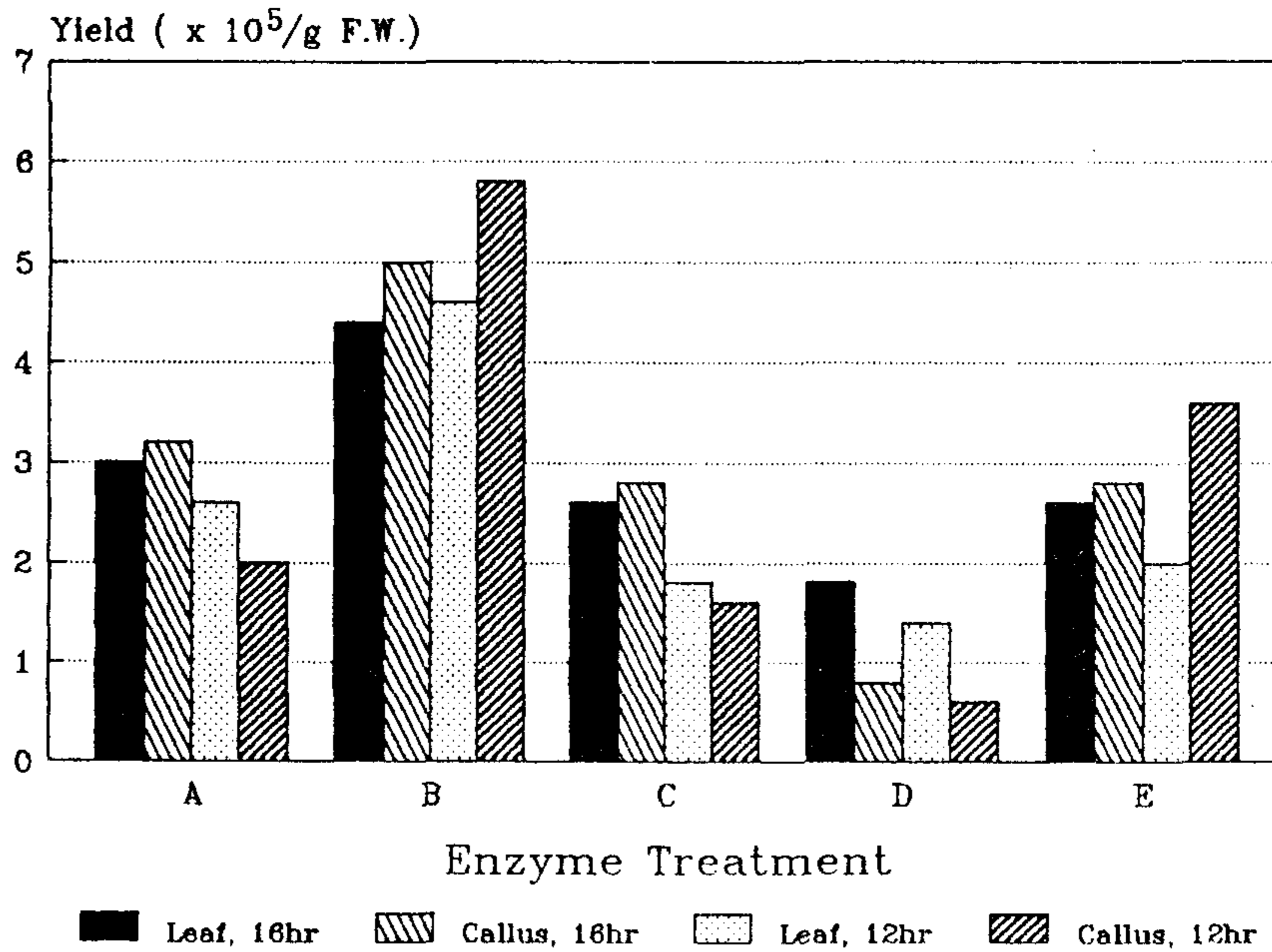


Fig.5. Protoplast yield in different enzyme treatment after 12~16 hour incubation.

protoplast의 분리에 사용되는 enzyme의 종류와 농도는 plant species와 시료로 사용되는 부위에 따라 달라진다고 하는데 일반적으로 노화된 세포에서는 protoplast의 수확이 극히 저조하며 전혀 분리되지 않는 반면, 어린조직 특히 embryogenic cell들은 쉽게 분리가 된다고 한다 (Abdullah 등 1986). 따라서 기내 배양된 식물체 (Bajaj, 1972), root tip과 같은 어린 조직이나 explant (Xu 등, 1982), hypocotyl (Glimelius, 1984), cotyledones

(Hammatt 등, 1987) 및 shoot(Russel and McCown, 1986)등을 시료로 이용할 경우는 저농도의 enzyme만으로도 좋은 결과를 얻을 수 있으며 enzyme의 처리시간도 성숙된 조직의 경우보다 비교적 짧게하는 것이 유리하다고 하는데, 본 실험에서도 고농도의 enzyme을 처리한 경우는 incubation 시간을 길게 할수록 protoplast의 viability가 감소되는 것을 관찰할 수 있어 위의 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다.

이상을 종합해보면, 1.0% cellulase, 0.1% macerozyme R-10, 0.1% pectolyase Y-23, 0.5% hemicellulase 그리고 0.1% BSA의 조성에서 callus 를 시료를 사용하여 12 ~ 16시간 정도 incubation을 했을때 $5.0 \sim 5.8 \times 10^5$ protoplast / g · F.W.로 가장 높은 수확량을 나타내고 있음을 알 수

