

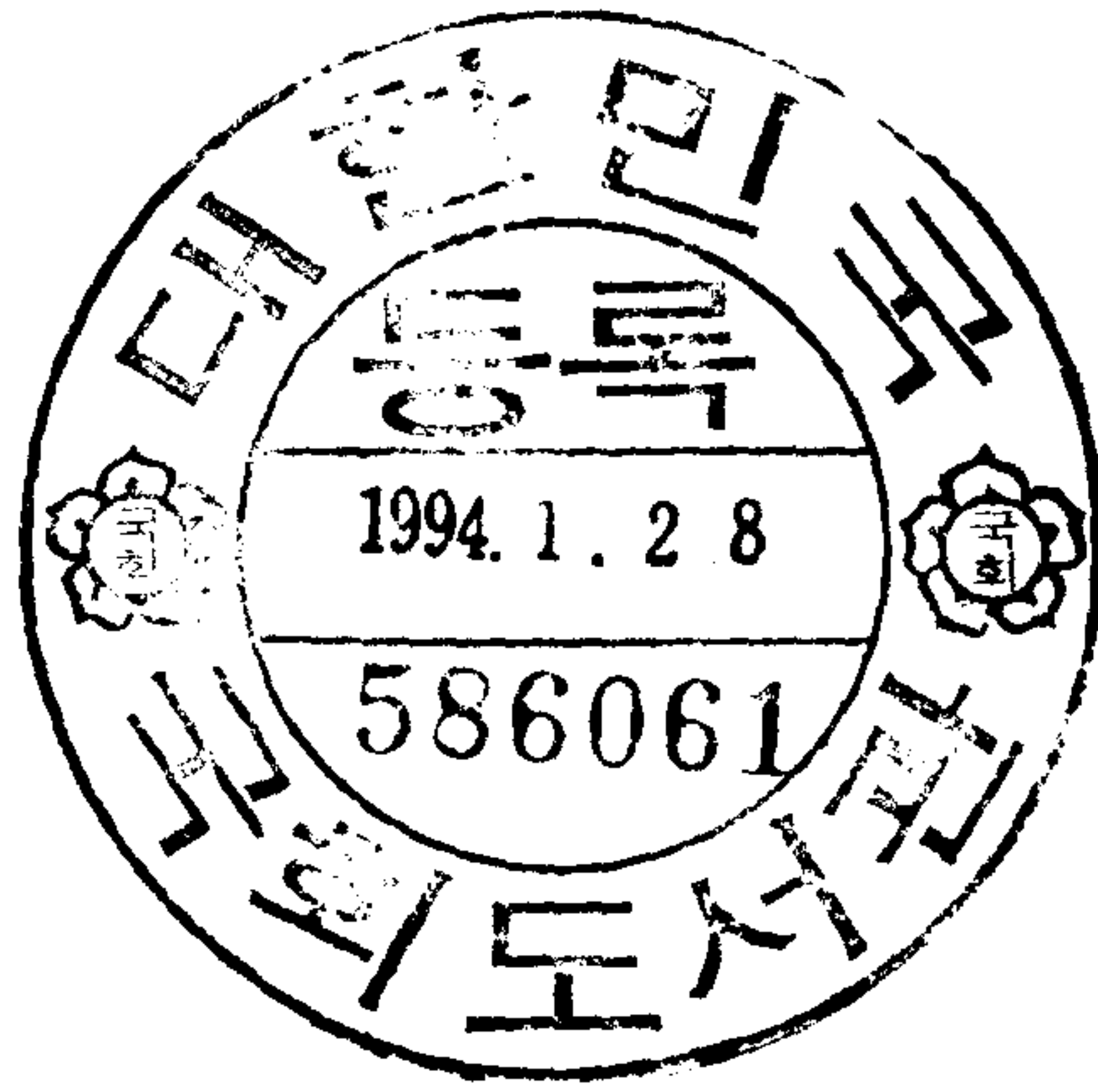
제 1 차년도  
연차보고서

# 생물공학에 의한 솔잎혹파리 내충성 소나무 육성

Development of pines resistant to pine gall midge by  
use of biotechnology

연구기관  
산림청 임목육종 연구소

과 학 기 술 처



# 제 출 문

## 과학기술처장관 귀하

본 보고서를 '생물공학에 의한 슬임 흑파리 내충성 소나무 육성' 사업의  
1차년도 보고서를 제출합니다.

1993. 10.

주관연구기관명: 임목육종연구소

총괄연구책임자: 이 석 구

연구원: 윤 양

연구원: 노 은 운

연구원: 손 성 호

연구원: 김 용 욱

연구원: 이 봉 춘

연구원: 문 흥 규

연구원: 조 재 창

연구원: 윤 창 훈

연구원: 최 민 일

협동연구기관명: 서울대학교

협동연구책임자: 이 돈 구

협동연구기관명: 한림대학교

협동연구책임자: 임 성 렬

# 요 약 문

## I. 제 목

생물공학에 의한 솔잎혹파리 내충성 소나무 육성

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

솔잎혹파리는 우리나라 산림의 가장 중요한 수종인 소나무와 해송을 가해하여 고사시킴으로서 우리나라의 산지를 황폐시키고 있다. 그 피해는 전국적인 것으로 솔잎혹파리에 의한 소나무의 고사현상이 이제는 강원도의 오지에까지 퍼져가고 있다. 그동안 이 피해에 대한 대책으로 내충성 임목의 선발, 천적인 먹좀벌의 방사 그리고 농약 살포 등이 이루어져 왔으나 환경에의 영향과 생태계의 균형등을 고려할때 한가지의 방법을 고집하기 보다는 다양한 접근을 통하여 이외 피해를 줄여야 할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구는 기본적으로 생물공학의 기법을 이용한 두가지 방향에서 접근하려 하였다. 그 첫째는 산지에서 선발한 내충성 개체를 조직배양 기법을 이용하여 대량증식 시키는 방법을 구명하는 연구이며, 둘째는 최근에 농작물에 응용되고 있는 식물유전공학 기법으로 식물형질전환을 위한 벡터 (vector)를 개발한 뒤 이를 이용하여 살충성 유전자를 임목의 세포에 삽입시킴으로서 이 유전자의 발현을 통하여 솔잎혹파리의 내충성 임목을 육성하려는 목적으로 시도되었다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구는 따라서 다음의 세 부분에서 동시에 실시되었다. 먼저 1차년도에 실험목표로서 설정된 것으로는; 첫째 내충성을 보이는 개체를 조직배양의 기법으로 대량증식시킬 수 있는 조건을 구명하는 것인데 이를 위하여 미성숙배, 성숙배, 유묘등의 조직에서 다경조직 유도를 통한 대량증식의 가능성을 연구하였다. 둘째 박테리아에서 추출한 살충성 유전자 (Bti)의 식물체로의 이식을 위한 식물형질전환 vector를 개발하는 실험은 T-DNA 벡터의 일종인 binary system을 이용하였는데 PCR로 증폭된 살충성 독소 유전자 (Bti)를 식물에서 발현되는 프로모터에 부착시키고 형질전환된 세포의 선발을 위하여 NPT 유전자를 T-DNA에 함께 집어 넣은 벡터를 개발하는 것을 목표로 하였다. 마지막으로 이 벡터를 이용하여 형질전환하기위한 전제조건인 세포로부터의 기관분화 조건을 구명하려하였는데 이를 위하여 미성숙배 등의 각종 조직과 다양한 호르몬조합을 비교 검토함으로써 적정 조건을 찾으려 하였다.

### IV. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

조직배양기법을 이용한 미숙배, 성숙배 및 유묘를 이용한 솔잎혹파리 내충성개체의 대량증식 실험결과는 다음과 같다.

성숙종자에서 배를 추출하여 사용한 경우 배 당 12-30 개 줄기가 유도되었으나 발근율은 10% 이하였다. 성숙목의 칩엽을 이용하여 대량증식을 시도하여 칩엽당 5 - 7 개의 줄기가 발생하였으나 오염이 심하였다. 유묘를 사용할 경우에는 약 50일된 시료에서 시료당 32 개 까지의 줄기가 유도되었다.

소나무형질전환을 위한 T-DNA 벡터 개발 실험 결과는 다음과 같다.

PCR 을 이용하여 Bti 의 Toxin coding 지역중 1.2 Kb를 증폭하여 pBG518에 cloning 하여 이를 pBti27 로 명명 하였다. 이것을 *Bam*H1/*Kpn*1 으 로 절단하여 pBinAR 에 cloning (pAR27 로 명명) 하였다. 여기에 enhancer sequence를 첨가하여 식물형질전환 vector pARENH 를 제조하였다.

소나무 형질전환을 위한 기초연구로서 세포로부터 기관분화 실험결과 는 다음과 같다.

성숙및 미성숙 종자에서 캘러그 를 유도 하였는데 세포증식은 배 유래 캘러스를 2, 4-D 0.5 mg/l + BA 0.1 mg/l 이 포함된 MS 배지에서 현탁배양하 였을때 양호하였다. 식물체 분화는 zeatin 처리구에서 관찰하였다.

## SUMMARY

### I. The title of project

Development of pines resistant to pine gall midges by use of biotechnology

### II. Objectives and importance

Pine gall midges have destroyed our pine forests for last two decades. The infestation has been so severe that dying forest can be found even in remote areas of Kangwon province. Many attempts have been made to curb this pest with different means such as chemical spray and use of natural enemy without noticeable success. Considering its impact on environment, chemical spray should be cautiously used in limited area. To our knowledge, it is desirable to combine several different means to protect our forest from the insects. In this study, we have used two different approaches to the problem. One of them is the micropropagation of pines resistant to the insect damage through tissue culture techniques. For the past 20 years, several tolerant individuals have been selected from the wild population and therefore available for the experiment. Another approach we are taking is the use of recently developed genetic engineering techniques. The gene producing toxin protein specific to diptera has been cloned and available to use. Several plant transformation vectors have also been developed using Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. Therefore, if the Bti toxin gene can be cloned into T-DNA vector, transformation of pines should be possible. However, the most difficult obstacle for

this approach has been thought to be lack of a reliable regeneration system from callus in the pine species.

Therefore, in the present study, we have attempted to develop suitable tissue culture techniques for micropropagation of pines, to construct T-DNA vectors carrying BtI toxin protein gene for pine transformation, and to find out the appropriate regeneration condition from callus of pines.

### III. Contents and ranges of the research

In the present, three different kinds of experiments were done simultaneously to save time. First, for the development of micropropagation system with pines, embryos ( both immature and mature ) and seedlings at different developmental stages were tested. The optimal conditions (both environmental and hormonal) were examined. Second, Bti toxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* was amplified through PCR technique and cloned into binary T-DNA vector system for pine transformation.

Third, attempts were made to regenerate shoots from calli of different tissue origins with various combination of hormones.

### IV. Results and their applications

For the development of micropropagation from pines, several different tissue sources were tested. Embryos from mature seeds produced 12 to 30 shoots when the tissues were cultured on MS medium containing 0.01 mg/l NAA and 10.0 mg/l BA. Needle fascicles from



mature trees were also tested with GD medium with several different combinations of BA and NAA. Although they produced 5 to 7 shoots per explants, many of them were contaminated by fungi they carried. Young seedlings of age up to 7 weeks were tested and found to produce up to 32 shoots per explants.

For the construction of pine transformation vector, Bti toxin protein coding gene was cloned into pBG518 after amplification through PCR. The new recombinant plasmid, pBti 27, were tested for cytotoxicity and confirmed as the gene was expressed in transformed E. coli. pBti27 were then cut with two restriction enzymes, *Bam*HI and *Kpn*I, and subcloned into pBinAR. The final plant transformation vector, pARENH, was completed by inserting an enhancer sequence into upstream of promoter in pAR27.

For regeneration of shoots from callus, several different tissue sources were tested. First, cell suspension cultures were tried to find out conditions for optimal cell proliferation. MS medium with 0.5 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l BA was the best in cell growth. Shoot regeneration was achieved on callus derived from the cell suspension culture, although the frequency of the regeneration was very low. The results suggest that younger tissues be better in organogenic response than older tissues.

## Contents

|   |    |
|---|----|
| General summary in English  |    |
| Chapter 1. General Introduction .....   | 1  |
| Chapter 2. Micropropagation of pines resistance to<br>pine gall midge by tissue culture .....                   | 5  |
| Summary in English .....  | 6  |
| I. Introduction .....   | 6  |
| II. Materials and methods .....   | 9  |
| III. Results and Discussion .....   | 11 |
| IV. Summary in Korean .....   | 16 |
| Literature cited .....  | 17 |
| Chapter 3. Development of T-DNA vector for pine<br>transformation .....   | 19 |
| Summary in English .....  | 20 |
| I. Introduction .....   | 20 |
| II. Materials and methods .....   | 23 |
| III. Results and Discussion .....   | 29 |
| IV. Summary in Korean .....   | 33 |
| Literature cited .....  | 34 |
| Fig .....   | 37 |
| Chapter 4. Development of Shoot regeneration<br>system from pine cell culture for<br>plant transformation ..... | 46 |
| summary in English .....  | 47 |
| I. Introduction .....   | 47 |

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| II. Materials and methods .....   | 49 |
| III. Results and Discussion ..... | 50 |
| IV. Summary in Korea .....        | 55 |
| Literature cited .....            | 56 |
| Fig .....                         | 58 |

# 목 차

|   |    |
|---|----|
| 제 1 장 서 론 .....                         | 1  |
| 제 1 절 연구개발의 목적과 범위 .....                | 1  |
| 제 2 장 조직배양에 의한 솔잎혹파리 내충성 개체의 대량증식 ..... | 5  |
| 제 1 절 서 론 .....                         | 6  |
| 제 2 절 재료 및 방법 .....                     | 9  |
| 제 3 절 결과 및 고찰 .....                     | 11 |
| 제 4 절 적 요 .....                         | 16 |
| 참 고 문 헌 .....                           | 17 |
| 제 3 장 식물형질전환을 위한 T-DNA 벡터 개발 .....      | 19 |
| 제 1 절 서 론 .....                         | 20 |
| 제 2 절 재료 및 방법 .....                     | 23 |
| 제 3 절 결과 및 고찰 .....                     | 29 |
| 제 4 절 적 요 .....                         | 33 |
| 참 고 문 헌 .....                           | 34 |
| 그 립 .....                               | 37 |
| 제 4 장 식물체 분화 및 형질전환 .....               | 46 |
| 제 1 절 서 론 .....                         | 47 |
| 제 2 절 재료 및 방법 .....                     | 49 |
| 제 3 절 결과 및 고찰 .....                     | 50 |
| 제 4 절 적 요 .....                         | 55 |
| 참 고 문 헌 .....                           | 56 |
| 그 립 .....                               | 58 |

# 제 1 장 서론

## 제 1 절 연구개발의 목적과 범위

소나무속은 세계적으로 아한대에서 아열대까지 걸치는 광대한 지역에 분포하고 있으나 대부분의 경우 각 종마다 그 분포가 매우 국지적이어서 어느 한 수종이 전 세계에 고루 걸쳐서 자라는 경우가 거의 없다. 미국의 경우 서쪽 해안에 몬티콜라 소나무 (*Pinus monticola*), 램베르티아 소나무 (*Pinus lambertiana*), 캐나다와의 접경지역 및, 오대호 부근에 방크시아나 소나무 (*P. banksiana*) 와 레지노사 소나무 (*P. resinosa*), 동북부에 스트로부 소나무 (*P. strobus*), 남부 모든 지역에는 에키나타 소나무 (*P. echinata*) 등 그 지역을 대표하는 소나무 종이 자라나고 있으며 유럽의 경우에도 북부, 남부 지중해 지역등 각 지역의 기후 특성에 맞는 종들이 자라고 있다. 극동지역의 경우 소나무 (*P. densiflora*), 해송 (*P. thunbergii*) 등이 한국과 일본에 걸쳐서 생육하고 있으며 잣나무 (*P. koraiensis*)가 한반도에서 만주에 이르기 까지 분포하고 있다. 이들은 대부분이 천연갱신에 의하여 성립되는 중요수종으로 경제적으로 목재 및 펄프원료로 사용된다. 소나무는 가공성이 좋아 그 용도가 다양한데 주로 건축, 토목, 가구, 차량, 기구, 포장, 교량, 펄프용으로 많이 쓰인다. 수피에서 탄닌이 채취되며, 송진은 식용 및 공업원료로 쓰인다. 그런데 소나무는 대체로 척박하며, 건조하고 바람 이 강한 곳에 많이 성장하기 때문에 소나무가 척박한 땅을 좋아하는 것으로 잘못 생각하는 경우가 많으나, 실제로는 지력이 좋은 곳에서 더 잘 자란다. 다만, 지력이 좋은 곳에서는 잡관목이 무성하여 소나무가 이들 잡목에 피압되어 잘 자랄수 없기 때문이다. 소나무중 형질이 가장 뛰어난 강송을 경제수로 조림장려하고 있으며, 이의 보급을 위하여 전국에 시험식재하고 있다. 이렇게 척박지등에서 잘 자라서 우리의 산림에 뿌리를 내린 소나무에서의 문제점은 이것이 솔잎혹파리에 약하다는 것이다.