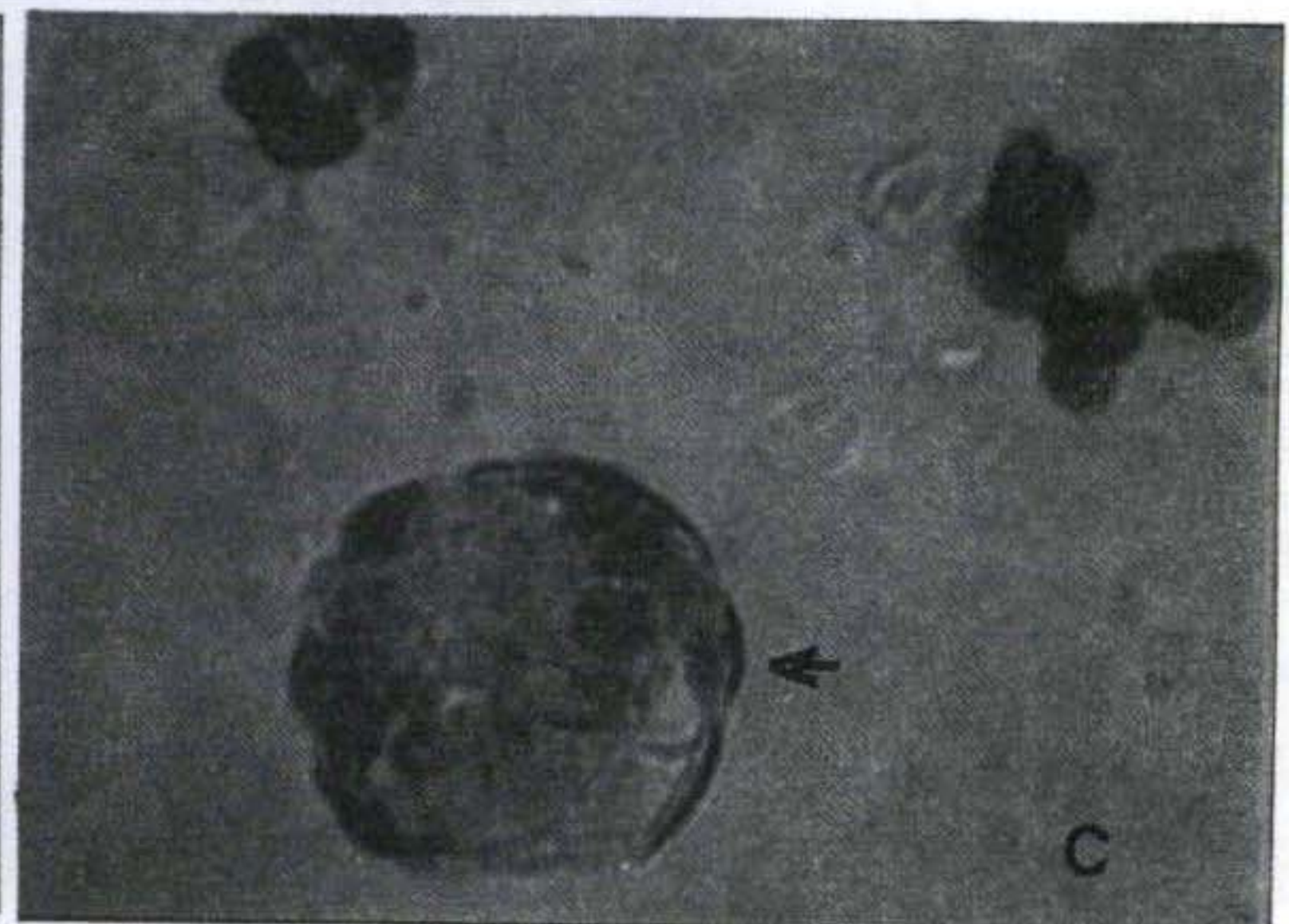
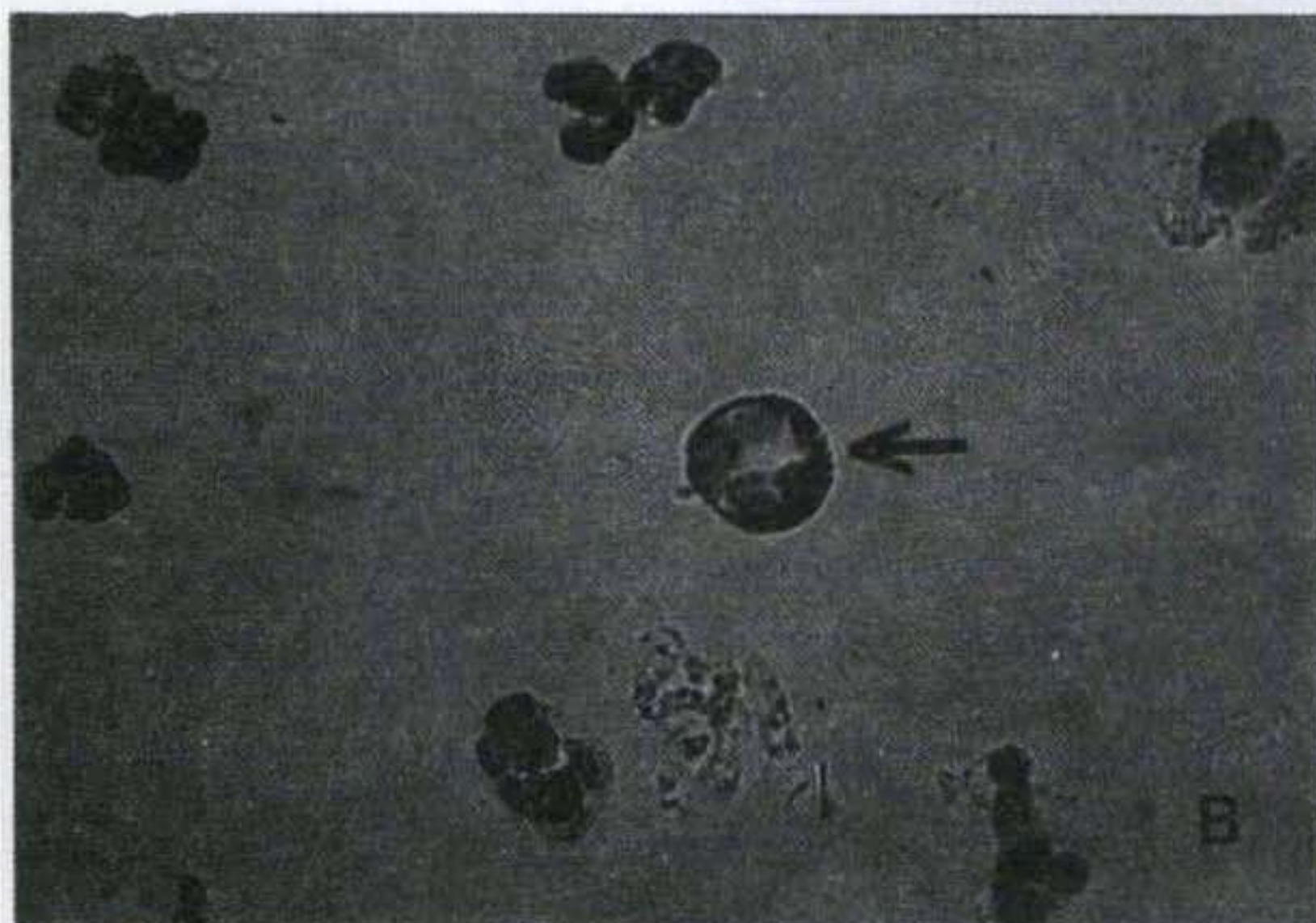
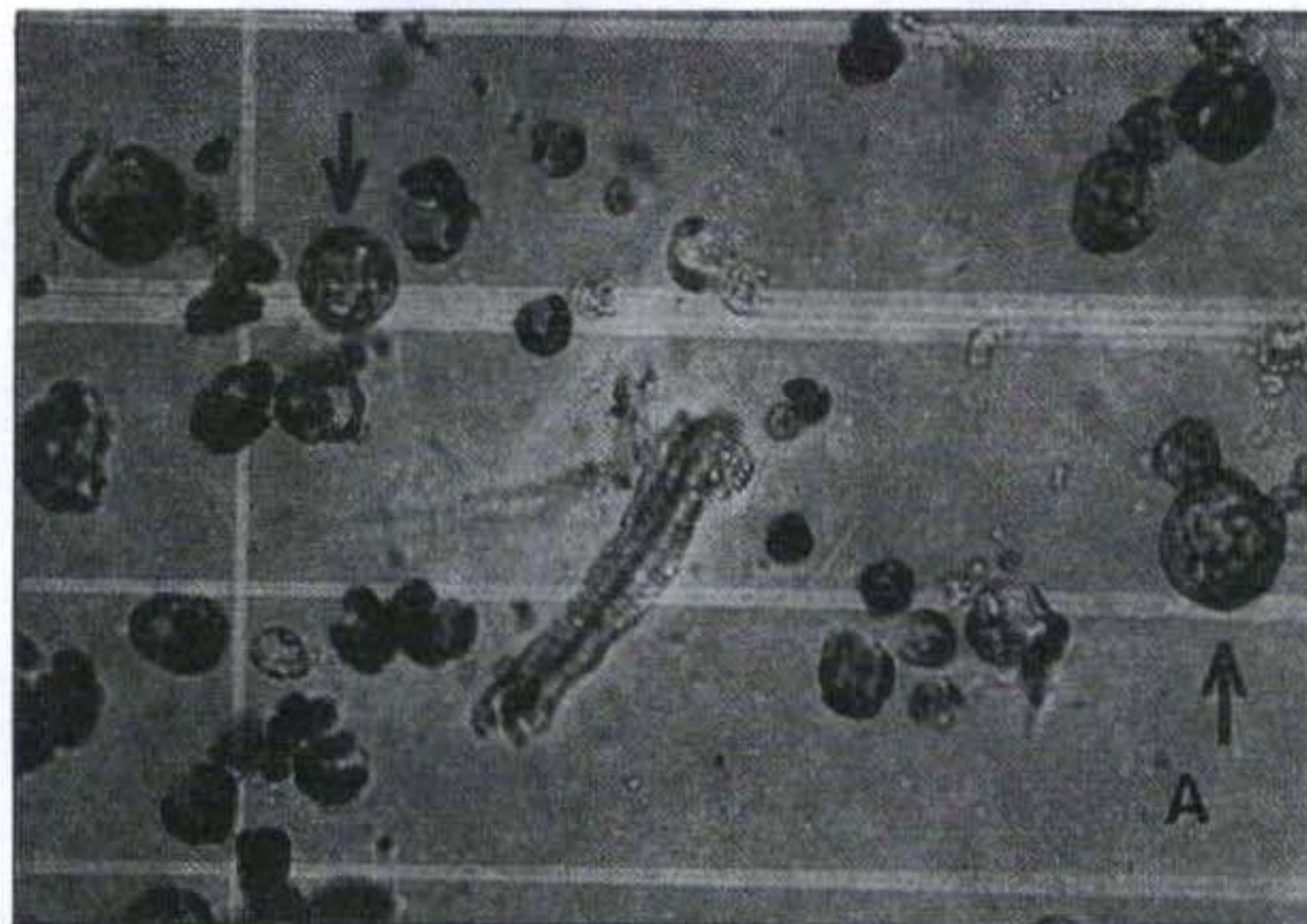


Fig. 6. Freshly isolated protoplast

있었고, viability가 높고 plating 효율이 좋은 protoplast 를 얻기 위해서는 어린조직을 사용하고 순수한 enzyme 을 사용하며 동시에 incubation 시간 을 줄이는 것이 가장 좋을 것으로 생각되었다.

2. Protoplast 의 배양

순수분리된 protoplast 를 0.5 mg/l BAP, 2.0 mg/l 2,4-D 그리고 1% Agarose가 첨가된 MS배지에 embedding시켜 배양하였다. 배양 1주일후부터 microcallus가 형성되기 시작하였는데, 형성된 microcallus를 새로운 petri-dish로 옮긴다음 같은 조성의 MS액체 배지를 부어 지속적인 배양을 하였으나 직경 5 mm 정도로 자란 이후에는 더이상의 분열을 유도하지 못했다. 이는 아마도 사용된 시료의 totipotency가 떨어지거나 protoplast 분리시에 입은 damage 때문이 아닌가 사료되어 현재 계속 정상적인 Callus 조직으로의 유도를 시도하고 있다. 이에 대한 결과는 제 3차년도 연구결과 보고서에 추가로 보고할 예정이다.

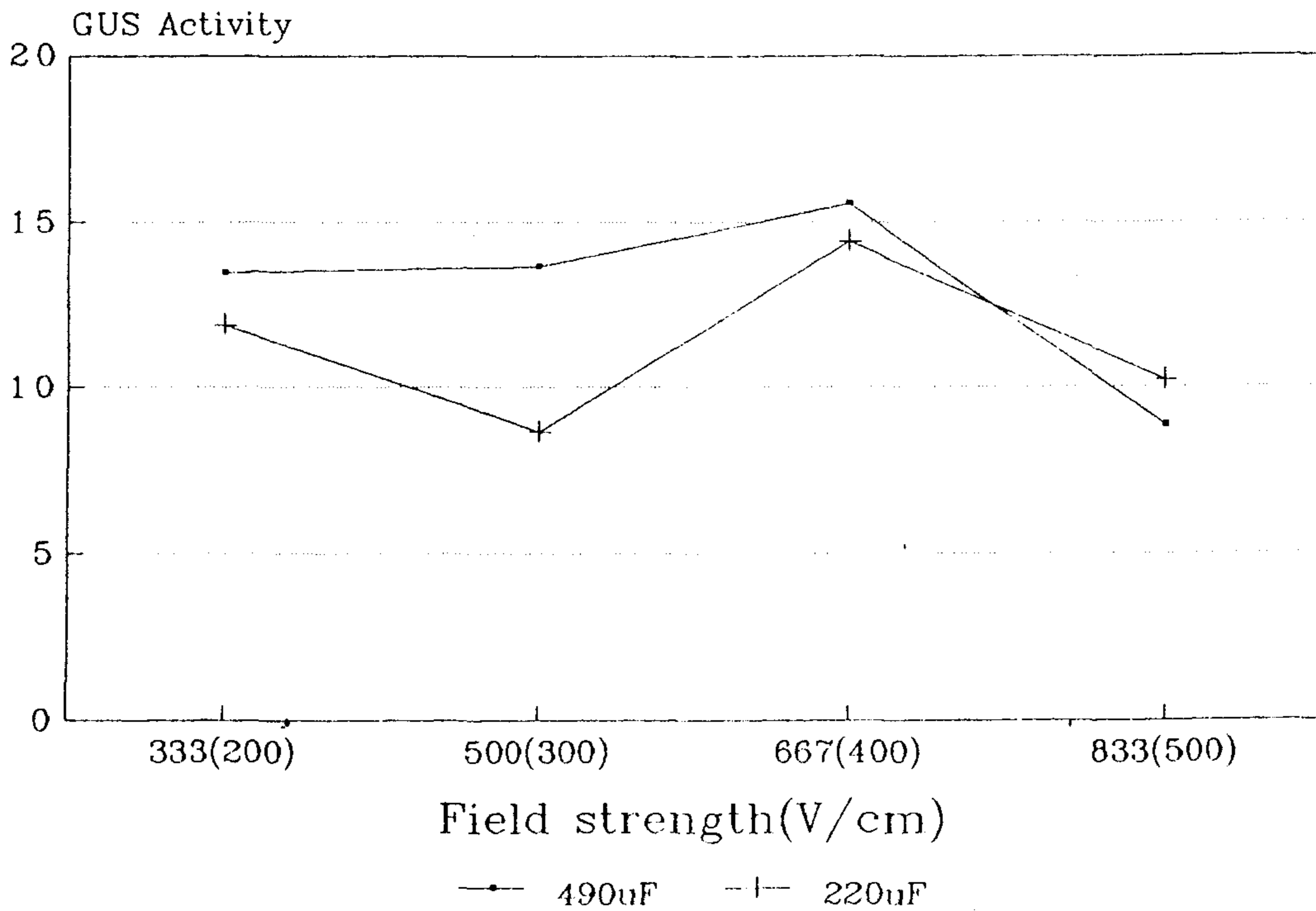
3. Electroporation 및 GUS gene expression

protoplast에 전기적인 충격을 가하면 일시적으로 pore가 형성되며 이 pore를 통해 DNA와 같은 macromolecule들이 cell내로 이동할 수 있다고 알려져 있으며 (Neumann등, 1982) 이 pore는 직경이 30 nm 정도이고 pulse를 가한 후 몇분정도 지속적으로 존재한다고 하는데 (Okada등, 1986), 여러 학자들에 의해 이러한 방법을 식물체의 형질전환에 응용하고자 하는 시도가 많이 이루어져 왔으며 (Fromm등, 1986 ; Gupta등, 1988 ; Bekkaoui 등, 1988 ; Rudy 등, 1990), 이것이 electroporation의 기본 원리가 되는 것이다.

Electroporation 효율에 영향을 미치는 요인으로는 크게 Field strength (V/cm), Capacitance (μF) 및 pulse duration의 3가지가 있다고 한다. 이 중에서도 가장 큰 영향을 미치는 요인은 field strength라고 알려져 있는데, 본 연구에서도 이러한 3가지 요인을 각기 달리 하면서 최적의 electroporation 효율을 나타내는 조건을 찾기 위하여 GUS gene의 발현정도를 조사한 결과, Fig. 7에서 보는바와 같이 field strength와 capacitance를 달리하였을 경우의 GUS activity를 fluorometric assay 방법에 의해 비교하였을 때, field strength에서는 $500 V/cm \sim 667 V/cm$ 의 범위에서 가장 높은 GUS activity를 나타냈고, capacitance에서는 $490 \mu F$ 를 처리한 것이 $200 \mu F$ 을 처리한 것 보다 높은 GUS activity를 나타내었다.

Mikako 등 (1989)은 tomato protoplast를 대상으로 electroporation을 실시한 결과 $666 V/cm \sim 1000 V/cm$, $47 \mu F \sim 100 \mu F$ 범위에서 가장 높은 CAT activity를 보였다고 하는데, 이는 본 실험의 결과보다 매우 높은 field strength에서 높은 형질전환율을 보여주는 것이다. 그러나 Mikako 등은 그들의 연구결과에서 높은 field strength를 처리한 protoplast는 cell survival이 감소하고 있음을 또한 제시해 주고 있어, 높은 Field strength 수준에서 Transient gene expression에 의한 형질전환율은 일시적으로 높게 나타나지만, cell들에게 가해지는 전압의 증가로 인한 Damage로 말미암아 survival율과 재분화 능력의 감소를 초래할지도 모른다는 것을 암시해 준다고 할수 있겠다. 따라서 Electroporation에 의한 식물체의 형질전환에는 Field strength와 Cell survival 양자간의 적절한 Balance가 필요하다고 생각되는데, 이같은 사실은 현재 이분야에서 수행되어지고 있는 접근방법을 고찰해 보면 보다 명확해진다. 즉 일반적으로 Electroporation에 의한 식물체의 형질전환 시도는 2가지로 대별될 수 있는데, high voltage pulse, short duration에 의한 방

법 (Shillito 등, 1985)과 low voltage pulse, long duration에 의한 방법 (Fromm 등, 1985)이 그것이다. 그러나 후자가 전자에 비해서 실험 condition을 조절하기가 쉽고 또한 원형질체의 생존율이 높아 대부분 이 방법을 선호하고 있는 실정이다.(Draper 등, 1988). 한편 Wilde 등 (1989)은 yellow poplar의 protoplast를 이용한 electroporation 실험에서, 750 V/cm의 field strength와 450 μ F의 capacitance에서 가장 높은 protoplast viability를 나타낸다고 보고하여 본 연구와 비슷한 결과를 보여주고 있어 아마도 현사시와 같은 임목의 Electroporation시 적정 Field strength는 본 실험과 같이 Low field strength, long pulse duration이 유리한 것으로 생각된다.



(); -Display Voltage, Distance; 0.6Cm

Fig.7. Field strength and GUS activity

electroporation을 이용한 식물체의 형질전환 연구에 있어서도 2가지 접근방법이 있다. 하나는 vector내 Functional gene의 transient expression을 연구하는 것으로 이들 유전자에 의해 만들어지는 enzyme의 unit activity를 electroporation한 protoplast 추출물로 부터 측정하는 것이고, 다른 하나는 이 protoplast로 부터 형질전환된 colony를 선발하여 stable한 transformants를 생산하는 것이다. Transient gene expression 연구는 structural gene의 promoter나 enhancer의 효율을 비교하기 위해 많이 이용되어 왔으며 (Graves등, 1986 : Myers 등, 1986 : Werr와 Lorz, 1986), 형질전환 유무의 조기확인과 gene 발현의 양상등을 조사하는데도 이용되고 있다 (Bekkaouil 등, 1988 : Rudy 등, 1990). 특히, 본 연구와 같은 fluorometric assay를 이용한 gene expression연구의 경우는 gene 발현의 양상을 시간에 따라서 살펴봄으로써 세포분열에 따르는 gene 발현의 주기성을 연구하는데 도움을 줄 수 있는 방법이라고 생각된다.

본 실험에서도 fluorometric assay를 통해서 GUS gene의 time course에 따른 expression을 조사하였는데 (Fig.8), electroporation을 실시한 후 1日째 부터 10日째까지의 GUS gene의 발현을 조사한 결과 5일정도까지는 GUS gene의 activity가 증가하다가 7일을 고비로 하여 감소되는 전형적인 transient gene expression의 형태를 보여주었다. 이러한 결과는 Electroporation에 의해 원형질체내로 도입된 plasmid가 nuclear genome에 정상적으로 삽입되지 못하고 있으면서 plasmid 자체로 일시적으로 발현을 하다가 degradation 되거나, 삽입되었다 하더라도 원형질체 자체가 세포수준으로 분화 또는 세포분열을 하지 못하고 죽어버리는 경우 등을 반영하는 것이라고 생각된다. 따라서 완전한 transformants를 얻기 위해서는 원형질체 또는 세포단계에서의 일시적인 발현검정보다는 최소한 원형질체를 callus 단계로 분화시

킨 뒤 적절한 Selection Marker 및 GUS assay에 따른 장기적인 선발을 해야할 것이다. 본 연구에서도 완전한 transformants를 얻기 위해 kanamycin이 첨가된 배지에서 지속적인 선발을 하였으나 protoplast배양의 경우와 마찬가지로 5mm 정도의 크기로 자란 이후에는 더 이상의 세포분열을 하지 못했다(Fig.9). 이는 역시 시료의 totipotency 및 전기적 충격에 의한 상해 때문으로 생각되며 따라서 Electroporation한 protoplast의 재분화를 위해서는 첫째, 원형질체의 재분화 조건에 관한 세포학적 수준에서의 연구와 둘째, 보다 객관적이고 자세한 Electroporation 처리조건에 관한 연구가 뒤따라야 한다고 생각한다. 이에 제 3차년도 연구에서는 실제적인 유용 유전자를 대상으로 보다 다양한 처리조건을 확립한 뒤 이에 따른 Electroporation을 수행하려 하고 있다.