솔잎 혹파리는 분류학적으로 파리목 (Diptera), 파리아목 (Nematocera), 혹파리과 (Cecidomyiidae)에 속해있으며, 학명은 *Thecodiplosis japonensis* U. et I. 이다. 이 해충은 우리나라 에서 발병되고 있는 삼림해충 중에서 가장 심각한 피해를 주

고 있는 것중 하나이며, 방제에 있어서는 가장 어려운 해충으로서, 우리나라 뿐만 아니라, 일본, 미국, 체코등 몇 나라에서만 분포 발생하고 있다. 솔잎혹파리는 1년에 1회 발생하여 유충 상태로 땅속 1- 2cm 및 낙엽등의 부식물 속에서 월동하며 성충은 월동장소에서 5월 상순부터 7월 하순에 걸쳐서 우화 하는데, 우화 최성 기는 6월 상순이다. 본 해충의 번식인자는 다른 곤충 경우와 같이 바람, 하류, 인위적인 요인을 들 수 있으며, 제한인자로는 산악, 하천, 사막(무림복지)등을 들 수 있다. 소나무에 직접적인 피해는 6월 상순부터 하순에 걸쳐서 부화해서 나오는 유충들이며, 피해를 받은 솔잎은 7월경부터 성장이 정지되고, 8월경에는 피해잎은 길이가 짧아지고 충영이 비대하여 저서 외부적으로 건전한 솔잎과 구별되며, 갈색으로 변한다. 우리나라에서 솔잎혹파리에 의한 피해는 이미 1929년 서울과 목포에서 처음 발견되어 현재까지 그 생태 조사와 임업적 방제를 비롯한 각종 방제실험에도 불구하고, 구제효과가 미소하여 1960년부터는 전국의 삼림으로 확대 되었다. 이 해충에 의한 소나무 및 해송의 피해상황을 보면, 솔잎혹파리 피해가 처음 발견 된지 3년후인 1932년에는 발생지 중심으로 36, 585ha에 이르는 피해가 있었으며, 1942년에는 6만여 ha에 달하게 되었고, 1948년에는 전남지역에서 만도, 106천ha에 이르게 되었다. 그리고, 1988년까지의 이 해충의 발생면적을 보면 무려 321천ha에 이르러 전체 곤충에 의한 피해면적의 대부분을 차지하고 있는 것을 알수 있다. 또한 최근의 자료에 의하면, 다른 해충에 의한 피해는 어느 정도 방제 가능성이 있는 것으로 보고되고 있으나, 솔잎혹파리의 피해는 계속 증가추세에 있다는 보고이므로 앞으로, 이 해충의 발생과 피해는 더욱 늘어날 전망이다. 본 해충의 방제는 이 해충의 독특한 생태학적 특성 때문에, 다른 해충의 방제에서와 같은 종래의 화학적인 방법으로는 뚜렷한 방제효과를 얻을 수 없으므로, 유전공학적인 방법에 의하여, 소나무의 형질을 전환시켜, 솔잎 혹파리에 살충성을 지니는 새로운 품종의 소나무를 개발하고자 한다. 이러한 소나무의 품종 개량은 우리나라의 역사적 의미에 있어서도, 매우 중요한 일이라 할수 있다. 특히, 자연 생태계의 보호 및 식수원의 보호, 화학살충제의 과다한 살포에 의한 생태계의 파괴, 그리고 산업 발달에 따른 공해

문제등 자연환경에 대한 국민의식이 고조되어진 점을 감안하여 볼 때에, 이러한 연구는 매우 시기 적절할 뿐만 아니라, 필요한 일이라 하겠다.

지금으로부터 15 년전 부터 본 연구소에서는 솔잎혹파리의 피해를 받은 산지에서 살아남는 개체를 선발함으로써 솔잎혹파리 내충성 개체를 육성하려고 시도하여 왔다. 따라서 여기에서 선발된 내충성 후보 개체를 대량 증식시킬 수 있는 방법을 개발하는 것도 솔잎혹파리에 대한 피해를 예방하는 한 가지 방법이 될 수 있다.

최근 분자생물학의 발달은 제한적이기는 하지만 유전자를 어느 개체에서 분리하여 다른 개체로 옮길 수 있으며 적절한 DNA의 조작으로 이러한 외래 유전자의 안정된 발현이 가능함이 이미 상당수 보고되고 있다. 특히 토양 박테리아인 *Bacillus thuringiensis*의 여러 strain에서 특정 그룹의 곤충을 죽이는 살충성 단백질이 생산됨이 보고된 이래 이 박테리아를 이용한 생물 농약이 이미 시판 단계에 와 있는 실정이다. 이 독소단백질들의 가장 큰 강점은 target이 되는 곤충의 범위가 지극히 제한되어 있고 각 곤충의 life cycle 중 일부분에만 영향을 끼치기 때문에 생태계에 큰 영향을 끼치지 않는다는 점이다. 이것은 이 독소단백질들이 pH 8 이상의 환경에서 여러 조각으로 분리되어 그 조각들이 체내의 여러 대사작용을 방해하기 때문으로 생각되는데 이러한 알칼리성 환경이란 동물의 경우 유충기의 곤충의 위에서만 나타나기 때문에 산성을 보이는 사람이나 다른 동물들에는 거의 해가 없는것으로 알려지고 있기 때문이다. 특히 이 독소단백질들은 그 것을 만드는 유전자의 DNA 염기배열이 여러 strain의 박테리아에서 이미 보고되어 있어서 이 유전자를 식물체에 삽입시키는 실험이 이미 상당수 보고되었다. 1983년 최초로 아그로박테리아를 이용하여 외래 유전자를 식물에 삽입시켜 그 발현이 보고된 이후로 이 아그로박테리아를 이용한 식물형질전환 벡터가 여럿 보고되고 있다. 이것은 아그로박테리아의 Ti plasmid라는 큰 DNA 안에 식물로 들어가는 부분의 DNA (T-DNA)가 이 T-DNA의 경계지역 sequence와 T-DNA 외부에 있는 vir regulon 만의 작용으로도 가능한 사실을 이용하여 만들어지고 있는데 대부분의 경우가 T-DNA 내부의 tumor를 유발시키는 hormone 합성 유전자를 제거하여 정상적인 식물

체 재생을 가능케 한 것들이다. 특히 외래 유전자가 식물체에서 발현되게 할 수 있는 여러가지의 프로모터와 가나마이신, 하이그로마이신등의 형질전환된 세포를 선발할 수 있게하는 항생제 저항성 유전자들이 여러가지 나와 있기 때문에 이러한 유전자들과 살충성 독소 단백질을 만드는 유전자를 이러한 벡터에 함께 끼워 넣는다면 이를 이용한 소나무류의 형질전환 벡터의 개발이 가능하게 될 것이다.

그러나 대부분의 식물의 경우가 그렇듯이 이러한 실험의 가장 큰 걸림돌은 세포에서의 식물체 재생이 어려운 점이다. 지금까지 담배등의 몇가지 식물에서만 집중적으로 형질전환의 보고가 나온 것도 식물체 재생의 문제 때문에 이러한 기법을 다른 여러 중요 식물에 적용하지 못하고 있는데 그 원인이 있다. 소나무속의 경우 이 부분은 최근까지 세포에서의 식물체 재생이 거의 불가능한 것으로 생각되었으나 최근 전나무류, 가문비나무류의 잇단 성공으로 그 가능성이 엿보이고 있다. 특히 미숙배등의 조직을 사용함으로써 재생능력이 높은 조직에서 유래한 세포에서의 식물체 재생을 시도한다면 소나무에서의 형질전환도 가능하리라 생각된다.

따라서 본 연구는 솔잎혹파리에 대한 내충성 소나무 육성을 위하여 첫째 이미 선발된 내충성 후보목을 조직배양의 기법으로 대량증식시키며, 살충성 유전자를 이용하여 소나무 형질전환 벡터를 만든 후 이를 이용하여 소나무에 살충성 유전자를 이식시켜서 이 외래 유전자의 발현을 통하여 솔잎혹파리 내충성 소나무 및 해송을 육성하는데 있다.



**제 2 장   솔잎 흑파리 내성 개체의  
조직배양에 의한 증식**

## Summary

This study was conducted to find out the optimal conditions for micropropagation of pines selected from wild population. The selected individual were thought to have some tolerance or resistance to infestation by pine gall midge. Embryos (both mature and immature), needle fascicles, and several week old seedlings were tested on MS or LP media containing various different combination of cytokinin and auxin.

The results obtained were as follows:

1. Embryos from mature seeds produced 12 to 30 shoots when the tissues were cultured on MS medium containing 0.01 mg/l NAA and 10.0 mg/l BA.
2. Needle fascicles from mature trees were also tested with GD medium with several different combinations of BA and NAA. Although they produced 5 to 7 shoots per explants, many of them were contaminated by fungi they carried.
3. Young seedlings of age up to 7 weeks were tested and found to produce up to 32 shoots per explants.

## 제 1 절 서 론

조직배양 방법에 의한 소나무 속의 대량증식은 그동안 여러 종을 대상으로 보고된 바 있다. 대부분의 경우 종자에서 배(embryo)를 분리한 후 이를 식물생장호르몬이 함유된 배지에서 다경조직을 유도한 후 식물생장호르몬이 없는 배지에 옮기므로써 유도된 다경조직을 신장시키고 이들을 분리하여 각각 발근 유도하는 방법을 쓰고 있다 (Sommer 등 1975, Webb 과 Santiago 1985, von Arnold 와 Erickson 1980, Noh 등

1988). 이러한 류의 실험에 가장 많이 이용된 소나무는 라디아타 소나무로서 이 소나무의 경우 비교적 큰 종자를 가지고 있으며 시험관내의 반응도 뛰어나기 때문에 침엽수 조직배양의 모델 시스템으로 여겨지고 있다(Aitken 등 1981). 다른 소나무들도 이와 비슷한 반응을 보이고 있는것으로 보고되고 있다. 1975년 Cheng 등이 침엽으로부터 기관의 분화가 가능함을 증명한 이래 조직배양을 통한 우량 임목의 대량증식의 시도는 세계 각지의 수 많은 실험실에서 행해져 왔다. 지금까지의 결과를 되 돌아 보면 배(embryo)를 이용한 방법 외에는 별로 성공적인 보고가 없는 실정이다. 배 배양의 경우는 비교적 고농도의 cytokinin과 저농도의 auxin 을 배지에 첨가하여 배에서 다경부정아(multiple adventitious shoots)를 유도하는 방법이 대부분으로 다음의 수종에서 성공의 보고가 있다. 라디아타소나무 (*Pinus radiata*: Aitken 등 1981), 팔루스트리스 소나무 (*P. palustris*: Sommer 등 1975), 카리비안 소나무 (*P. caribaea*: Webb 과 Santiago 1983), 몬티콜라 소나무 (*P. monticola*: Mott 와 Amerson: 1981), 스트로부스 잣나무 (*P. strobus*: Minocha 1980) 폰데로사 소나무 (*P. ponderosa*: Ellis 와 Bilderback: 1984), 콘볼타 소나무 (*P. contorta*: von Arnold 와Ericksson 1980), 레지노사 소나무 (*P. resinosa*: Noh 등 1988). 그러나 라디아타 소나무를 제외하고는 대부분의 경우 매우 제한적인 성공을 보이는데 그 이유는 이렇게 유도된 줄기에서의 발근 유도가 쉽지 않기 때문이었다.

국내에서는 테다소나무와 리기테다 소나무의 배 배양에 의한 다경조직유도가 보고되고 있으나 소나무, 해송 그리고 잣나무의 경우는 기관분화가 매우 어려워 아직 성공된 적이 없는 실정이다. 그 이유는 여러가지로 추측되지만 첫째 이들이 시험관내의 반응이 느리거나 반응을 아예 보이지 않고 고사하는 점으로 미루어 이미 발표된 다른 소나무류에서 적용된 배양조건으로는 성공하기가 어렵기 때문일 것으로 생각된다.

배 배양과는 대조적으로 성숙목의 침엽을 직접 배양하여 완전한 개체를 얻어 내려는 시도가 종종 보고되고 있는데 그 예로써 박 등 1984, Horgan 과 Aitken 1982, Borman 과 Jansson (1980) 등이 최초로 구주소나무 (*Pinus sylvestris*)의 침엽을 배양

한것을 들수있다. 그 결과 발근 및 캘러스 유도에는 별 문제가 없었으나 줄기 유도는 매우 어려운 것으로 나타나고 있다. 이 방법은 침엽의 기저 부근의 분열조직에서 줄기를 유도하려는 시도로서 보통 전처리로 싸이토키닌을 며칠 간격으로 여러번 분무한 후 이를 채취하여 배양하는데 시료의 야외 채취에서 오는 오염이 큰 문제이며 성숙조직을 이용하기 때문에 반응이 느리거나 약하기 때문에 실제 증식에는 아직은 적합하지 못하다는 결점이 있다.

위의 배 배양 및 성숙목의 침엽 배양 방법 외에도 캘러스를 이용하는 방법은 상당한 잠재력을 지니고 있다. 그 이유는 첫째 캘러스의 생장이 다른 배양 방법에 비하여 비교적 빠르고 여러 조직에서 캘러스 유도가 가능하기 때문이다. 이 방법의 또 하나의 강점은 캘러스 배양 방법을 이용하여 외래 유전자 삽입이 가능하며 변이체 선발이 세포 수준에서 가능하게 된다는 점이다. 그러나 이 방법의 단점은 아직 캘러스에서 줄기를 유도하여 완전한 식물체로 이르는 부분의 경로가 아직은 밝혀져 있지 않기 때문에 현단계로서는 이의 해결이 급선무인 실정이다. 그러나 침엽수내에서도 전나무, 가문비 나무류에서 캘러스를 통한 식물체 발생이 속속 보고되고 있으므로 소나무류에서도 이의 실현이 가능함을 보여주고 있다.

캘러스 단계를 통한 대량증식은 캘러스의 급속증식은 가능하나 여기에서 줄기 유도의 빈도가 높아야만 실용적인 가능성을 이야기 할 수 있을 것이다. 현재까지 캘러스 유도 및 생장에 관한 성공적인 예가 상당수 보고되었으나 이 캘러스로 부터의 식물체 재생은 아직은 어쩌다가 나타나는 현상 정도로 그 발생 빈도도 낮고 그렇기 때문에 이에 관한 적정 조건도 전혀 어떠한 경향치를 판단할 수 있는 정도에 미치지 못하고 있는 실정이다.

따라서 본 실험의 목적은 성숙종자, 미성숙종자, 유묘, 성숙묘의 침엽 등을 이용하여 배 배양 및 캘러스 배양 기법으로 이미 선발된 내충성 후보목을 대량 증식하는 조건을 구명하기 위하여 시도되었다.

## 제 2 절 재료 및 방법

Open pollination된 해송의 미숙속 종자를 채취하여 2% 차아염소산 용액으로 표면을 살균한 후 멸균수로 3회 수세한 다음 무균상에서 종피와 배유를 제거하고 배를 캘러스 증식배지인 2,4-D 1.0 mg/l, BA 0.4 mg/l, kinetin 0.4 mg/l 가 포함된 MS 배지에 치상하여 캘러스 발생을 유도하였다.

배 유래 캘러스의 증식을 위해서 2,4-D, NAA, BA 조합의 MS 배지에서 세포현탁배양을 실시하였다. 배양 한달 후 각각의 packed cell volume을 측정하여 ANOVA를 실시하였다.

또한 2,4-D(1, 3, 5, 7, 9 mg/l)와 BA (0.5, 1.0, 3.0, 5.0 mg/l) 가 함유된 1/2 MS 고체배지에서 배 유래 캘러스의 증식을 조사하였다. 직경 0.5 cm 정도의 캘러스 덩이를 페트리디쉬당 5개씩 3반복 치상하였다.

증식배지에서 증식된 캘러스로부터 식물체 분화를 유기할 목적으로 여러가지 싸이토키닌이 단독 및 조합으로 포함된 MS 배지에 캘러스 덩이를 직경 0.5 cm의 크기로 조제하여 치상한후 배양 6주 후에 캘러스의 상태를 관찰하였다. 결과에 대한 경향치를 얻기위해 캘러스를 시험배지가 들어있는 페트리디쉬당 5개씩 8반복으로 치상하였다.

소나무 미숙종자를 일정 기간을 두고 채취하여, 배 만을 분리하여 오옥신, 싸이토키닌이 첨가된 LP 배지에 치상하여 캘러스를 유도하였다.

해송 미숙종자를 일정 기간을 두고 채취하여 LP 배지에 치상하여 캘러스를 유도하였다.

Table 1. Inorganic and organic constituents of the media used for *in vitro* culture of *Pinus densiflora* and *P. thunbergii*

| Constituents   | LP (mg/1) | MS (mg/1) |
|--|-----------|-----------|
| Inorganic  |           |           |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                  | 360.00    | 370.00    |
| CaCl <sub>2</sub>                                    |           | 440.00    |
| KNO <sub>3</sub>                                     | 1800.00   | 1900.00   |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                      | 400.00    | 1650.00   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 270.00    | 170.00    |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O | 1200.00   |           |
| FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                  | 30.00     | 27.80     |
| MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O                  | 100.00    | 0.83      |
| KI   | 0.08      |           |
| CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O                  | 0.025     | 0.025     |
| ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                  | 8.60      | 8.60      |
| CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O                  | 0.025     | 0.025     |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 6.20      | 6.20      |
| Na <sub>2</sub> -EDTA                                | 40.00     | 37.30     |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O   | 0.25      | 0.25      |
| Organic  |           |           |
| myo-inositol   | 100.00    | 100.00    |
| Thiamine HCl   | 0.40      | 0.10      |
| Pyridoxine HCl                                       | 0.10      | 0.50      |
| Nicotinic acid                                       | 0.10      | 0.50      |
| Glycine  |           | 2.00      |
| Sucrose  | 20,000    | 30,000    |
| Agar   | 7,000     | 7,000     |
| pH   | 5.5 - 5.6 | 5.5 - 5.7 |

### 제 3 절 결과 및 고찰

미성숙 종자에서 배를 채취하여 2,4-D 1.0 mg/l, BA 0.4 mg/l, cytokinin 0.4 mg/l가 포함된 MS 배지에 치상하여 배 유래의 캘러스를 얻었다. 유기된 캘러스를 동일 배지에 계대배양하여 식물체 분화를 위한 실험에 사용하였다.

배 유래 캘러스를 2,4-D 0.5, BA 0.1 mg/l 가 포함된 MS 배지에서 현탁배양하였을 때 가장 양호한 세포증식을 보였으며, Table 2은 현탁배양시 사용한 여러 식물 성장 호르몬에 따른 ANOVA 를 나타낸 것이다. 세포의 농도가 낮았을때 lag phase가 길어지면서 그 동안에 세포가 갈변하였다 (not showing data). 세포의 생장이 느린 침엽수의 세포배양에는 특히 세포의 초기 배양농도가 세포의 증식에 큰 영향을 미치는 것으로 보이며 해송의 경우, 5% v/v의 농도가 적당한 것으로 보인다.

Table 2. Effect of NAA and BA treatment before inoculative on shoot proliferation media having various levels of BA proliferation

| Level of BA<br>( mg/l ) | No. of shoot<br>Survived* | No. of Multiplied<br>Shoot | No. of Shoot showing<br>Multiplied Shoot(%)** |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|---|
| W/o Pre-treatment       |                           |                            |   |
| 0.5                     | 12***                     | 5                          | 6 (50.0)                                      |
| 1.0                     | 14                        | 5                          | 9 (64.3)                                      |
| 2.0                     | 9                         | 7                          | 4 (44.4)                                      |
| 4.0                     | 12                        | 10                         | 6 (50.0)                                      |

| Level of BA<br>( mg/l ) | No. of shoot<br>Survived* | No. of Multiplied<br>Shoot | No. of Shoot showing<br>Multiplied Shoot(%)** |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|---|
| W/o Pre-treatment       |                           |                            |   |
| 6.0                     | 13                        | 7                          | 8 (61.5)                                      |
| 8.0                     | 11                        | 3                          | 3 (27.3)                                      |
| 10.0                    | 13                        | 4                          | 4 (30.7)                                      |
| W/o Pre-treatment       |                           |                            |   |
| 0.5                     | 33                        | -                          | -   |
| 1.0                     | 13                        | -                          | -   |
| 2.0                     | 22                        | 1                          | 1 (4.5)                                       |
| 4.0                     | 26                        | 1                          | 1 (3.8)                                       |
| 6.0                     | 14                        | 3                          | 3 (21.4)                                      |
| 8.0                     | 22                        | 3                          | 4 (18.2)                                      |
| 10.0                    | 15                        | 5                          | 3 (13.3)                                      |

\* Total number of 60 explants were inoculated.

\*\* The percentage represents responding shoots per survived one.

\*\*\* All the data was collected after 12 weeks from initial culture.

Seedling의 연령에 따른 증식율은 발아 후 50일 된 explant를 사용하였을 때 83.3%의 explant에서 다경줄기가 유도되었으며 explant 당 평균 32개의 다경줄기가 증식되었다(Table 3). 시료의 연령이 낮을때 explant의 생존수가 낮은 것으로 보아 연령이 낮을수록 표면살균시 에타놀나 치아염소산에 의해 상처를 많이 받은 것으로 사료된다.



발아 50일 된 seedling의 경우는 100%의 생존율과 그 중 83.3 %의 explant에서 multiple가 발생하여 증식율과 생존율 면에서 볼때 explant의 연령은 발아 50일 된 것이 적합하다고 생각된다.

Table 3. Effect of explant age on shoot proliferation media having BA and NAA

| Ages of Explant(days) | No. of explant Survived* | No. of Multiplied Shoot | No. of Shoot showing Multiplied Shoot(%)** |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|--|
| 20                    | 9***                     | 8                       | 2 (22.2)                                   |
| 30                    | 11                       | 15                      | 8 (72.7)                                   |
| 40                    | 24                       | 30                      | 18 (75.0)                                  |
| 50                    | 30                       | 32                      | 25 (83.3)                                  |

\* Total number of 30 germinated seedlings were inoculated.

\*\* The percentage represents responding shoots per survived one.

\*\*\* All the data was collected after 6 weeks from initial culture.

Table 4. Callus induction from embryos of *Pinus densiflora* cultured on LP medium containing both BAP and 2, 4-D. Embryos at various developmental stages were collected and inoculated under dark condition. All the embryos were subcultured every two weeks since prolonging the period made both the embryos and resulting callus turn brown. The data were collected after 4 weeks in culture.

| Conc. of growth regulator (mg/l) | Date of collection | No. of embryo cultured | No. of calli induced |
|----------------------------------|--------------------|------------------------|----------------------|
| BAP 0.1 + 2, 4-D 0.2             | Aug. 9             | 18                     | 2                    |
| 0.1            2.0               |                    |                        | 10                   |
| 1.0            0.2               |                    |                        | 2                    |
| 1.0            2.0               |                    |                        | 3                    |
| BAP 0.1 + 2, 4-D 0.2             | Aug. 13            | 18                     | 4                    |
| 0.1            2.0               |                    |                        | 7                    |
| 1.0            0.2               |                    |                        | 0                    |
| 1.0            2.0               |                    |                        | 2                    |
| BAP 0.1 + 2, 4-D 0.2             | Aug. 17            | 18                     | 4                    |
| 0.1            2.0               |                    |                        | 14                   |
| 1.0            0.2               |                    |                        | 2                    |
| 1.0            2.0               |                    |                        | 10                   |
| BAP 0.1 + 2, 4-D 0.2             | Aug. 21            | 18                     | 4                    |
| 0.1            2.0               |                    |                        | 15                   |
| 1.0            0.2               |                    |                        | 9                    |
| 1.0            2.0               |                    |                        | 9                    |
| BAP 0.1 + 2, 4-D 0.2             | Aug. 31            | 18                     | 2                    |
| 0.1            2.0               |                    |                        | 13                   |
| 1.0            0.2               |                    |                        | 12                   |
| 1.0            2.0               |                    |                        | 4                    |

Table 5. Callus induction from embryos of *Pinus thunbergii* cultured on LP medium containing both BAP and 2,4-D. Embryos at various developmental stages were collected and incubated in the dark. All the embryos were subcultured every two weeks since prolonging the period made both the embryos and resulting callus turn brown. The data were collected after 4 weeks in culture.

| Conc. of growth regulator (mg/l) | Date of collection | No. of embryo cultured | No. of calli induced |
|----------------------------------|--------------------|------------------------|----------------------|
| BAP 0.1 + 2,4-D 0.2              | Aug. 25            | 18                     | 18                   |
| 0.1            2.0               |                    |                        | 18                   |
| 1.0            0.2               |                    |                        | 17                   |
| 1.0            2.0               |                    |                        | 18                   |
| BAP 0.1 + 2,4-D 0.2              | Sep. 4             | 18                     | 3                    |
| 0.1            2.0               |                    |                        | 7                    |
| 1.0            0.2               |                    |                        | 3                    |
| 1.0            2.0               |                    |                        | 8                    |
| BAP 0.1 + 2,4-D 0.2              | Sep. 17            | 18                     | 9                    |
| 0.1            2.0               |                    |                        | 18                   |
| 1.0            0.2               |                    |                        | 7                    |
| 1.0            2.0               |                    |                        | 18                   |

## 제 4 절 적요

본 연구는 산지에서 선발된 소나무의 대량증식을 위한 적정조건을 찾기위하여 수행 되었다. 채집된 각개체는 슬릿혹파리에 의한 피해에 저항성을 가진것으로 추정된다. 배 (성숙 및 미성숙), 침엽 그리고 발아한지 20, 50 일된 유묘를 사이토키닌과 옥신의 다양한 조합으로 조성된설계된 MS 및 LP 배지에서 시험한 결과를 다음과 같다.

1. 성숙 종자의 배는 NAA 0.01 mg/l 와 BA 10.0 mg/l 로 조합된 MS 배지에서 배양 되었을때 12 에서 30개의 줄기를 생산하였다.
2. 성숙목의 침엽을 BA 와 NAA의 다양한조합으로 된 GD 배지에 실험한 결과 절편 당 5 - 7개의 줄기를 생산했지만 대부분의 시료가 곰팡이에 의해서 오염되었다.
3. 7주 된 유묘는 절편당 32개의 줄기를 생산하였으므로 이와같은 방법을 이용 한다면 대량증식의 가능성이 높을 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Aitken J, KJ Horgan, and TA Thorpe. 1981. Influence of explant selection on the shoot forming capacity of juvenile tissue of *Pinus radiata*. Can. J. For. Res. 11:112-117
2. Bornman CH and E Jansson 1980. Organogenesis in cultured *Pinus sylvestris* tissue. Z. Pflanzenphysiol. 96:1-6
3. Burns JA., O. J. Schwarz, and SE. Schlarbaum (1991). Multiple shoot production from seedling explants of slash pine (*Pinus elliorrii*, Engel-m). Plant Cell Reports 10:439-443
4. Chang S., S. Sen, CR. McKinley, J. Aimers-Halliday, and RJ. Newton (1991). Clonal propagation of Virginia Pine (*Pinus virginiana* Mill.) by organogenesis. Plant Cell Reports 10:131-134
5. Ellis DD and DE Bilderback (1984) Multiple bud formation by cultured embryos of *Pinus ponderosa*. J. Plant Physiology. 115:201-204
6. Emily E. Chesick, Carl A. Mohn and Wesley P. Hackett (1991). Plantlet multiplication from white pine (*Pinus strobus* L.) embryos *in vitro* bud induction and rooting. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 26:107-114
7. Minocha PN (1980) Callus and adventitious shoot formation in excised embryos of white pine (*Pinus strobus*). Can. J. Bot. 58:366-370
8. Mott RL and HV Amerson (1981) Tissue culture plantlets produced from *Pinus monticola* embryonic materials. For. Sci. 27:299-304
9. Noh EW, SC Minocha, and DE Riemenschneider (1988) Adventitious shoot formation from embryonic explants of red pine (*Pinus resinosa*). Physiologia Plantarum 74:119-124

10. Von Arnold S and TC Ericksson 1980 In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. Can. J. Bot. 59:870-874
11. Webb DT and OD Santiago 1983 Cytokinin induced bud formation on caribbean pine (*Pinus caribaea* Morelet) embryos *in vitro*. Plant Sci. Lett. 32:17-21
12. Yiqun Lin, Michael R. Wagner and LJ. Heidmann 1991. *In Vitro* formation of axillary buds by immature shoots of Ponderosa pine. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 26:161-166
13. Horgan K. and J. Aitken. 1982. Micropropagation of mature radiata pine. Meeting of IUFRO Workshop. S. 2.02. Newzealand. November.
14. David, A. and H. David . 1979. Isolation and callus formation from cotyledon protoplast of pine (*Pinus pinaster*). Z. Pflanzenphysiol. 94:173-177
15. Kaul, K. 1987. Plant regeneration from cotyledon- hypocotyl explants of *Pinus strobus* L. Plant Cell Reports. 6:5-7
16. Kolevska-Pletikapic, B., S. Jelaska, and M. Vidakovic. 1983. Bud and shoot formation in juvenile tissue culture of *Pinus nigra*. Silvae Genetica. 32:115-119
17. Konar, RN, and MN Singh. 1980. Induction of shoot Buds from tissue culture of *Pinus wallichiana*. Pflanzenphysiol. 99:173-177
18. 박재인, 김재현, 이봉춘. 1984. 2년생 리기테다소나무엽속배양에 의한 식물체생산 임육연보. 20:102-107

### 제 3 장. BTI 유전자의 소나무 형질전환을 위한 T-DNA 벡터 개발

## Summary

For the construction of transformation vector, three main components are necessary. These include the gene of interest, promoter(s) for the expression of cloned gene and plasmid vector.