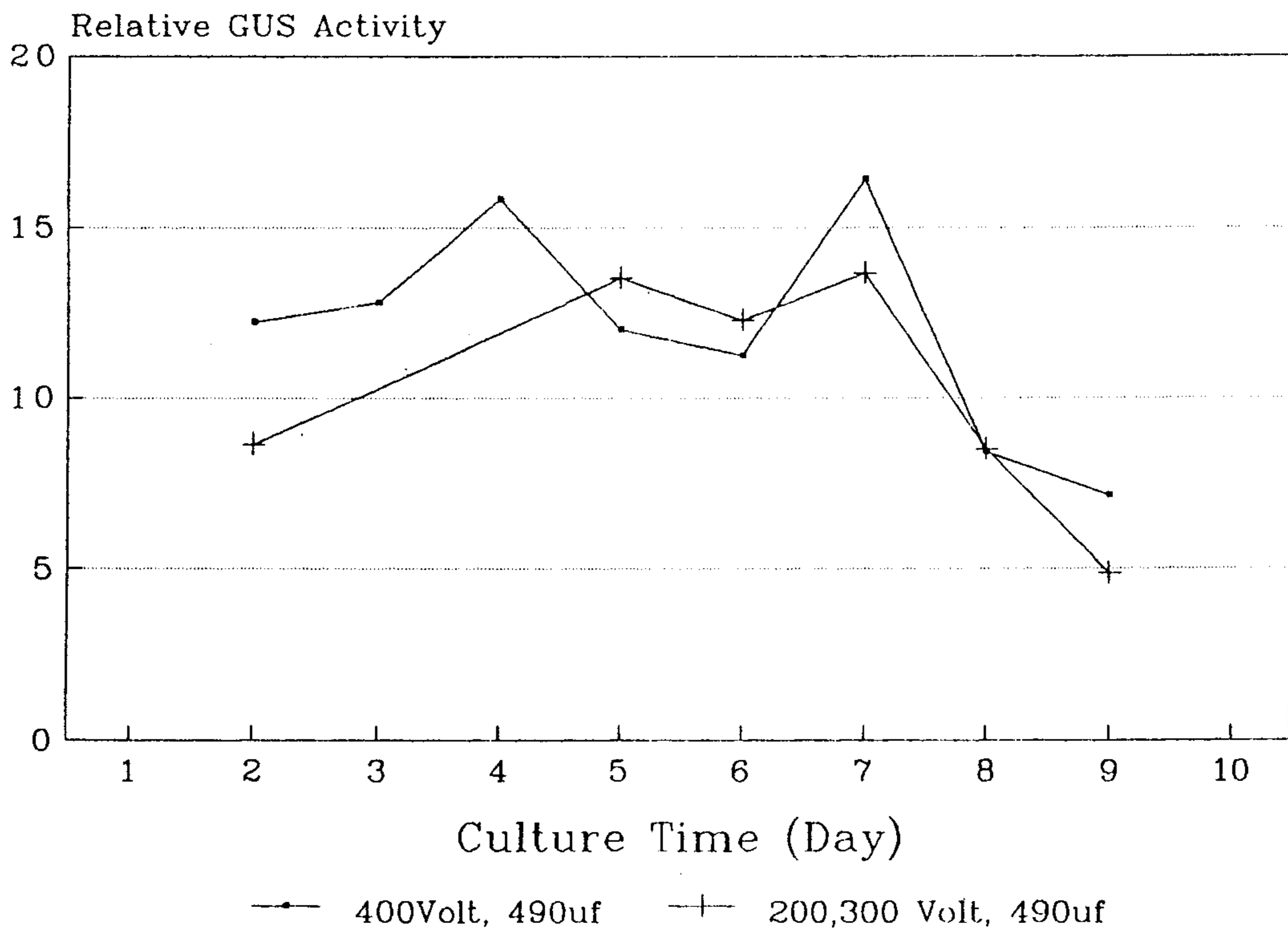


Fig.8. GUS activity through culture time course



Fig.9. Cell colony derived from electroporated protoplast under selection media containing 75 mg/ℓ kanamycin.

이제까지의 연구결과를 종합해보면, Electroporation에 의한 임목의 형질전환 체계는 대다수의 임목들에 대해서 상대적인 형질전환율이 높지않은 것으로 판단되는데 그와 같은 이유로서는 제 1차년도 연구결과에서 나타난 바와 같이 T-DNA mediated gene transfer system이 외래 유전자 도입과정의 용이성 및 도입된 유전자의 식물체 genome내로의 안정된 삽입과 발현 그리고 효과적인 stable transformants의 유지와 Whole plant로의 재분화가 매우 용이하기 때문이다. 그러나 앞서 언급된 바와 같이 주요 침엽수종들에 있어서는 Agrobacteria의 infection이 쉽지않기 때문에 이들 수종들에 대한 재분화 조건의 확립이 우선적으로 선행되어야한다면 Electroporation에 의한 유전자의 도입은 상당한 의미를 지니게 될 것이다.

第 4 節 摘 要

GUS gene을 가지고 있는 pBI121 plasmid를 Electroporation 방법을 통해 *Populus alba* × *P. glandulosa*의 protoplast내로 삽입시킨 뒤 protoplast로부터 형질전환체를 유도하기 위한 일련의 실험 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. *Populus alba* × *P. glandulosa*의 幼葉 및 callus로 부터 protoplast 분리하기 위한 최적의 조건은 1% cellulase, 0.1% Macerozyme R-10, 0.1% Pectolyase Y-23, 0.5% Hemicellulase, 0.1% BSA의 조성에서 그리고 callus를 시료로 하였을 경우 5.8×10^5 protoplast/g · F.W로 가장 좋게 나타났다.

2. Electroporation을 실시한 결과 Field strength가 500 ~ 667 V/cm, Capacitance는 490 μ F, 그리고 pulse duration은 10 msec인 조건에서 가장 높은 GUS activity를 나타내어 최적의 조건임을 알 수 있었다.

3. Electroporation에 의한 GUS gene의 발현을 시간에 따라 살펴본 결과 7일을 고비로 점차 감소되는 전형적인 transient gene expression의 양상을 나타내었다.

4. Electroporation을 실시한 protoplast를 75 mg/l kanamycin, 0.5 mg/l BAP, 2 mg/l 2,4-D, 1% Agarose가 첨가된 MS배지에서 계대배양하면서 완전한 transformants의 선발을 유도했으나 5 mm 정도 자란 이후에는 더 이상의 생장을 보이지는 않았다. 따라서 현재 계속적인 재분화 유도를 수행중이다.

引用文獻

1. Abdullah R., Cocking EC., Thomson JA. 1986. Efficient plant regeneration from rice protoplast through somatic embryogenesis. *Biotechnology* 4 : 1087–1090.
2. Bajaj YPS. 1972. Protoplast culture and regeneration of haploid tobacco plants. *Am. J. Bot.* 59(6) : 647.
3. Bekkaoui, F., Piolm, M., Laine E., Raju, D.S.S., Crosby WL., Dunstan, D.I. 1988. Transient gene expression in electroporated *Picea glauca* protoplasts. *Plant Cell Rep.* 7 : 481–484.
4. Birnboim, H.C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7(6) : 1513–1523.
5. Draper, J., et al., 1988. Transformation of plant cells by DNA mediated gene transfer. In *Plant genetic transformation and gene expression*. ed., J. Draper et al., Blackwell Sci. Pub., London. pp161.
6. Fromm M.E., Taylor, L.P., and Walbot, V. 1985. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 : 5824–5828.
7. Fromm M.E., Taylor, L.P., and Walbot, V. 1986. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* 319 : 791–793.
8. Glimelius K. 1984. High growth rate and regeneration capacity of hypocotyl protoplasts in some *Brassicaceae*. *Physiol. Plant.* 61 : 38–44.
9. Gupta, P.K., Dandekar, A.M. and Durzan, D.J. 1988. Somatic proembryo formation and transient expression of luciferase gene in Douglas fir and loblolly pine protoplast. *Plant Sci.* 58 : 85–92.
10. Hammatt N., Kim H.I., Davey MR., Nelson RS., Cocking EC. 1987. Plant regeneration from cotyledon protoplasts of *Glycine canescens* and *G. glandestina*. *Plant Sci.* 48 : 129–135.
11. Hu, C.Y., et al., 1990. Intrinsic GUS-like activities in seed plants. *Plant Cell Rep.* 9 : pp1

12. Klein, T.M., T. Gradziel, M.E. Fromm and J.C. Sanford. 1988. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. *Bio/Tech.* 6 : 559.
13. Lorz, H., B. Baker and J. Schell. 1985. Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. *Mol. Gen. Genet.* 199 : 178.
14. Maniatis et al. 1989. *Molecular Cloning.* CSH Press. pp1.21.
15. Mikako Tsukada, Tomonobu Kusano and Yoshichika Kitagawa. 1989. Introduction of foreign genes into tomato protoplasts by electroporation. *Plant Cell Physiol.* 30(4) : 599–603.
16. Neuhaus, G. et al. 1987. *Theor. Appl. Genet.* 75 : 30.
17. Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider PH. 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric field. *EMBO J.* 1 : 841–845.
18. Okada, K., et al., 1986. Introduction of functional RNA into plant protoplast by electroporation. *Plant Cell Physiol.* 27 : pp619.
19. Ohta, Y. 1986. High-efficiency genetic transformation of maize by a mixture of pollen and exogenous DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 715.
20. Rudy, A., et al., 1990. Transient gene expression in intact and organized rice tissues. *The Plant Cell.* 2 : 591–602.
21. Russell, J.A. and McCown, B.H., 1986. Culture and regeneration of populus leaf protoplast isolated from non-seedling tissue. *Plant Sci.* 46 : pp133.
22. Schillito, R.D., et al., 1985. High efficiency direct gene transfer to plants. *Biotech.* 3 : pp 1099.
23. Werr, W., and Lorz, H. 1986. Transient gene expression in a Gramineae cell line. A rapid procedure for studying plant promoters. *Mol. Gen. Genet.* 202 : 471–475.
24. Xu, Z.H., Davey, M.R., Cocking, E.C., 1982. Organogenesis from root protoplasts of the forage legumes *Medicago sativa* and *Trigonella foenum-graecum*. *Z. pflanzenphysiol.* 107 : pp231.
25. Zambryski, P., J. Tempe and J. Schell. 1989. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* 56 : 193.

第 4 章 林木의 形質轉換을 위한 Ti-plasmid

Vector System의 開發

Vector construction of Ti-plasmid vector system
containing luciferase as a reporter gene

研究機關名 : 서울大學校 農科大學

研究責任者 : 金 昞 東

研 究 員 : 趙 和 鎮

여 백

第1節 緒 言

식물체에 외부유전자를 도입시키기 위한 Ti plasmid vector system 에는 필수적으로 요구되는 3가지 사항이 있으며, 이것들은 border sequence, vir-region, selection marker 들이다. 이 중 vector 의 개발과 함께 지금까지 계속하여 발전되어 온 것이 형질전환의 목적과 방법에 맞는 selection marker 와 reporter 유전자이다. Tn5 로부터 kanamycin 저항성 유전자가 cloning (Bevan 등. 1983) 되어 selection marker 로 사용되기 시작하여 현재 제초제 저항성 유전자들을 합쳐 10 개 이상이 사용되고 있으며, 이와 함께 reporter 유전자도 다수가 cloning 되어 사용되고 있다 (Draper 등. 1988). Reporter 유전자는 원형질체를 이용한 형질전환방법과 같이 형질전환체가 single cell origin 이거나 형질전환율이 높은 작물의 경우에 주로 사용되어 왔고 현재에는 이 외에도 조직특이적 발현양상을 나타내는 promoter 의 검정이나 promoter 의 발현 강도를 알아 보기 위해 많이 사용되고 있다. Chloramphenicol acetyltransferase (CAT), nopaline synthase, luciferase, β -glucuronidase (GUS) 등이 현재 많이 사용되고 있는 reporter 유전자들이다. 이 중 luciferase 는 반딧불 (*Photinus pyralis*) 의 형광유전자를 cloning 한 것으로 1986 년 식물체인 담배에 도입시켜 그 발현을 볼 수 있었으며 그 후로 reporter 유전자로서 널리 사용되게 되었다 (Ow 등. 1986). 이 유전자가 coding 하고 있는 luciferase 는 luciferin 이라는 물질을 산화시켜 형광을 나타내도록 하며 우리는 이것을 X-ray film 에 감광시켜 발광여부를 확인할 수 있다. 이것을 reporter 유전자로 사용할 경우 그 검정방법은 다양하다. 형질전환체가 아직 기내에 있는 경우 소량의 잎조직으로부터 단백질을 추출하여

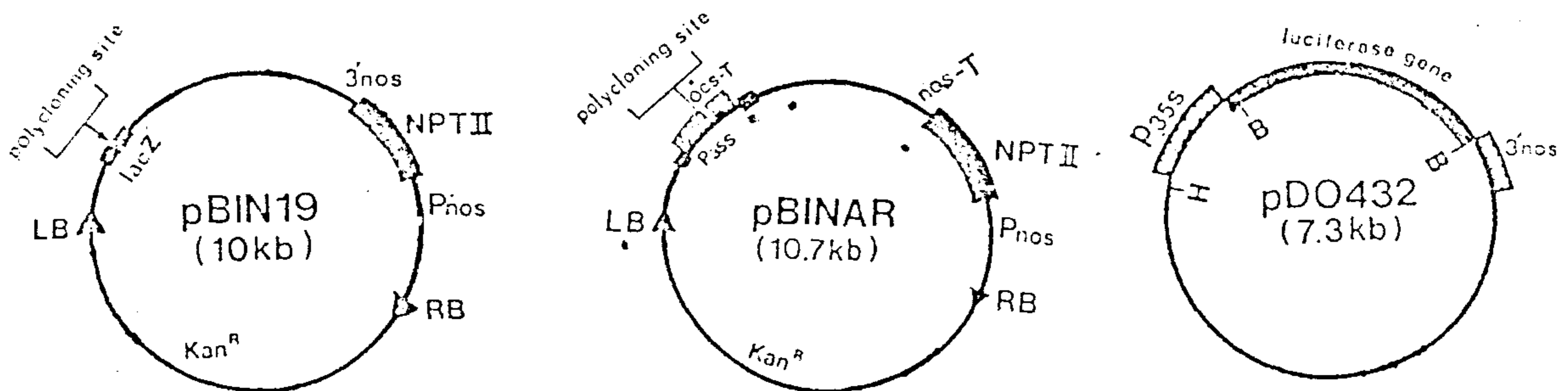
luciferin 과 반응시켜 형질전환 여부를 확인할 수 있으며, 순화과정을 거쳐 pot 에 이식하여 성장하고 있는 경우에는 관수시에 luciferin 을 섞어줌으로써 검정이 가능하다. 현재 우리나라에서 널리 사용되고 있는 GUS 와 같이, 그 활용범위가 넓고 sensitivity 도 높으나 아직은 널리 소개되어 있지 않고, 식물체에 도입되어 발현될수 있도록 만들어져 있는 것이 없기 때문에, 이 유전자를 reporter 유전자로 사용하기 위해 식물체내로 도입 발현이 가능한 두개의 intermediate vector 에 삽입시켰다. 이렇게 하여 얻어진 luciferase 를 reporter 유전자로서 갖는 새로운 vector 는 일반적인 형질전환 이외에도 promoter 의 검정을 위한 여러 실험 (Ow 등. 1987)에 다양하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

第2節 材料 및 方法

1. 재 료

Intermediate vector 로는 pBIN19 (Bevan, 1984) 과 pBINAR (Rhim, 1989) 을 사용하였고 luciferase 유전자는 pDO432 (Ow 등 1986) 에 삽입되어 있는 것을 사용하였다. Transformation 을 위한 *E. coli* strain 으로는 TGI 을 사용하였다.

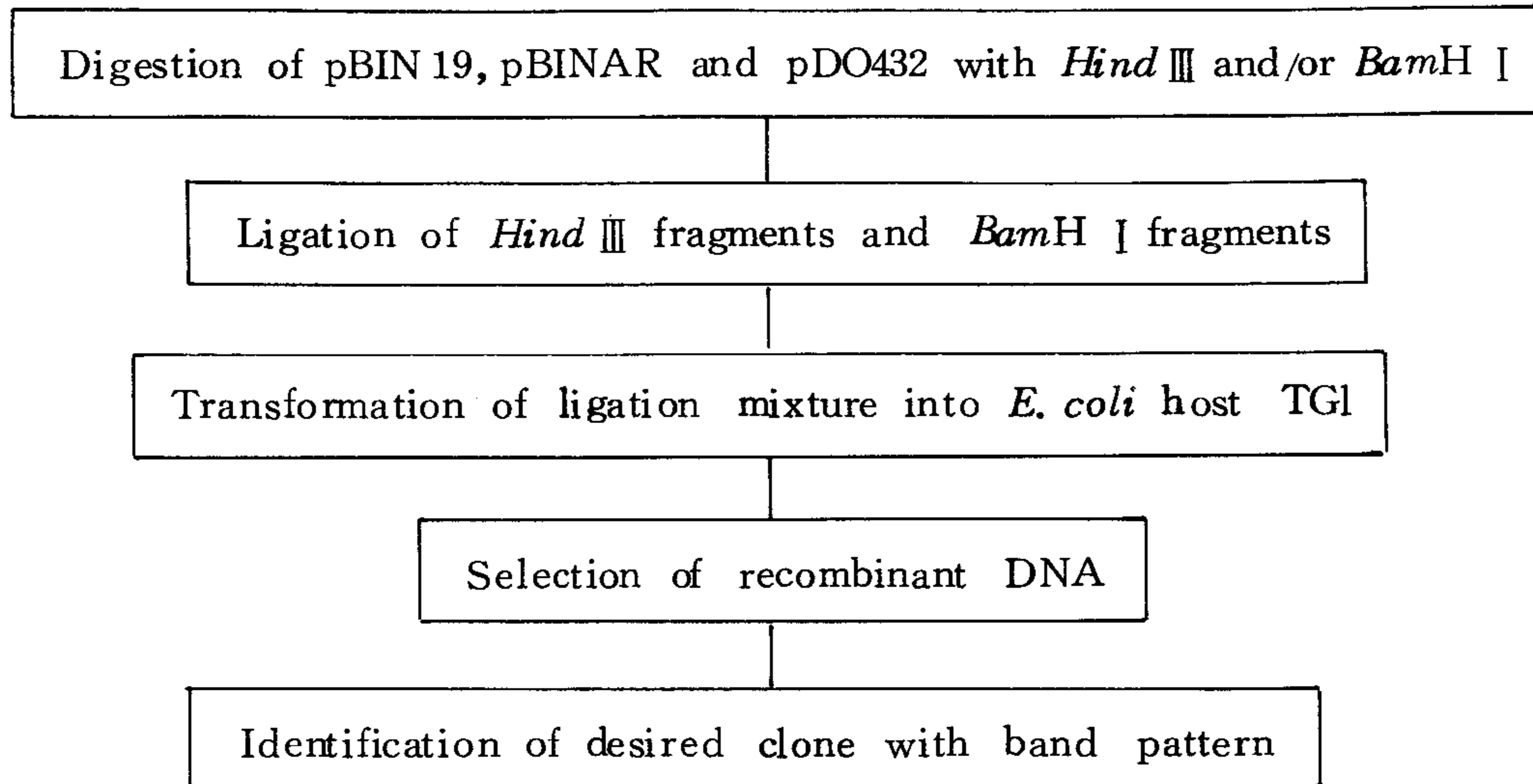
본 실험에서는 pBIN19 과 pDO432 의 *Hind* III fragment 와 pBINAR 과 pDO432 의 *Bam*H I fragment 를 각각 ligation 시켜 17.3 kb 와 12.6 kb 크기를 갖는 두개의 binary vector 를 만들어 여기에 포함되어 있는 luciferase 유전자를 reporter 유전자로 사용하고자 한다 (그림 1).