In the present study, a T-DNA vector carrying Bti toxin gene was constructed as follows. As a gene for pine transformation, a 1.2 Kb fragment of Bti toxin protein coding gene was cloned into pBG518 after amplification through PCR. The new recombinant plasmid, pBti 27, were tested for cytotoxicity using transformed *E. coli* (i.e. by the plasmid pBti27) and confirmed as the gene was expressed in human blood cell environment. The plasmid, pBti27 was then cut with two different restriction enzymes, BamH1 and Kpn1, and subcloned into pBinAR. The final plant transformation vector, pARENH, was completed by inserting an enhancer sequence into upstream of promoter in pAR27. The plasmid pARENH was then transferred to *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. This vector will be used for pine transformation.

## 제 1 절 서론

지금으로부터 10 년전 Murai 등 (1983)이 콩의 유전자를 담배에 삽입시켜 그 발현을 확인함으로써 식물유전공학 시대가 시작되었다. 이렇게 외래 유전자를 다른 개체에 삽입시켜 새로운 특성을 지니게 하는 것을 형질전환이라 한다. 식물의 형질전환을 위해서 그동안 여러가지 방법들이 사용되어왔고 아직도 새로운 시도가 끊이지 않고 있다. 이 방법들을 개발하는 사람들의 주 관심사는 식물세포내로 효과적인 DNA 삽입이라고 할 수 있다. 지금까지 T-DNA 벡터를 이용한다거나 electroporation의 기법을 쓰거



나 (Langgridge 등 1985, Shillotto 등, 1985), direct injection, 혹은 liposome을 이용한 삽입법, particle gun을 이용한 방법 등이 보고되고 있다. 그러나 외래 유전자를 이용한 식물의 유전형질 전환이란 매우 복잡한 과정으로 단순히 DNA를 세포내에 삽입시켜서 되는 것이 아니고 식물 세포내에서 발현할 수 있도록 하는 유전자의 조작과정을 거쳐야 한다.

가장 많이 이용되고 벡터로서 아그로박테리아 (*Agrobacterium tumefaciens*)의 Ti plasmid를 이용한 T-DNA 벡터 시스템을 들 수 있다. 이는 묘포에서 흔히 관찰되는 crown gall이라는 일종의 종양조직이 아그로박테리아에 감염되어 나타나며 이는 아그로박테리아의 Ti plasmid 상의 일부 유전자가 식물조직에 삽입되어 발현되는 원리를 이용한 것이다. 간단하게 요약한다면 기본적으로 4 가지 종류의 유전자 혹은 유전자군이 이 아그로박테리아의 crown gall 형성을 결정한다. 첫째는 T-DNA 상에 있는 DNA 및 유전자들로서 tumor 조직을 유발시키며 생장케하는 호르몬 생합성 유전자들로서 cytokinin 과 auxin을 coding하는 유전자로서 Eukaryotic promoter의 조절을 받으므로 아그로박테리아보다는 식물세포에서 전사되게되어 발현된다. 둘째는 식물세포로 이동할 DNA (T-DNA: transferred DNA)를 한정짓는 양쪽 경계부근의 염기배열로 이 부분은 식물의 염색체상으로 삽입되는 부분과도 연관이 있을 것으로 추정되고 있다. 다음은 vir (virulence) regulon이라고 불리는 유전자군으로 T-DNA 외부에 자리잡고 있으며 이 유전자군들의 산물이 T-DNA를 식물세포로 이동시키는 기능을 하게된다. 따라서 식물세포의 형질전환에는 기본적으로 두가지 요소가 있어야한다. 첫째는 T-DNA이며 둘째는 vir 유전자군이다. 외래 유전자를 이 T-DNA 지역에 삽입시킨다면 T-DNA와 함께 식물세포로 이전이 될 것이다. 그러나 이러한 Ti plasmid를 바로 형질전환 벡터로 이용하는 것은 tumor 유전자, 200 Kb 가 넘는 Ti plasmid의 크기, T-DNA 자체의 크기등으로 유전자 조작상의 어려움이 있다. 따라서 두가지 형태의 벡터가 개발되어 이용되고 있는데 둘 다 vir 유전자군의 trans acting 성질과 T-DNA의 경계부근의 염기배열을 이용한 것으로 하나는 Zambryski 등 (1983)이 개발한 소위 cointegrated vector system

으로 이는 DNA의 homologous recombination 성질을 이용하여 pBR322등의 sequence를 먼저 T-DNA지역에 삽입시킨 후 다시 같은 방법으로 유용 유전자를 삽입시키는 방법이다. 이 경우 벡터의 DNA sequence도 함께 식물로 삽입되는 문제가 있다. 이와는 대조적으로 처음부터 유전자 조작을 위한 replicon을 만드는 경우가 있는데 이것이 binary vector system이다. 이는 적은 plasmid를 만든 후 여기에 아그로박테리아에서 복제가 될 수 있는 replication origin을 넣고 대장균에서도 조작이 가능하도록 거기에 맞는 ori도 함께 삽입시켰는데 35 Kb나 되는 vir 유전자들은 원래의 Ti plasmid에 있도록 함으로써 그의 trans acting 성질을 이용한 것이다.

대부분의 벡터는 형질전환 세포의 선발 표지로서 항생제 가나마이신에 저항성을 나타내게 하는 NPTII 유전자를 지니고 있고 식물체로 삽입될 유전자가 발현될 수 있도록 eukaryotic promoter 와 terminator를 T-DNA 안에 포함시키고 있다.

*Bacillus thuringiensis* 는 살충성 단백질 결정체를 만드는 박테리아로 알려져 있다 (Barton 등 1987). 이들 단백질은 곤충의 장 내에서 proteolysis에 의하여 여러 크기의 단백질로 다시 분해되는데 이것이 곤충에 유독한 것으로 알려져 있다. 과거 20여년 동안 이 박테리아자체를 농작물에 살포함으로써 살충효과를 얻고 있는데 그 적용은 점차 늘어가고 있다. 주요 해충들이 화학농약에 저항성을 나타내는 경우가 점점 많아지기 때문에 이러한 잔류 농약이 환경에 끼치는 영향또한 무시못할 정도가 되고 있다. 따라서 박테리아의 독소를 만드는 유전자를 이용하여 식물 형질전환 벡터를 만든 후 식물을 형질전환 시켜 이 유전자의 발현을 유도한다면 해충에 저항성 품종도 만들 수 있을 것이다. 이러한 독소 단백질을 만드는 대부분의 유전자는 이미 염기배열이 밝혀진 상태로 이를 분리하여 벡터에 클로닝한다면 식물형질전환 벡터는 쉽게 만들어 질 것으로 예상된다. 따라서 본 연구는 PCR을 이용하여 슬잎혹파리의 유충에 치명적인 Bti 의 독소 단백질을 만드는 유전자를 증폭한 후 이를 이용하여 식물 형질전환을 위한 벡터를 개발하려고 시도되었다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 방 법

#### 가. Plasmid preparation

- (1). Mini-preparation: Birnboim & Doly(1979)와 Ish-Horowicz & Burke(1981)에 의한 방법을 이용.

2 ml LB-medium에 *E. coli* 을 37°C 에서 overnight culture한 다음 centrifugation해서 생긴 pellet에 Tris-Cl (pH 7.4), EDTA, NaOH, SDS 등이 포함된 buffer들을 차례로 처리하여 생긴 plasmid DNA를 ethanol precipitation시킨다음, ethanol을 제거한 후 얻는다.

- (2). Large scale preparation: Godson & Vapnek(1973) 방법(modified)

500 ml LB-medium에 *E. coli*을 37°C 에서 overnight culture 시킨 후 얻은 *E. coli* pellet에 sucrose용액으로 처리하고, 차례로 lysozyme, NaOH, SDS 및 RNase 등을 처리해서 얻은 suspension을 EtBr을 넣고 CsCl의 무게와 1:1 되게 한다음 Ti50 rotor에서 40000 rpm, 40 시간 centrifuge한 다음 UV-lamp 아래서 밑에 있는 band를 주사바늘로 끄집어낸 후 isopropanol처리하여 EtBr을 제거시킨후 TE(10/1) buffer 에서 dialysis시킨 다음, 4°C 에서 보관한다. Concentration 및 purification등을 알아보기 위해서 적당한 restriction enzyme 으로 자른후 marker DNA 와 함께 agarose gel상에서 확인해 본다.

나. Transformation of *E. coli* (Dagert & Ehrlich, 1979)

(1). Competent cell preparation :

3 ml 의 log phase에서 자라고 있는 *E. coli*을 centrifugation 시켜, pellet을 얼음위에 올려놓고, 1.5 ml 의 50 mM CaCl<sub>2</sub> 용액으로 suspension시킨 다음 10분간 계속 얼음위에 방치 시킨다.

다시 10분간 eppendorf centrifuge에서 돌려서 pellet을 형성시킨다음, 200  $\mu$ l의 같은 CaCl<sub>2</sub> 용액으로 suspension시켜서, 얼음위에 30분간 방치 시켰다가 transformation시킨다.

(2). Transformation :

0.2 ml CaCl<sub>2</sub>-cell을 10 $\mu$ l DNA와 섞어주고, 30분간 얼음에 세워 둔다. 그 다음 2분간 37°C 에서 incubation시킨후, 1 ml LB-medium 을 넣어 섞어준 다음, 30분간 37°C 에서 incubation시킨다. 이중 0.2 ml 씩 selection agar plate에 plating 해서 37°C 에서 overnight culture 시킨다음 transformant들을 selction한다.

다. Chromosomal DNA isolation from Bacteria

- . Grow 100 ml of cells overnite
- . Transfer into 2 x 50 ml tube and spin at 7000 rpm for 5 min. at 4 °C
- . Resuspend the pellet with 2 ml lysozyme soln. (5mg lysozyme/ml GTE)  
each and combine into one tube

Incubation at 37°C for 45 min.

Add 1 ml soln. II and mix by inversion

Incubation at 60°C for 10 - 30 min.

\* If soln. is clear, step 6 can be skipped.

Add 5 µl RNase A(10 mg/ml) and keep 30 min. at 37°C

TE saturated-Phenol extraction

Chloroform/isoamyl alcohol(24:1) extraction

Transfer the upper phase into the new tube and add 100 µl soln. III

100 % EtOH(2.5 vol.) ppt. and 70 % EtOH washing

Spool out the DNA and dry it at 70 °C

Resuspend the dried DNA in 500 - 800 µl TE(10/1)

0.3 - 0.8 % Agarose gel electrophoresis for identification

라. PCR (polymerase chain reaction)

Bti SR-12 균주로 부터 분리한 chromosomal DNA의 1 ul를 template로 하여 10 X reaction buffer 1 ul, dNTP's(2 mM) 각각 1 ul, primer 1(5 uM) 1 ul, primer 2 (5 uM) 1 ul, 그리고, Taq-pol 1 0.4 unit를 넣고 총 부피를 10 ul로 하여주 게끔 정제된 물로 맞춘다음, FTC-2000의 컴퓨터 프로그램에 따라 15 분간 30 cycle 증폭하여 준다. 증폭이 끝나면 DNA를 조심히 꺼내어 agarose gel 전기 영 동 상에서 분리하여 예상했던 DNA 절편의 등을 조사 분석한다. 이러한 과정을 도 식화하면 아래 그림1과 같다.

10 X reaction buffer:

500 mM Tris-Cl(pH 8.3)

200 mM KCl

30 mM MgCl<sub>2</sub>

5 % DMSO

2.5 mg/ml BSA

마. 합성된 oligonucleotide의 정제 (Sambrook et al, 1989)

Sep-Pak C18 reversed-phase column을 우선 아래와 같이 준비하여 activation 시킨다.

- (1) HPLC용 acetonitrile 10 ml를 흡입시킨 주사기를 column에 끼우고 서서히 밀면서 밀어낸다.
- (2) column으로 부터 주사기를 떼어 낸다음, 다시 주사기로 멸균된 물을 흡입시키고, 다시 주사기를 column에 붙인다음 밀어 내어 column을 씻어 낸다.
- (3) 2 ml의 10 mM ammonium acetate를 주사기에 흡입한 다음, column에 부착하여 column을 씻어 낸다.

위와 같이 준비된 column에 합성된 oligonucleotide를 흡착시키고, 10 ml의 멸균수로 서서히 주사기를 이용하여 씻어내고, 마지막으로 methanol 과멸균수가 60:40으로 섞인 용액으로 추출하여 savant speedvac을 이용하여 농축시킨후 적당량의 멸균수를 넣어 정제된 oligonucleotide를 얻는다.

바. Electroporation (Bio-Rad manual, 1993)

*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 Minimal medium(MM)에 접종한후 28°C에서 26 시간 동안 자라게한 다음, centrifuge에 의한 cell들을 회수한후 10% glycerin이 포함되어 있는 멸균수로 3 번 씻어 내고, 500 ul 10% glycerin 멸균수로 suspension한다. 이렇게 만들어진 균주들을 4°C에 보관하여 다음에 사용할 수 있도록한다. 이중에서 50 ul를 취하여 plasmid를 각각 10 ul씩 넣고 섞어준 다음, Bio Rad Electroporator의 cubette(2 mm)에 넣고 Capacitance Extender를

25 uF 및 Pulse Controller를 2.5 kV로 맞춘다음, 전기 충격을 가하여 주고, 어 림에 약 5 분간 방치한 다음, 1 ml MM-medium을 넣어 주고 28oC에서 1 시간 동안 자라게 한다. 그리고, kanamycin이 함유된 M9-agar 배지에서 selection 한다.

사. 클로닝된 B. t. i. - 27 kD toxin의 감자 잎벌레 조직 세포에 대한 in vitro cytolysin test

Bti 및 클로닝된 대장균 균주를 배양한 일정량을 원심 분리하여 spore와 crystal를 soluble solution(50 mM sodium carbonate, 25 mM Dithiothreitol, pH 10.5)에 혼합시켜준다음, 활성화된 toxin을 얻기 위해 37oC에서 1 시간정도 방치 시켜 준다. 그리고, 현미경 받침유리 glas에 만들어져 있는 1 mm 깊이의 well에 color-ado potato beetle 세포들을 밑바닥에 붙어서 자라게 한다음, 이 세포들을 일차적으로 Dulbeco's PBS 용액으로 씻어 내고, 20 ug/ml의 toxin이 함유된 PBS 용액에서 incubation 하여 준다음, 세포들의 용해 상태를 현미경으로 약 400배 확대하여 점검한다.