(그림 1) 본실험에 사용된 vector 의 모식도

LB: left border, RB: right border, *P_{nos}*: nos promoter, *P_{35S}*: 35s promoter, NPTII: neomycin phosphotransferase II, *ocs-T*: octopine synthase terminator, *nos-T*: nopaline synthase terminator

2. 방 법



(그림 2) Process for vector construction

1) Preparation of plasmid-DNA

각각의 bacterial culture 1 ml 을 kanamycin 이 첨가된 LB배지 100 ml 에 붓고 37°C 에서 16시간 동안 키운다. 7000rpm 에서 10분간 원심분리한 뒤 pellet 에 용액 14 ml 을 첨가한 뒤 30분간 얼음에 담근다. 다시 용액 2 를 8 ml 첨가하고 0°C 에서 5분간 놓아둔다. 여기에 용액 3 을 6 ml 첨가한 뒤 60분동안 얼음에 담가두고 4°C 에서 10000 rpm 으로 15분간 centrifugation 한 뒤 40 ml ethanol 을 처리하고 -20°C 에 1시간 동안 놓아둔다. HB4-rotor 에서 10000rpm 으로 15분간 centrifugation 한 뒤 2 ml RNase - buffer 를 첨가한 뒤 37°C 에서 1시간 동안 반응시킨다. 여기에 1 ml CsCl - buffer 와 4 ml ethidium bromide 를 첨가하고 50 Ti-Rotor 에서 40000rpm 으로 48시간 동안 centrifugation 한다. Hand UV lamp 로 plasmid - DNA band 를 확인하고 주사기로 이것을 뽑아낸 뒤 isopropanol 로 EtBr 를 제거하고

dialysis 시킨다 (Birnboim 등, 1979).

용액 1 : 50 mM Glucose

10 mM EDTA

25 mM Tris - HCl (pH 8.0)

10 mg/ml Lysozyme

용액 2 : 0.2 N NaOH

1 % SDS

용액 3 : 3 M Sodium acetate

(pH 4.8)

CsCl - buffer : 50 mM Tris HCl (pH 7.5)

20 mM EDTA

1 g/ml CsCl

RNase - buffer : 50 mM Tris - Base

1 mM EDTA (pH 7.5)

50 μ g/ml RNase A

2) Digestion of pBIN 19, pBIAR and pDO432 with *Hind* III and/or *Bam*H I 위에서 분리한 pBIN 19 과 pDO432 를 *Hind* III (제철화학)와 함께 37°C에서 2시간동안 반응시키고, pBINAR과 pDO432 를 같은 조건에서 *Bam*H I (제철화학)과 함께 반응시킨 뒤 일부는 ligation에 이용하고 일부는 전기영동하여 완전히 반응이 되었는지 알아보고 (그림 4) ligation 반응에 사용한다.

3) Ligation of *Hind* III fragments and *Bam*H I fragments

위에서 얻은 fragment 들을 70 °C에서 10 분간 heating하여 제한효소들을 불활성화시키고 10 × bacteriophage T₄ DNA ligase buffer (제철화학) 2 μ l, bacteriophage T₄ DNA ligase (제철화학) 2 μ l, 10 mM ATP 2 μ l, 각각의 DNA 7 μ l 씩을 첨가한뒤 total reaction volume을 20 μ l 로 하여 4 °C에서 24시간 동안 반응을 시킨다. 반응이 끝난 뒤 ligation mixture 를 전기영동하여 ligation 여부를 확인한다.

4) Transformation of ligation mixture into *E. coli* host TGI

Competent cell 을 준비하고 *E. coli* host TGI 에 transformation 시킨 뒤

(Maniatis 등. 1989) X-gal/IPTG 와 kanamycin (20mg/l)가 첨가된 배지에 spreading 하고 37°C에서 16시간 incubation 한다.

5) Selection of recombinant DNA

가) pBIN19, pDO432-*Hind* III의 경우

X-gal / IPTG 와 kanamycin이 첨가된 배지에서 형성된 white colony를 선발하여 이것을 다시 ampicilin이 첨가된 배지에 patching 한 뒤 이 배지에서 사는 colony를 마지막으로 선발한다. 여기서 선발된 colony에서 DNA를 분리하여 *Hind* III로 반응을 시킨 뒤 전기영동하여 우리가 원하는 fragment가 삽입되어 있는지 확인한다(그림 5)

나) pBinAR, pDO432 - *Bam* HI의 경우

X-gal / IPTG 와 kanamycin이 첨가된 배지에서 형성된 white colony를 선발하여 이것을 다시 ampiciline이 첨가된 배지에 patching 한 뒤 이 배지에서 죽은 colony를 kanamycin이 첨가된 배지에서 찾는다. 여기서 DNA를 분리하여 *Bam* HI으로 반응시킨 뒤 전기영동하여 우리가 원하는 fragment가 삽입되어 있는 것을 선발한다(그림 7).

第3節 結果 및 考察

1. Digestion of pBIN19, pBINAR and pDO432 with Hind III and/or BamH I

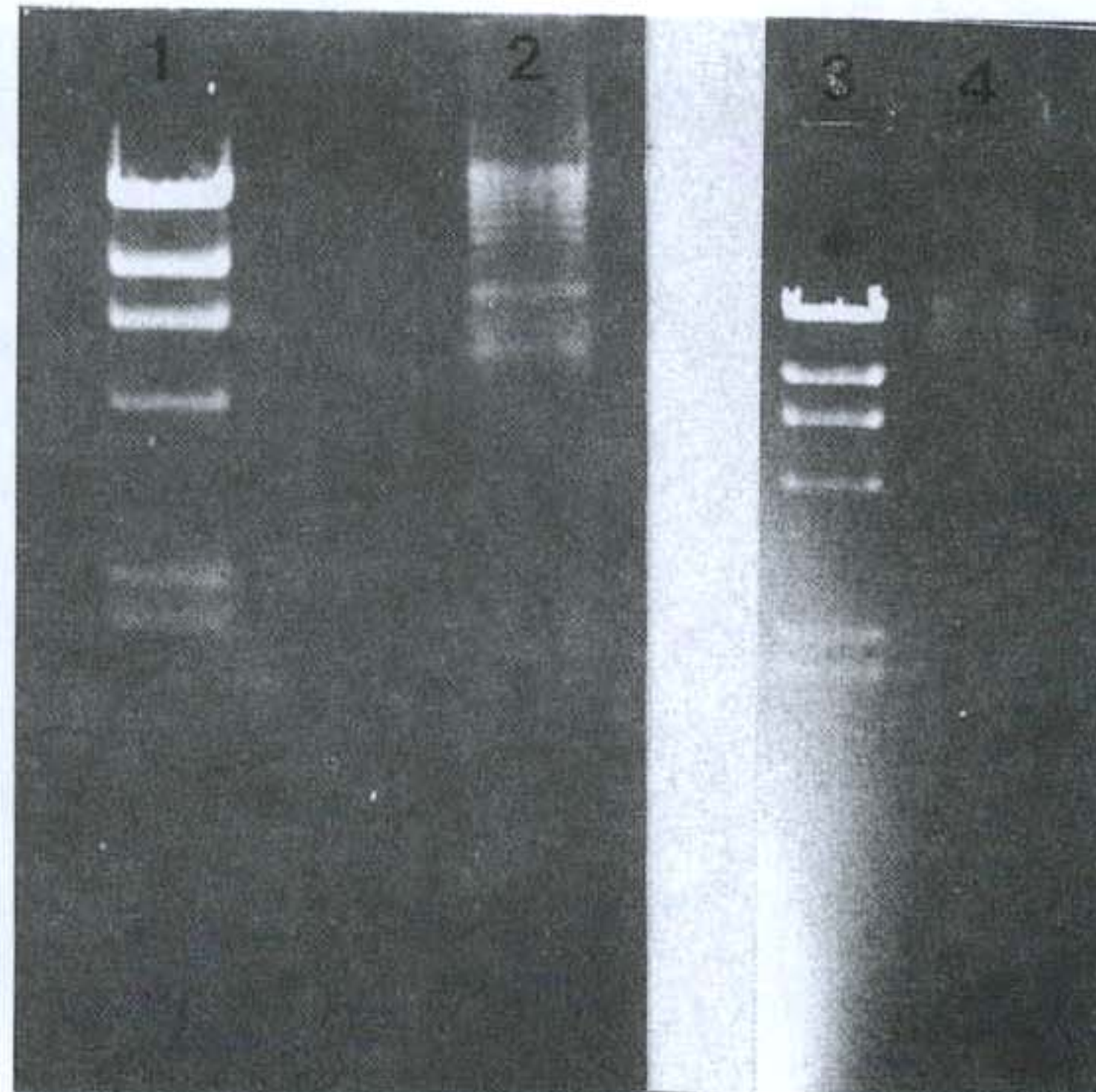
pBIN19은 polycloning site에 *Hind* III와 *Bam*H I restriction site가 있기 때문에 제한효소 *Hind* III와 *Bam*H I로 반응을 시키면 10.0kb자리에 하나의 band를 나타낸다. pBINAR의경우에도 pBIN19처럼 하나의 band를 나타내지만 pBINAR은 pBIN19에 35s promoter와 ocs terminator를 삽입시킨 것이기 때문에 길이는 10.7kb를 나타낸다. pDO432는 전체길이가 7.3kb로 *Hind* III site 하나와 *Bam*H I site 두개를 가지고 있기 때문에 *Hind* III와 반응을 시켰을 경우에는 7.3kb 자리에 하나의 band를 나타내며, *Bam*H I과 반응을 시켰을 경우에는 1.9kb와 5.4kb 두개의 band를 나타낸다. 이 두개의 band 중에서 1.9kb 크기의 fragment가 luciferase 유전자에 해당하는 부분이다(그림 1 참고).



(그림 3) Restriction patterns of pBIN19, pBINAR, pDO432
 lane 1 : λ - *Hind* III lane 2 : pBIN19 - *Hind* III
 lane 3 : pBIN19 - *Bam*H I lane 4 : pBINAR - *Hind* III
 lane 5 : pBINAR - *Bam*H I lane 6 : pDO432 - *Hind* III
 lane 7 : pDO432 - *Bam*H I lane 8 : λ - *Hind* III

2. Ligation of pBIN 19 · pDO432 - Hind III fragments and pBINAR · pDO432 - BamH I fragments

pBIN 19 · pDO432 - *Hind* III fragments와 pBINAR · pDO432 - *Bam*H I fragments를 각각 ligation시키면 그림에서 보는 바와 같이 agarose gel 상에서 끌리는 형태로 나타난다. 이러한 형태는 전형적인 ligation 반응에서 나타난다. 이 전기영동 결과로부터 ligation 반응이 성공적으로 이루어진 것을 알 수가 있다.