아. 대장균에 클로닝된 Bti-27 kDa toxin의 사람의 적혈구 세포를 이용한 cytolytic test

건강한 사람으로 부터 얻은 0.2 ml의 혈액을 원심분리하여, 침전된 적혈구에 50 mM NaOH, 1 mM EDTA로 적정된 용액으로 0.9 ml가 되게끔 혼합시키고, 활성화 시킨 27kDa 용액 100 ul를 넣어 주고, 37oC에서 1 시간 동안 반응시킨다. 그리고, 적혈구 세포의 용해 여부를 확인한다.



## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. Bti SR-12의 cytolytic toxin gene cloning

Bti SR-12 균주로 부터 CsCl gradient를 이용하여 정제된 chromosomal DNA를 분리한 다음, 이것을 template로 하여 27 kDa toxin 유전자를 PCR 방법에 의한 cloning을 하였다. 우선 이 toxin protein의 DNA 염기 서열 (그림 2: Earp and Ellar, 1987)로 부터 N-terminal end region인 LSR1: CCACTATTCTAATTA ACTTA (20 base) 와 C-terminal end region LSR2: TGTGGATGTGTGAAGAACAA (20 base) 두개의 oligonucleotide를 합성한 다음, PCR을 이용하여 24 cycle 증폭하였다. 증폭된 절편을 agarose gel 전기 영동상에서 분리하여 본 결과 예상하였던 바대로 약 1.2 kb에 증폭된 DNA fragment를 확인 할 수 있었고, 이 절편을 high copy number plasmid이며 lacZ'-promoter를 지닌 expression vector pBGS18 (Spratt et al., 1986)의 SmaI-site에 ligation 시켰다(그림 3). 이렇게 제조된 재조합 plasmid에 증폭된 절편이 제대로 ligation 되었는지 알아보기 위해서 재조합 plasmid를 재차 BamHI/KpnI로 절단하여 agarose gel 전기 영동상에서 분리하여 보았는데, 그 결과 예상했던 크기의 1.2 kb 절편이 나타나는 것을 확인하였다 (그림 4). 그리고, 이 재조합 plasmid를 pBti27이라고 명명하였다.

### 2. Cytolytic toxin activity의 측정

Bti SR-12 균주의 chromosomal DNA로 부터 PCR에 의해 증폭된 1.2 kb DNA의 절편이 원했던 cytolytic toxin 유전자인지를 확인함과 동시에 toxin activity를 측정하기 위해서, recombinant plasmid pBti27를 E. coli TG1에 transformation 시킨다음, cloning된 DNA의 절편을 발현시켰다. 이 발현된 toxin를 지닌 E. coli

extract를 사람의 blood cell을 이용하여 cytolytic activity를 측정 하였다 (그림 5). pBti27에 의하여 transformation된 E. coli cell과 Bti SR-12 cell extract로 부터는 강한 cytolytic activity를 발견 할 수 있었다(그림 5: 2, 3). 그러나, E. coli TG1 extract에서는 전혀 cytolytic activity를 발견 할 수 없었다 (그림 5: 1). 이 결과를 통하여 PCR에 의하여 cloning된 1.2 kb의 DNA 절편은 Bti SR-12 균주의 cytolytic toxin 유전자임을 확인 하였다.

### 3. Cloning된 27 kD toxin의 감자 잎벌레 조직 세포에 대한 *in vitro* cytolytic test

27 kDa toxin를 생산하는 클로닝된 E. coli의 extract를 조직배양된 colorado potato beetle 유충의 장내 세포에 30 분간 처리하여 보아 cytolytic activity 여부를 관찰 하였다 (그림 6). 이 실험 결과 pBti27에 의하여 transformation 된 E. coli cell의 extract로 부터 강한 cytolytic activity를 발견 할 수 있었다 (그림 6: 2). 그러나, E. coli TG1 extract에서는 전혀 cytolytic activity를 발견 할 수 없었다(그림 6: 1). 이 결과는 cloning된 27 kDa gene에 의하여 형질 전환된 E. coli 에서 적혈구 세포의 용해 능력과 colorado potato beetle 유충의 장내 세포를 파괴 시키는 능력을 지닌 비 선택적 toxin이 생산되고 있음을 나타내 주고 있으며, 이는 27 kDa toxin이 비 선택적 독소 작용을 지니고 있다고 일반적으로 발표된 것과 일치하고 있다. 그러므로, PCR에 의하여 cloning된 1.2 kb의 DNA 절편은 Bti SR-12 균주의 cytolytic toxin 유전자임이 재확인 되었다.

### 4. 소나무 형질 전환 plasmid의 제조

위에서 cloning된 toxin 유전자를 식물체에 transformation 시켜 발현 시키기

위해서는 식물 형질 전환 vector에 연결 시켜 식물체에 삽입 하여야 한다. 이렇게 하기 위해서 pBti27의 BamHI/KpnI-fragment를 분리하여 식물형질 binary vector인 pBinAR(Hoefgen, 1990; 그림 7)의 BamHI/KpnI-site에 연결하였다. 새로이 재조합된 plasmid를 pAR-27 이라고 명명하고 (그림 7), 재조합된 plasmid가 올바르게 재조합이 되었는지 알아보기 위해서 BamHI/KpnI로 절단하여 agarose 전기영동상에서 분리하여 예상하였던 1.2 kb fragment를 확인하여 보았다.

#### 5. Electroporation를 이용한 Agrobacterium 균주의 transformation

새로 재조합된 plasmid pAR-27를 식물체로 삽입하기 위해서 Agrobacterium tumefaciens LBA4404 (Bevan, 1984)을 이용한 방법을 사용하기로 하였다. 이를 위해서는 우선 Agrobacterium tumefaciens LBA4404를 transformation 하여야 하는데 transformation 방법들중 최근에 많이 사용되어지고 있는 electroporation 방법을 이용하였다. 우선 Agrobacterium tumefaciens LBA4404를 Minimal medium(MM)에 접종한후 28C에서 26 시간 동안 자라게한 다음, centrifuge에 의한 cell들을 회수 한 후 10% glycerin이 포함되어 있는 멸균수로 3 번 씻어 낸다음, 500 ul 10% glycerin 멸균수로 suspension한다. 이렇게 만들어진 균주들을 40C에 보관하여 다음에 사용할 수 있도록한다. 이중에서 50 ul를 취하여 plasmid pAR-27를 각각 10 ul씩 넣고 섞어 준 다음, Bio-Rad Electroporator 의 cubette (2 mm)에 넣고 25 uF 및 2.5 kV로 맞춘다음, 전기 충격을 가하여 주고, 어둠에 약 5 분간 방치한 다음, 1 ml MM-medium에서 1 시간 동안 자라게 하였다.

그리고, kanamycin이 함유된 M9-MM agar 배지에서 배양하여, 한 plate당 대략 10 개 정도의 형질 전환된 Agrobacterium 균주들을 얻을 수 있었다.

## 6. 새로운 식물 형질 전환 vector의 제작

식물체의 형질 전환을 위해서는 형질 전환 vector의 개발이 무엇보다도 중요하다. 현재 사용되어지고 있는 vector를 이용할 경우 우리가 원했던 만큼의 식물체내에서의 유전자 발현을 얻을 수 없을 경우가 있으므로, 현재 사용 중인 vector들 보다 강한 형태의 vector를 개발해보고자 하였다. 우선, plasmid pSR-ENH (그림 8)의 PstI/KpnI-fragment (2 kb)인 enhancer 부위를 분리하여, gene clean (Bio/101 Co.)을 사용하여 DNA를 회수하여 정제하였다. 그리고, Klenow fragment와 dNTP's를 넣어 주고 37°C에서 1 시간동안 incubation 한 다음, phenol/chloroform/isoamylalcohol을 처리하고 ethanol precipitation을 하여준다. 이렇게 하여주면, PstI/KpnI-fragment의 coding strand의 3'-protruding sequence는 degraded되고, complementary strand의 3'-recessive sequence는 polymerization되어 blunt end 형태로 바뀌게 된다. 이는 klenow fragment의 5'  $\rightarrow$  3' polymerization 과 3'  $\rightarrow$  5' exonuclease의 성질을 동시에 이용한 것이다.

이렇게 제작된 blunt end 형태의 enhancer sequence를 CaMV35S-promoter 앞에 놓기위해서, pBinAR를 EcoRI으로 절단하고, dNTP's를 넣고 klenow fragment로 처리한 다음, phosphatase를 처리하고, phenol/chloroform/isoamylalcohol을 처리한 다음, ethanol precipitation을 하여준다. 이렇게 하여주면, EcoRI에 의하여 절단되어진 vector plasmid가 phosphate기를 지니지 않는 blunt end형태로 되어져 vector self ligation을 억제시킬 수 있다. 그러므로, 이렇게 조작된 vector plasmid와 이미 만들어진 blunt end 형태로된 enhancer sequence를 T4 ligase로 ligation 시켜, plant transformation vector pAR-ENH를 제조하였다. 이 과정을 도식화 하여 보면 그림 8 와 같다. 이렇게 재조합된 pAR-ENH를 여러 제한 효소로 절단하여 원했던 대로 정확히 재조합이 이루어 졌는지 확인 하여 보았다(그림 9)

Vector pAR-ENH는 앞으로 식물 형질 전환용으로 많이 사용되어 지리라 여겨지며, 이를 위해서는 우선 몇차례의 검증 단계를 거쳐야 된다고 생각되어 진다.

## 제 4 절 적 요

식물형질 전환 벡터를 개발하는데는 대상 유전자, 프로모터, 그리고 플라스미드 벡터의 3 가지의 요소가 필요하다. 본 연구에서는 BTI 독소 유전자를 운반하는 T-DNA 벡터를 다음과 같이 만들었다. 소나무 형질전환 유전자로 BTI 독소 단백질 생산 유전자를 PCR에 의하여 증폭하여 1.2 Kb 크기의 DNA를 클로닝 벡터인 pBG518에 삽입시켰다. 이렇게하여 재조합된 플라스미드 pBTi27은 대장균에 집어넣은 후 cytotoxicity가 발현되는지 조사하였는데 사람의 혈액 세포에서 발현되는 것을 확인함으로써 Bti toxin 유전자가 클로닝 되었음을 증명하였다. 이 플라스미드 pBTi27은 BamHI 및 KpnI의 두 제한효소로 절단 한 후 독소 유전자가 들어 있는 DNA 조각은 pBinAR에 subcloning 시켰다. 여기에 enhancer sequence를 다시 삽입시킴으로서 식물 형질전환 벡터 pARENH를 완성시켰다. 이 벡터는 electroporation기법으로 *Agrobacterium tumefaciens*에 삽입시켰다.

## 참고문헌

1. Bevan, M. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12: 8711-8721
2. Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979), A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7: 1513.
3. Dagert, M. and Ehrlich, D. (1979), Prolonged incubation in calcium chloride improves competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* 6: 23-28.
4. Earp DJ and Ellar DJ (1987) *Bacillus thuringiensis var. morrisoni* strain PG14: nucleotide sequence of a gene encoding a 27 kDa crystal protein. *Nucleic Acids Res.* 15(8): 3619
5. Godson, G. N. and Vapnek, D. (1973), A simple method of preparing large quantities of  $\phi$ x174RF1 supercoiled DNA. *Biochem. Biophys. Acta.* 299: 516
6. Hoefgen, R. (1990) Doctorial thesis, University of Berlin
7. Ish-Horowicz, D. and Burke, J. F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9: 2989.
8. McPherson MJ, Quirke P and Taylor GR (1991) PCR: A practical approach, IRL press
9. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning*, CSH
10. Spratt, B. G., Hedge, P. G., te Heesen, S., Edelman, A., and Broome-Smith, J. K. (1986) *Gene* 41: 337 - 342

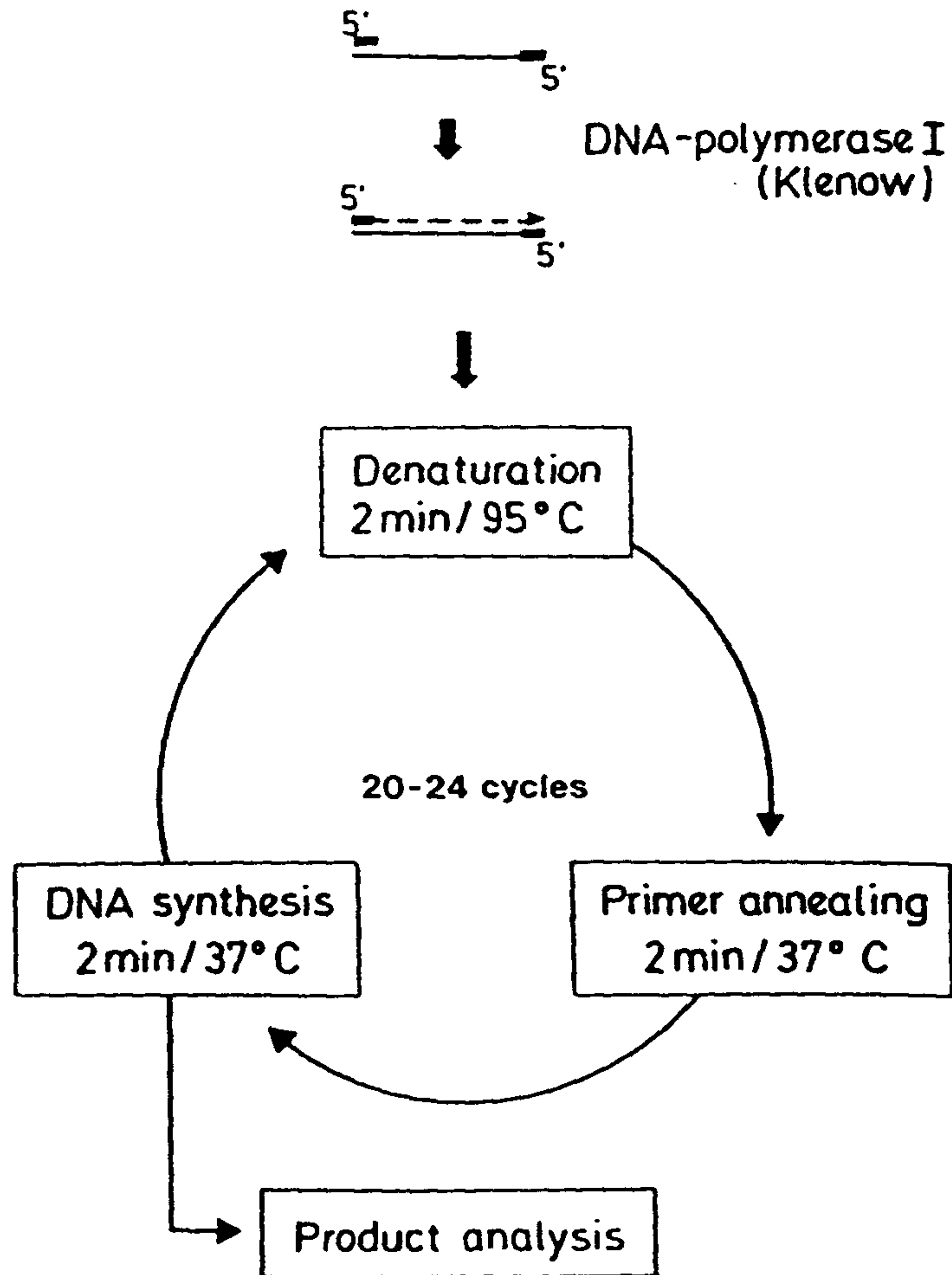
11. An, G. 1985. High efficiency transformation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 79:568-570
12. Bevan, M. W., R. B. Flavell, and M-D. Chilton. 1983. A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304:184-187
13. Braun, A. C. 1982. A history of the crown gall problem . In: *Molecular biology of plant tumors.* (G. Kall and J. Schell, eds) pp155-210. Academic press. New York.
14. Braun, A. C. 1986. The crown gall tumor problem: Contributions to experimental oncology and genetic engineering . In: *Handbook of plant cell culture.* Vol. 4. (D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato, eds) Macmillian publ. co. New York
15. Davey, M. R., E. C. Cocking, J. Freeman, N. Pearce, and I. Tudor. 1980. Transformation of *Petunia* protoplasts by isolated *Agrobacterium* plasmids. *Plant Sci. Lett.* 18:307-313
16. Krens, F. A., L. Molendijk, G. J. Wullems, and R. A. Schilperoot. 1982. In vitro transformation of plant protoplasts with Ti plasmid DNA. *Nature* 296:72-74
17. Krens, F. A., R. M. W. Mars, T. M/S. Van Slogteren, J. H. C. Hoge, G. J. Wullems, and R. A. Schilperoot. 1985. Structure and expression of DNA transferred to tobacco via transformation of protoplasts with Ti plasmid DNA: Co-transfer of T-DNA and T-DNA sequence. *Plant Mol. Biol.* 5:223-234
18. Langridge W. H. R., and A. A. Szalay. 1985. Electric field mediated stable transformation of carrot protoplast with naked

DNA. *Plant Cell Report* 4:355-359

19. Rollo, F., M. G. Galli, and B. Parisi. 1981. Liposome mediated transfer of DNA to carrot protoplasts: A biochemical and autoradiographical analysis. *Plant Sci. Lett.* 20:347-354
20. Shillito, R. D., M. W. Saul, J. Paszkowski, M. Muller, and L. Potrykus. 1985. High efficiency direct gene transfer to plants. *Bio/technol.* 3:1099-1103
21. Szoka, F., and D. Papahadjopoulos. 1978. Procedure for preparation of liposome with large internal aqueous space and high capture by reverse phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. USA* 75:4194-4198
22. Uchimiya, H. . 1981. Parameters influencing the liposome-mediated insertion of fluorescein diacetate into plant protoplasts. *Plant Physiol.* 67:629-632
23. Yadav, N. S., J. Vanderleyder, D. R. Bennett, W. R. Barnes, M. D. Chilton. 1982. Short direct repeat flank the T-DNA on the nopaline Ti plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:6322-6326



그림 1: PCR을 이용한 DNA 증폭 과정

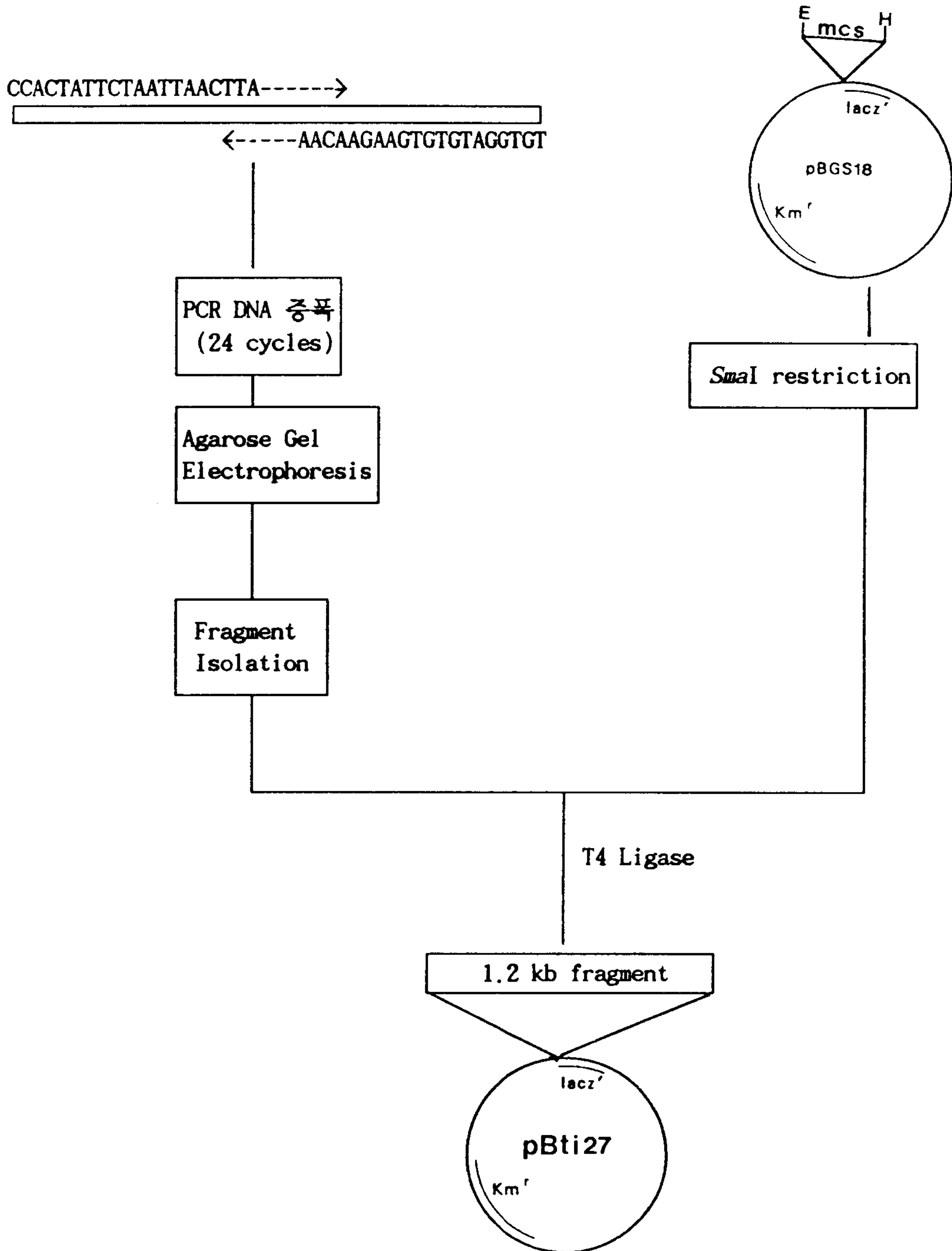


## 그림 2 Bti-27 kDa cytolytic 유전자의 염기서열

(음영부분은 잠정적인 S/D-sequence 이며, 화살표식은 Translation start site을 나타내고, 밑줄친 부분이 PCR에 의한 증폭시 사용된 primer임)

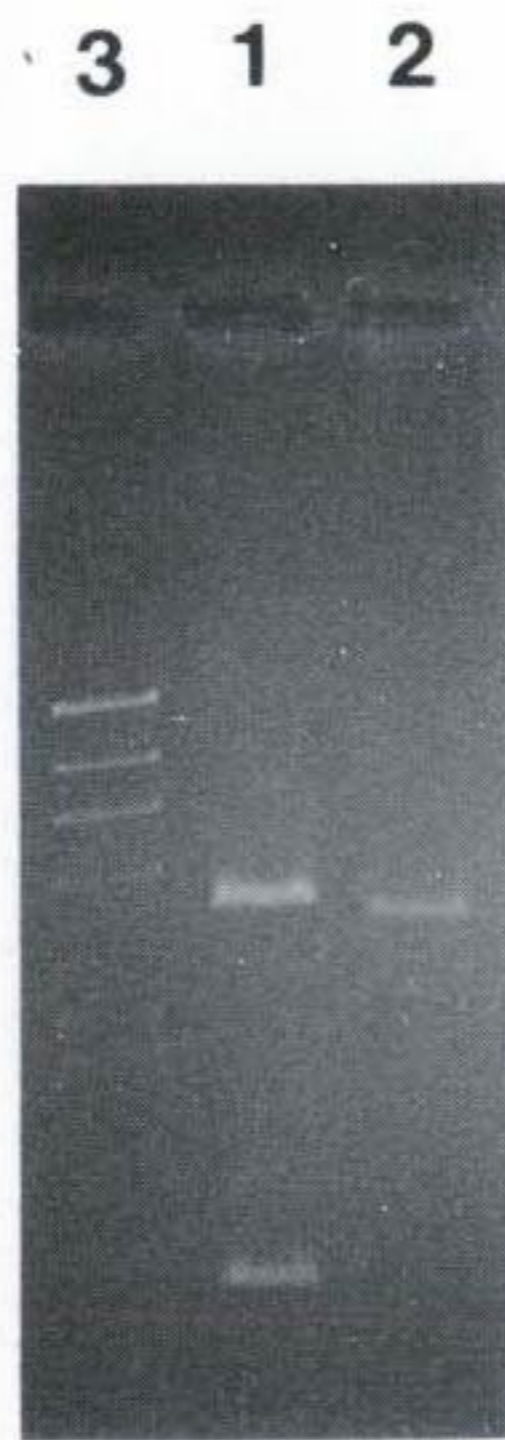
CCACTATTCTAATTAACTTAAGGAGTTGTTTATTTATGGAAAATTTAAATCATTGTCCATTAGAAGATATAAAGG  
TAAATCCATGGAAAACCCCTCAATCAACAGCAAGGGTTATTACATTACGTGTTGAGGATCCAAATGAAATCAATA  
ATCTTCTTTCTATTAACGAAATTGATAATCCGAATTATATATTGCAAGCAATTATGTTAGCAAATGCATTTCAAA  
ATGCATTAGTTCCCACTTCTACAGATTTTGGTGATGCCCTACGCTTTAGTATGGCAAAGGTTTAGAAATCGCAA  
ACACAATTACACCGATGGGTGCTGTAGTGAGTTATGTTGATCAAAATGTAACTCAAACGAATAACCAAGTAAGTG  
TTATGATTAATAAAGTCTTAGAAGTGTTAAAACTGTATTAGGAGTTGCATTAAGTGGATCTGTAATAGATCAAT  
TAACTGCAGCAGTTACAAATACGTTTACAAATTTAAATACTCAAAAAAATGAAGCATGGATTTTCTGGGGCAAGG  
AAACTGCTAATCAAACAAATTACACATACAATGTCCTGTTTGCAATCCAAATGCCCAAAGTGGTGGCGTTATGT  
ATTGTGTACCAGTTGGTTTTGAAATTAAGTATCAGCAGTAAAGGAACAAGTTTTATTTTTCACAATTCAAGATT  
CTGCGAGCTACAATGTTAACATCCAATCTTTGAAATTTGCACAACCATTAGTTAGCTCAAGTCAGTATCCAATTG  
CAGATCTTACTAGCGCTATTAATGGAACCCTCTAATCTTAGTAGCTATATTTATTAATATGGTAATATCACAAG  
TATAAATACTTGTGGTATTACCTACCATTCTTAAATTATATCCAAATCATGCGTTAATCTACATTCCCCTTTCT  
CTAAAATTTGTTCTTCACACATCCACATTTTTTCGA

그림 3 재조합 plasmid pBti27의 제조 과정



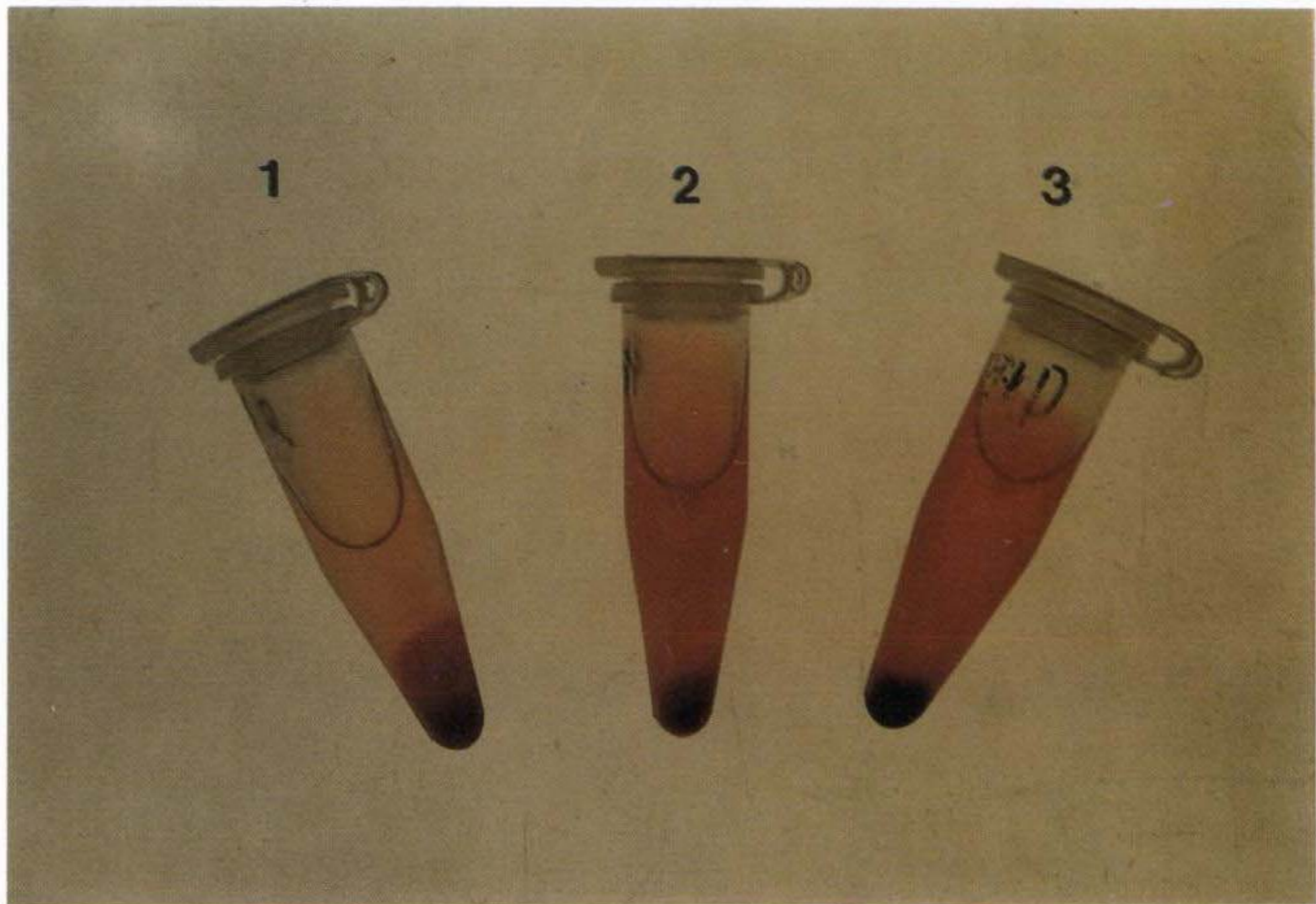
**그림 4** Restriction pattern of pBti27

Lane 1: pBti27 restricted with *Bam*HI/*Kpn*I  
Lane 2: pBGS18 restricted with *Bam*HI/*Kpn*I  
Lane 3:  $\lambda$ -DNA with *Hind*III