(그림 4) Electrophoresis of ligation mixture

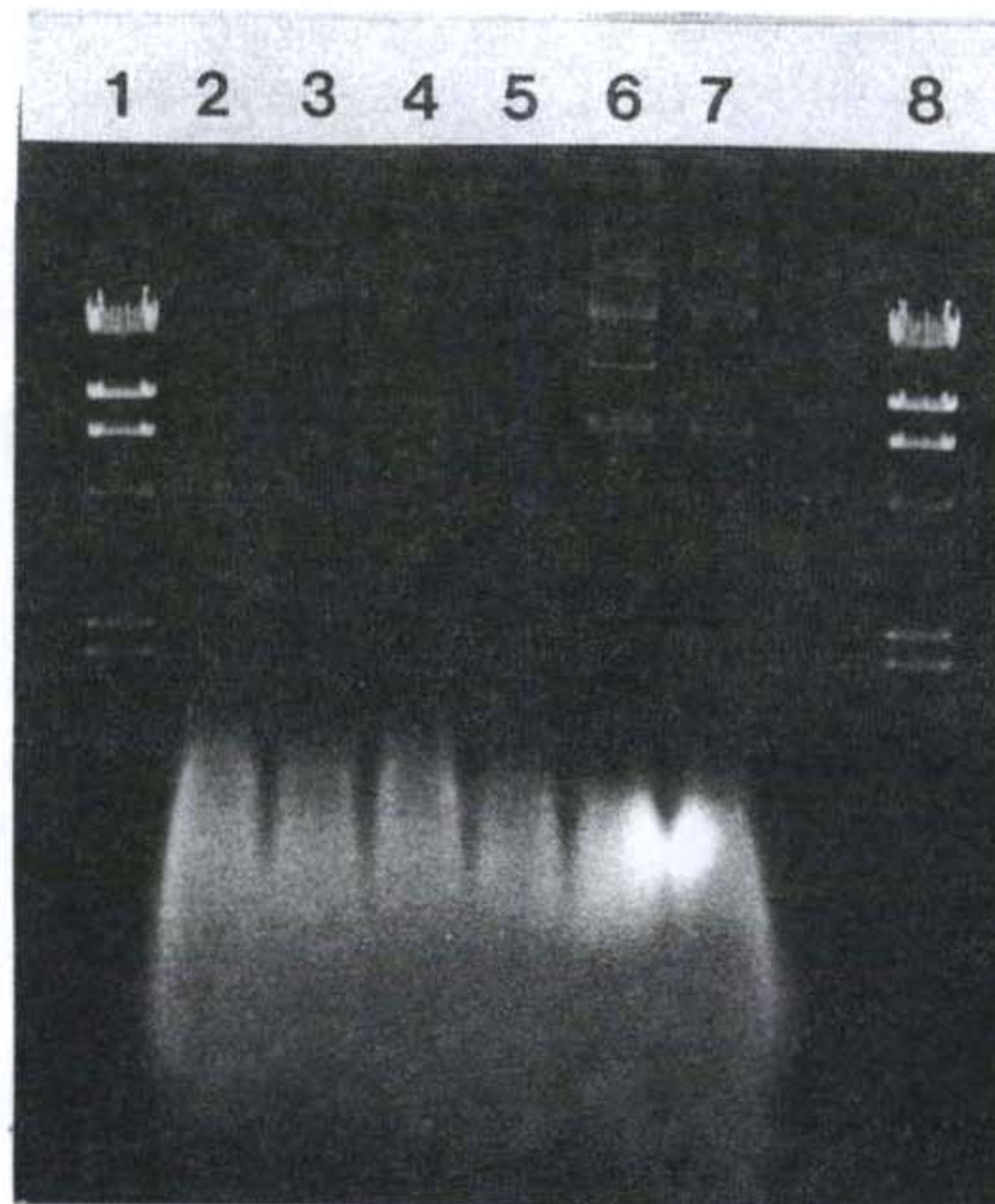
lane 1: λ - *Hind* III lane 2: pBINAR · pDO 432 - *Bam*H I
lane 3: λ - *Hind* III lane 4: pBIN 19 · pDO 432 - *Hind* III

3. Transformation of ligation mixture into E. coli host TG1

앞에서 반응이 끝난 ligation mixture를 Maniatis 방법에 따라 *E.coli* host TG1에 transformation 시켜 white colony와 blue colony들을 얻었다.

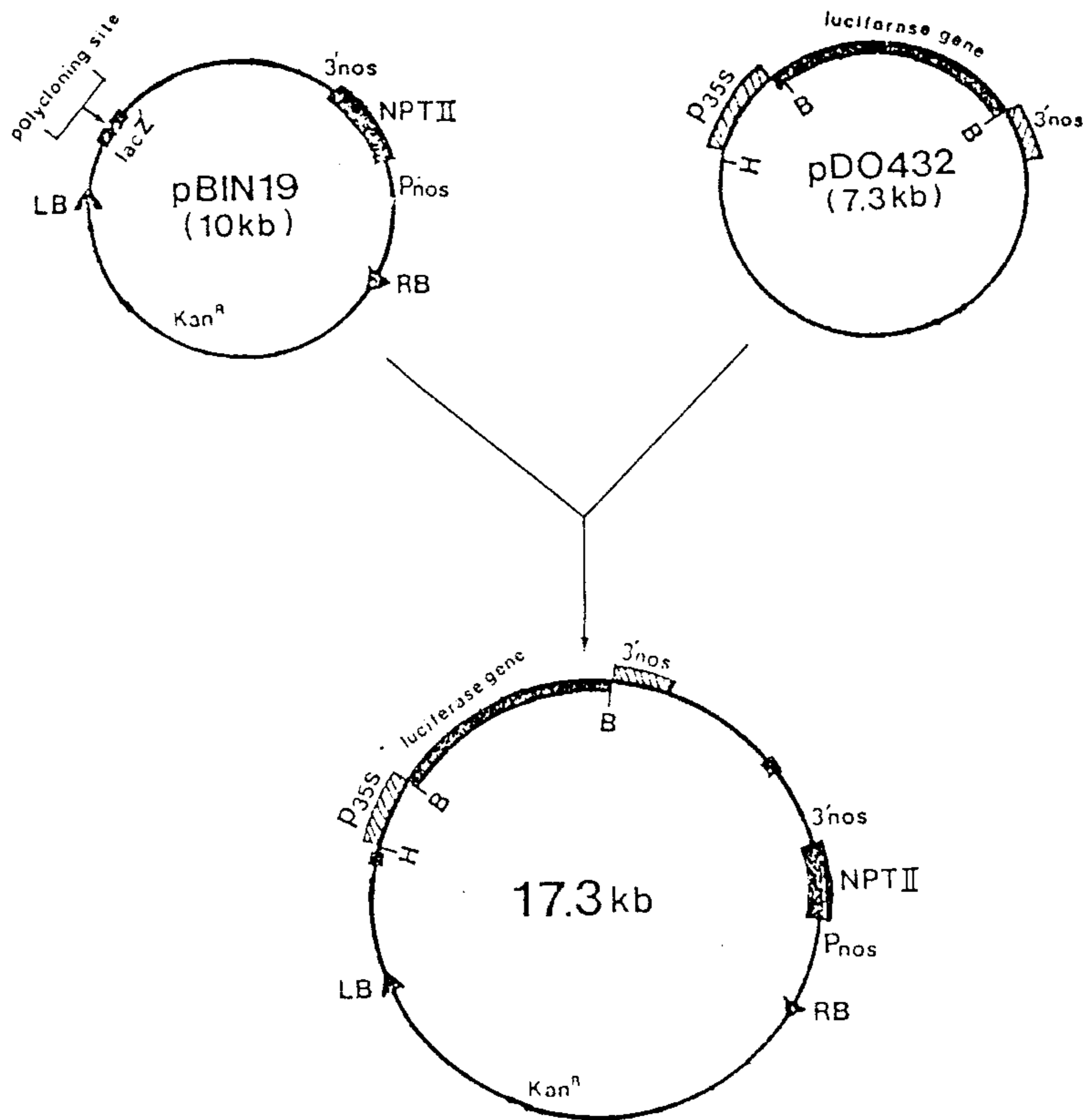
4. Selection of recombinant DNA

재료 및 방법에서 기술한 것과 같이 colony들을 선발하여 DNA를 분리한 뒤 *Hind* III로 반응을 시켜 그림 4와 같은 결과를 얻었다. 기대되는 band pattern은 10.0kb와 7.3kb에서 두개의 band를 얻는 것인데 lane 6과 7에서 원하는 band를 볼 수 있었다. 이 실험결과로 길이 17.3kb의 luciferase를 reporter 유전자로 갖는 binary vector를 얻을 수 있었다. 이렇게 하여 만든 17.3kb의 vector는 luciferase 유전자의 promoter로서 35s promoter를 가지고 있기 때문에 식물체의 어떤 조직에서도 그 발현이 가능하며 발현정도도 상당히 강하게 나타날 수 있을 것으로 생각된다 (Anderson, 1988). 그러나 이 vector를 intermediate vector로 사용하기에는 길이가 길어 다루기 힘들고 외부유전자를 받아들일 수 있는 용량도 작기 때문에 불필요한 부분을 제거한 보다 작은 크기의 vector를 만들었다.