**그림 5** Cytolytic activity test in human blood cells using extracts of *E. coli* transformed with pBti27

No.1: *E. coli* extracts, No.2: Bti SR-12 extracts  
No.3: *E. coli* cell transformed with pBti27



**그림 6** Cytolytic activity test in cultured colorado potato beetle intestinal cells using extracts of *E. coli* transformed with pBti27

No.1: *E. coli* extracts

No.2: *E. coli* cell transformed with pBti27

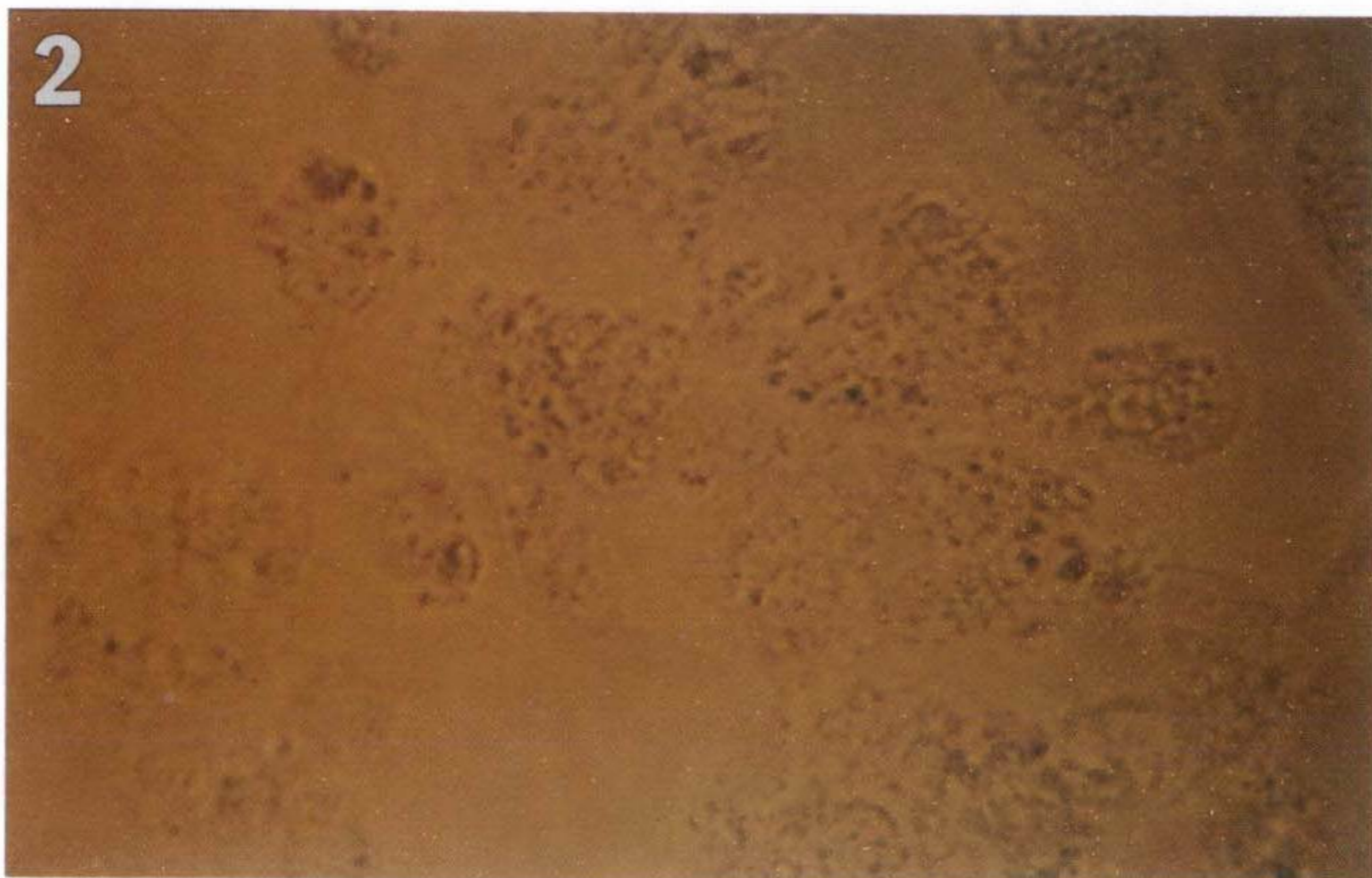


그림 7 재조합 plasmid pAR-27의 제조 과정

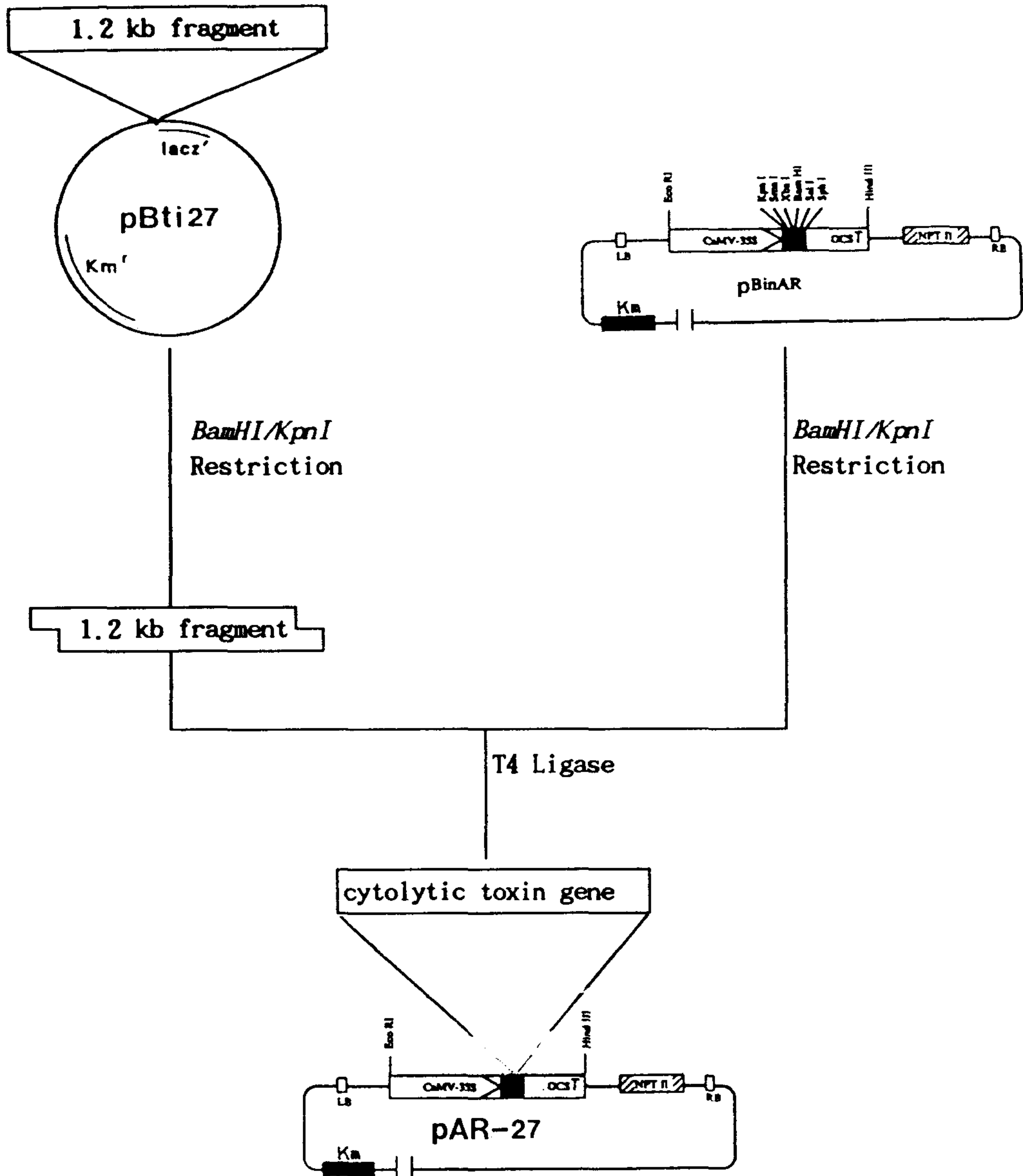
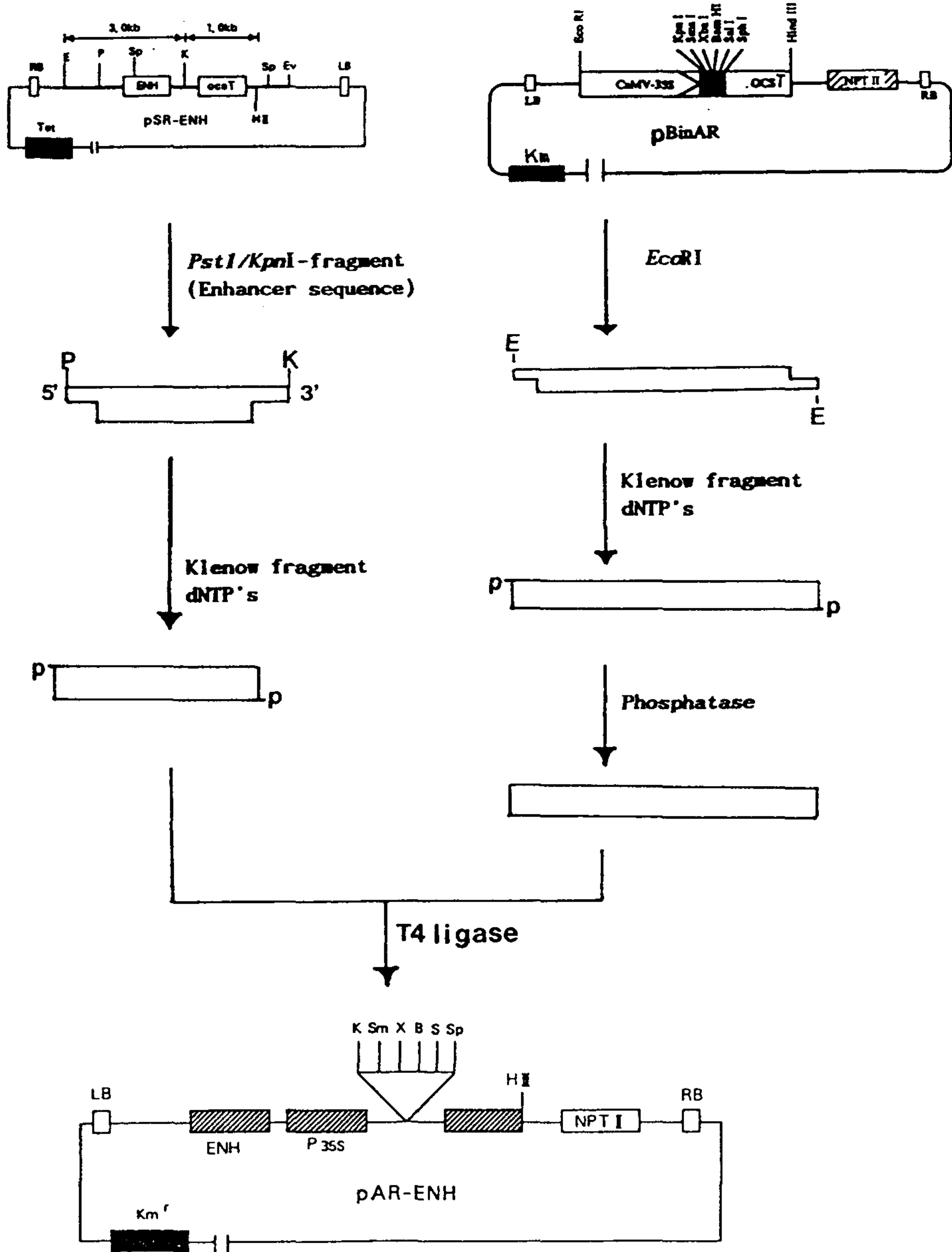


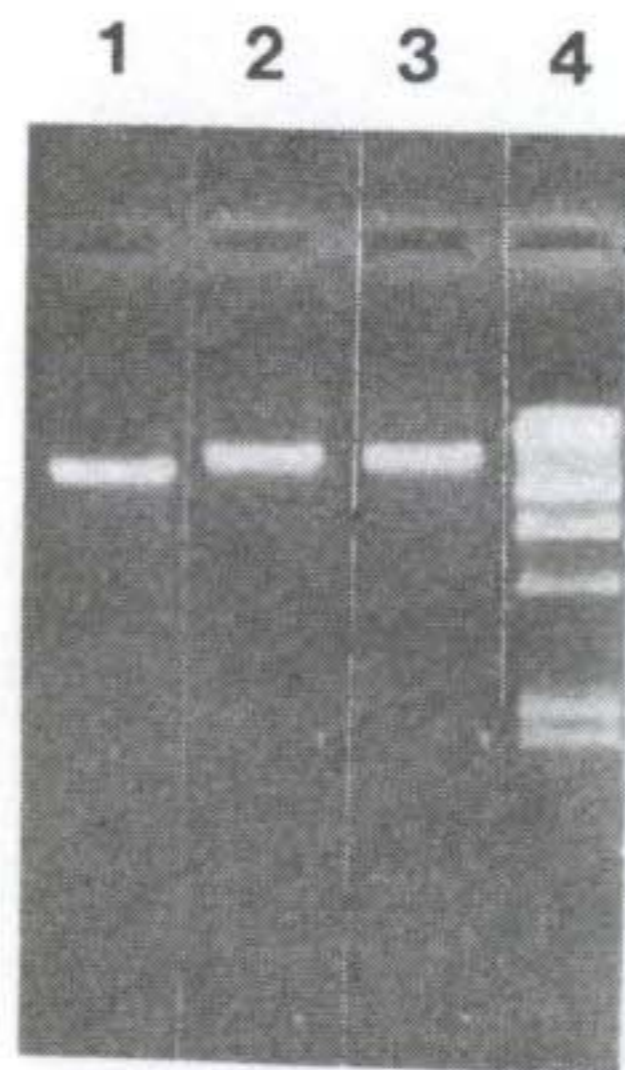
그림 8 Flow Diagram for Plant Transformation Vector Plasmid pAR-ENH





**그림 9 Restriction Pattern of pAR-ENH**

- Lane 1: pBinAR restricted with *Bam*HI
- Lane 2: pAR-ENH restricted with *Bam*HI
- Lane 3: pAR-ENH restricted with *Hind*III
- Lane 4:  $\lambda$ -DNA restricted with *Hind*III



## 제 4 장 식물체분화 및 형질전환

## Summary

For reliable plant transformation, relatively high frequency shoot regeneration from callus is an absolute requirement. However, in many economically important species, the system is yet to be established. Pines are one of the recalcitrant species in terms of regeneration from callus. From the previously reported works with other conifer species, it has been suggested that tissue source is the key factor to successful regeneration of shoots from callus.