(그림 5) Selection of 17.3kb binary vector

lane 1 : λ -*Hind* III
lane 2~7 : restriction pattern of selected colonies
lane 8 : λ -*Hind* III



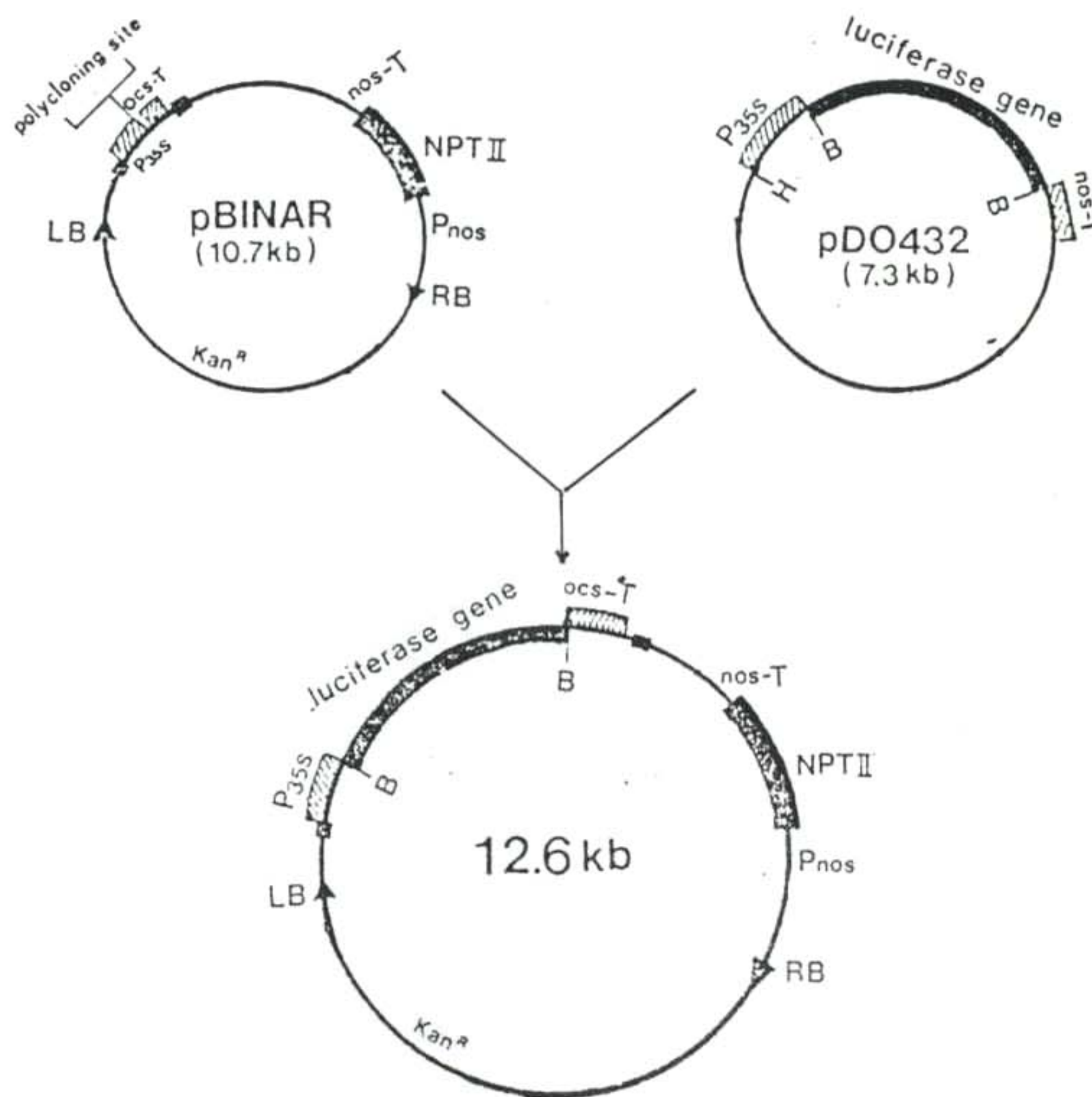
(그림 6) Diagram of 17.3kb binary vector containing luciferase gene as a reporter

pBINAR의 *Bam*H I fragment에 pDO432의 luciferase structure 부분을 (*Bam*-H I fragment) ligation시킨 것은 *Bam*H I과 반응시켰을 때 1.9kb (luciferase 유전자)와 10.7 kb (pBINAR의 *Bam*H I fragment) 크기의 두개의 band를 얻을 수 있다. 그림 5에서 보면 lane 6에서 두개의 band를 볼 수가 있다. 이 실험결과로 부터 12.6 kb 크기의, luciferase를 reporter 유전자로 갖는 intermediate vector를 만들 수 있었다. 이 vector는 앞의 것과 같은 promoter를 가지고 있으며 octopine synthase terminator를 가지고 있다. 외부 유용유전자의 수용능력도 상당히 커졌으며 크기가 작기 때문에 다루기 쉽다는 장점을 가지고 있다. 앞으로 보완해야 할 사항은 polycloning site를 삽입시켜 이용가능한 restriction site를 늘리는 것이다.



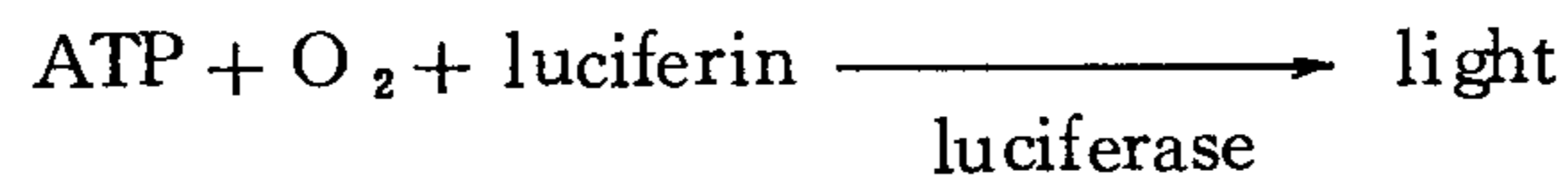
(그림 7) Selection of 12.6 kb binary vector

lane 1 ~ 4 : restriction pattern of selected colonies
 lane 5 : λ -Hind III
 lane 6 ~ 9 : restriction pattern of selected colonies



(그림 8) Diagram of 12.6 kb binary vector containing luciferase gene as a reporter

위와 같이 만들어진 plant expression vector가 지니고 있는 특성을 살펴보면 다음과 같다. Selection marker로서 neomycin phosphotransferase를 가지고 있어 형질전환시킨 식물체를 kanamycin이 첨가된 배지에서 선발할 수 있으며 screenable marker로서 luciferase를 가지고 있어 이것을 이용하여 여러가지 실험에 사용할 수 있다. Luciferase는 아래와 같은 반응을 통해 발광



을 하기 때문에 X-ray film에 감광을 시켜봄으로써 식물체의 형질전환 여부를 알아 볼 수가 있다. Luciferase를 reporter 유전자로 사용할 경우 가능한 분석방법은 다음과 같다.

① transient expression assay: promoter의 분석이나 식물체로 도입된 뒤에 유전자가 정상적으로 발현하는지 여부를 알아보고자 할 때 사용할 수 있다. 형질전환 후 24시간이 경과된 원형질체에서 단백질을 추출하여 luciferin과 반응을 시키고 luminometer로 peak intensity를 측정하여 이용한다.

② leaf luminescence assay: 분석하고자 하는 잎을 $2.5 \times 4.5 \text{ cm}$ 의 크기로 자른 뒤 luciferin 용액에 2시간 30분동안 담가둔 뒤 Kodak Ektachrome 200 film에 24시간 동안 노출시킨다.

③ whole plant assay: 분석하고자 하는 식물체에 1 mM luciferin 5 ml을 6시간동안 관수시킨 뒤 Kodak Ektachrome 200 film에 24시간 동안 노출시킨다.

④ microtiter dish assay: 액체현탁배양의 경우 배지 $200 \mu\text{l}$ 를 취해서 luciferin을 첨가한 뒤 X-ray film에 1시간동안 노출시킨다.

이와 같이 luciferase를 사용할 경우에는 여러가지 형태의 분석이 가능하

며 CAT assay보다 100 배 이상의 sensitivity를 얻을 수 있다. 이외에도 genetic cross의 marker로써 이용이 가능하며 여러 다양한 식물세포의 기능을 알아보기 위한 probe로써도 사용이 가능하다. 분석방법 또한 빠르고 쉬우며 많은 수의 형질전환체를 분석 할 수 있는 장점이 있다. 식물체의 형질 전환에서 단세포로부터 식물체를 유기시키거나 조직절편체로부터 분화가 잘되지 않는 경우 원형질체를 재료로 사용하는데 이같은 경우에 reporter유전자가 사용이 되며 이러한 목적으로 본 실험결과로 얻는 vector가 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

第4節 摘要

1. pBIN 19 과 pDO 432 의 *Hind* III fragment 를 ligation 시켜 17.3 kb 크기의 intermediate vector 를 만들었다.
2. pBINAR 과 pDO432 의 *Bam*H I fragment 를 ligation 시켜 12.6 kb 크기의 intermediate vector 를 만들었다. 이 vector 는 크기가 작고 다양하게 이용할 수 있는 luciferase 유전자를 reporter 유전자로 가지고 있어 식물체의 형질전환에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

引用文獻

1. An, G., et al. (1988) Organ specific and developmental regulation of the nopaline synthetase promoter in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol.* Vol. 88 : 547–552.
2. Bevan M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research.* 12 : 8711–8721.
3. Bevan, M. W., R.B. Flavell, and M.-D. Chiton. (1983) A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* Vol. 34 : 184–187.
4. Birnboim, H.C. and J. Doly. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research* Vol. : 1513–1523.
5. Daper, J., et al. (1988) Plant genetic transformation and gene expression (A laboratory manual). Blackwell.
6. Engerbrecht, J.M. Simon, M. Silverman. (1985) Measuring gene expression with light, *Science* Vol. 227 : 1345–1347.
7. Ow, D.W., et al. (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* Vol. 234 : 856–859.
8. Ow. D.W., J.D. Jacobs, and S.H. Howell. (1987) functional regions of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter determined by use of the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 84 : 4870–4874.
9. Rhim, S.L. (1989) Heterologe Expression eines Pflanzen-pathogen Ti-plasmids und Insekten-spezifischen Toxin-Gens von *Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis*. Doctorial thesis, University of Heidelberg.
10. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989) Molecular cloning (A Laboratory manual) 2nd edition Vol. 1.