Therefore, in the present study, several different tissue sources were tested for regeneration of shoots from callus. First, cell suspension cultures were tried to find out conditions for optimal cell proliferation. MS medium with 0.5 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l BA was the best in cell growth. Shoot regeneration was achieved on callus derived from the cell suspension culture, although the frequency of the regeneration was very low. The results agreed with the previous findings that younger tissues are better in organogenic response than older tissues.

## 제 1 절 서론

유전 형질전환이란 한 개체의 유전적 구성을 다른 것으로 바꾸는 일로서 지금은 단순히 형질전환이라는 용어로 통용되고 있다. 식물 형질전환이란 따라서 식물의 유전적 구성 즉 DNA를 바꾸어서 이러한 변화가 유전자의 발현에 변화를 일으키므로서 다른 형질을 나타내는 것을 의미한다. 이러한 형질전환을 위하여 많은 학자들이 여러가지

매체를 이용하여 외래의 DNA를 식물세포로 옮기는 시도를 해왔다. 그 대표적인 것이 DNA의 직접 주입, 전류를 이용한 electroporation, liposome 방법 등을 들 수 있다. 그러나 가장 많이 쓰이고 있는 방법은 아그로박테리아의 T-DNA를 이용한 벡터라고 할 수 있다. 이 방법을 이용하여 많은 식물에서 성공적인 식물 형질전환의 예가 많이 발표되고 있다. 침엽수의 경우 Picea 속에서 여러 편의 형질전환의 보고가 있으나 대부분 transient expression을 보고하거나 tumor 유도 유전자의 발현 등을 보고한 정도이다. 그러나 이러한 DNA의 형질전환 기술이 확립되어 있음에도 불구하고 많은 식물에서 아직도 형질전환이란 이루기 어려운 숙제로 남아 있다. 그 이유는 형질전환된 세포를 증식시킨 후 식물체로의 재생 절차가 아직 많은 식물에서 확립되어 있지 않기 때문이다. 특히 임목의 경우 포플러를 제외하고 캘러스 단계에서 식물체 재생은 흔치 않으며 침엽수의 경우는 더욱 어렵다고 보여진다. 침엽수 중에서 독일가문비나무 (Picea abies)에서 tumor가 형성되어 opine이 합성되는 것을 확인 한 경우가 있으며 (Hood 등 1990) particle gun 을 이용하여 체세포배를 이용하여 형질전환된 보고도 있다 (Robertson 등 1992, Ellis 등 1993). 그러나 이러한 particle gun을 이용하는 것은 장비의 가격이 비싸서 쉽사리 구입할 수 없을 뿐 아니라 particle gun의 성격상 조직 내의 모든 세포에서 외래유전자가 각기 다른 삽입 위치를 가지게 되는 문제점이 있다. 따라서 현 단계에서 이러한 방법을 배나 체세포 배에 적용하는 것은 그 목적이 transient expression을 점검하는 것이 주 목적인다고 할 수 있다.

침엽수의 경우 캘러스에서의 식물체 재생은 아직은 매우 어려운 것으로 알려져 있는데 최근 미성숙 종자를 이용한 배유 (female gametophyte)나 미숙배에서 유도된 캘러스가 기관 발생능력이 높은 것으로 알려졌다. Krogstrup (1990) 은 Picea sitchensis의 현탁배양 세포에서 체세포 배의 유도를 보고하고 있으며 Kartha 등 (1988)도 white spruce의 세포배양체에서 체세포배의 유도를 보고하였는데 이 경우 특이한 점은 1년 이상 액체 질소에 보관한 조직들도 체세포를 통하여 식물체로 분화되었다는 점이다. 이외에도 Attree(1987, 1990) 등이 black spruce 와 white spruce에서

체세포 배의 유도를 보고함으로써 가문비 나무류에서는 이제는 식물체 재생이 어렵지 않음을 보여주고 있다. Kaarina 와 Santanen (1990)은 캘러스로부터의 체세포 배 발생을 위한 배지조건을 구명하였는데 B, Zn, Cu, Co, 및 Ni 등의 농도를 약간 높여 주는 것이 효과적이며 녹색 캘러스에서는 기관 분화가 일어나지 않음을 보고하여 조직을 암배양하는 것이 효과적임을 밝힌바 있다.

따라서 본 연구는 제 2 장의 소나무류의 대량 증식 시험 부분의 캘러스를 통한 증식 방법과 관련하여 소나무 캘러스의 줄기 유도 조건을 구명하여 식물형질 전환 후 기관 발생시험을 위한 기초 실험으로 실시되었다.

## 제 2 절 재료 및 방법

Open pollination된 해송의 미성숙 종자를 채취하여 2% 차아염소산 용액으로 표면을 살균한 후 멸균수로 3회 수세한 후 무균상에서 종피와 배유를 제거하고 배를 캘러스 증식배지인 2,4-D 1.0 mg/l, BA 0.4 mg/l, kinetin 0.4 mg/l 가 첨가된 MS 배지에 치상하여 callus 발생을 유도하였다.

배 유래 캘러스의 증식을 위해서 2,4-D, NAA, BA 조합의 MS 배지에서 세포현탁배양을 하였으며, 배양 한달 후 각각의 packed cell volume을 측정하여 ANOVA를 실시하였다. 또한 2,4-D(1, 3, 5, 7, 9 mg/l)와 BA (0.5, 1.0, 3.0, 5.0 mg/l) 가 함유된 MS 고체배지에서 배 유래 캘러스의 증식을 조사하였다. 직경 0.5 cm 정도의 캘러스 덩이를 페트리디쉬당 5개씩 3반복 치상하였다.

증식배지에서 증식된 캘러스로부터의 식물체 분화를 유기할 목적으로 여러가지 cytokinin이 단독 및 조합으로 처리된 MS 배지에 캘러스 덩이를 직경 0.5 cm의 크기로 조제하여 치상한후 배양 6주 후에 캘러스의 상태를 관찰하였다. 이때 페트리디쉬당 5개씩 8반복으로 치상하였다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

미성숙 종자에서 배를 채취하여 2,4-D 1.0 mg/l, BA 0.4 mg/l, kinetin 0.4 mg/l 가 함유된 MS 배지에 치상하여 배 유래의 캘러스를 얻었다. 유기된 캘러스를 동일배지에 계대배양하여 식물체 분화를 위한 실험에 사용하였다.

배 유래 캘러스를 2,4-D 0.5 mg/l, BA 0.1 mg/l 가 포함된 MS 배지에서 현탁배양하였을 때 가장 양호한 세포증식을 보였으며, Table 1은 현탁배양시 사용한 여러 식물생장호르몬에 따른 ANOVA 를 나타낸 것이다. 세포의 농도가 낮았을 때 lag phase가 길어지면서 그 동안에 세포가 갈변하였다(not showing data). 세포의 생장이 느린 침엽수의 세포배양에는 특히 세포의 초기 배양농도가 세포의 증식에 큰 영향을 미치는 것으로 보이며 해송의 경우, 5% (v/v)의 농도가 적당한 것으로 보인다.

유기된 캘러스의 증식과 캘러스에서 식물체 분화를 위해 2,4-D 와 BA 조합배지에 0.5 cm의 캘러스 덩이를 페트리디쉬당 5개씩 3반복으로 치상하였다. 2,4-D 1.0 mg/l, 나 3.0 mg/l가 포함된 배지에서 캘러스의 증식이 대체적으로 양호하였으며 2,4-D 3.0 mg/l, BA 1.0 mg/l가 포함된 배지에서 다소 compact하고 녹색을 띠는 organogenic한 캘러스가 관찰되었다(Table 2). 잘 자란 캘러스의 수는 직경 1.0 cm 이상으로 자란 캘러스의 수를 나타낸 것이다.

Table 1. Analysis of variance (ANOVA) on packed cell volume increment from suspension cultured cells which derived from immature embryos

| SV                | DF  | SS          | MS         | F          |
|-------------------|-----|-------------|------------|------------|
| Rep.              | 2   | 1. 37488    | 0. 68744   |            |
| NAA               | 3   | 414. 73312  | 138. 24416 | 9. 1358**  |
| BA                | 3   | 60. 71692   | 20. 23901  | 1. 33740   |
| 2, 4-D            | 3   | 282. 00601  | 94. 00203  | 6. 21209** |
| NAA X 2, 4-D      | 9   | 312. 36700  | 34. 70741  | 1. 73170   |
| 2, 4-D X BA       | 9   | 66. 82892   | 7. 42540   | 0. 49070   |
| NAA X BA          | 9   | 269. 41813  | 29. 9353   | 1. 97826#  |
| NAA X BA X 2, 4-D | 27  | 320. 42517  | 11. 8675   | 0. 78426   |
| Error             | 126 | 1906. 64462 | 15. 1321   |            |
| Total             | 191 | 3634. 28021 |            |            |

Table 2. Callus proliferation on MS medium containing BA and 2, 4-D combinations

| Growth           |     | No. of survived | No. of well-grown | No. of organogenic |
|------------------|-----|-----------------|-------------------|--------------------|
| Regulators(mg/l) |     | callus mass     | callus mass       | callus mass        |
| 2, 4-D           | 1.0 |                 |                   |                    |
| BA               | 0.5 | 10              | 5                 | -                  |
|                  | 1.0 | 15              | 8                 | -                  |
|                  | 3.0 | 15              | 7                 | -                  |
|                  | 5.0 | 11              | 8                 | -                  |
| 2, 4-D           | 3.0 |                 |                   |                    |
| BA               | 0.5 | 10              | 7                 | -                  |
|                  | 1.0 | 15              | 5                 | 5                  |
|                  | 3.0 | 15              | 5                 | -                  |
|                  | 5.0 | 10              | 5                 | -                  |
| 2, 4-D           | 5.0 |                 |                   |                    |
| BA               | 0.5 | 10              | 6                 | 2                  |
|                  | 1.0 | 8               | 5                 | 2                  |
|                  | 3.0 | 12              | 6                 | -                  |
|                  | 5.0 | 2               | -                 | -                  |
| 2, 4-D           | 7.0 |                 |                   |                    |
| BA               | 0.5 | 8               | 4                 | -                  |
|                  | 1.0 | 5               | -                 | -                  |
|                  | 3.0 | 5               | -                 | -                  |
|                  | 5.0 | 11              | 9                 | -                  |
| 2, 4-D           | 9.0 |                 |                   |                    |
| BA               | 0.5 | 11              | 10                | -                  |
|                  | 1.0 | 12              | 8                 | -                  |
|                  | 3.0 | 10              | 1                 | 1                  |
|                  | 5.0 | 10              | -                 | -                  |



Table 3. Effect of cytokinin alone medium for regeneration of shoot  
from embryo-derived callus

| Cytokinin<br>( mg/l ) | No. of survived<br>callus mass | Degree of<br>organogenic callus |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| BA                    |                                |                                 |
| 0.2                   | -                              | -                               |
| 0.4                   | 24                             | +                               |
| 0.8                   | 2                              | +                               |
| 1.0                   | 40                             | +++                             |
| 2.0                   | 24                             | ++                              |
| 4.0                   | 37                             | +                               |
| 6.0                   | 12                             | -                               |
| 8.0                   | 10                             | -                               |
| 10.0                  | 1                              | -                               |
| 2iP                   |                                |                                 |
| 0.2                   | 14                             | +                               |
| 0.4                   | 10                             | ++                              |
| 0.8                   | 13                             | +                               |
| 1.0                   | 7                              | +                               |
| 2.0                   | 7                              | +                               |
| 4.0                   | 27                             | +                               |
| 6.0                   | 18                             | +++                             |
| 8.0                   | 5                              | +                               |
| 10.0                  | 3                              | -                               |
| zeatin                |                                |                                 |
| 0.2                   | 20                             | ++                              |
| 0.4                   | 5                              | +                               |
| 0.8                   | 5                              | -                               |
| 1.0                   | 15                             | +                               |

| Cytokinin<br>( mg/l ) | No. of survived<br>callus mass | Degree of<br>organogenic callus |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 2.0                   | 1                              | -                               |
| 4.0                   | 2                              | -                               |
| 6.0                   | -                              | -                               |
| 8.0                   | 15                             | +                               |
| 10.0                  | -                              | -                               |
| kinetin               |                                |                                 |
| 0.2                   | -                              | -                               |
| 0.4                   | -                              | -                               |
| 0.8                   | -                              | -                               |
| 1.0                   | -                              | -                               |
| 2.0                   | -                              | -                               |
| 4.0                   | -                              | -                               |
| 6.0                   | -                              | -                               |
| 8.0                   | -                              | -                               |
| 10.0                  | -                              | -                               |

Organogenic한 캘러스에서 식물체 재분화를 유도하기 위해 여러가지 싸이토키닌 첨가된 배지에 배양하였다. kinetin을 제외하고 BA, zea, 2iP 처리구에서 대부분 생존율에 있어서 양호하였으며 BA 1.0 mg/l 에서는 100 %의 생존율을 나타냈으며 아주 organogenic 한 캘러스 상태를 유지하였다(Table 3) . zeatin 처리구에서 몇개의 shoot가 분화되었지만 처리간 경향치가 나타나지 않았고 지속적으로 shoot 재분화를 유도할 수 없었다. 따라서 캘러스에서의 식물체 재분화에 대한 실험은 다른 방법으로 계속 실시되어야 할 것으로 사료된다.

## 제 4 절 적 요

식물의 형질전환을 위하여 캘러스로부터의 식물체 재생이 절대적으로 요구된다. 그러나 경제적으로 유용한 많은 식물에서 식물체 재생은 아직 제대로 확립되지 않았다. 소나무류는 캘러스에서의 줄기유도가 아주 어려운 식물로 알려져 있다. 소나무 이외의 다른 침엽수에서 연구된 결과에 의하면 배양 재료가 이 실험의 성공 요건으로 추측되고 있다.

그러므로 본 연구에서는 캘러스로부터 줄기를 재생하기 위하여 여러가지 부위의 조직을 시험하였다. 먼저 세포증식에 적절한 조건을 찾기 위하여 세포 현탁 배양을 실시한 결과 BA 0.1 mg/l 와 2,4-D 0.5 mg/l가 첨가된 MS 배지가 소나무 세포의 증식에 가장 적합함을 발견하였다. 캘러스로부터의 줄기유도는 이 현탁배양한 세포에서 유도되었을 경우 관찰되었으나 줄기 발생 빈도는 매우 낮았다. 본 연구는 미숙배등의 어린 조직을 재료로 사용하였을 경우 반응이 좋게 나타났는데 이는 다른 침엽수의 경우와 같은 경향을 나타내는 것이다.

## 참고문헌

1. Attree SM, F Bekkaoui, DI Dunstan, and LC Fowke. 1987. Regeneration of somatic embryos from protoplasts isolated from an embryogenic suspension culture of white spruce (*Picea glauca*). Plant Cell Reports 6:480-483
2. Attree SM, TE Tautorus, DI Dunstan, and LC Fowke. 1990. Somatic embryo maturation, germination, and soil establishment of plants of black and white spruce (*Picea mariana* and *Picea glauca*). Can. J. Bot. 68:2583-2589
3. Ellis DD, DE McCabe, S McInnis, R Ramachandran, DR Russell, KM Wallace, BJ Martinell, DR Roberts, KF Raffa, and BH McCown. 1993. Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. Bio/Technol. 11: 84-89
4. Finer JJ, H. B. Kriebel, and MR Beewar. 1989. Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). Plant Cell Reports 8:203-206
6. Gupta PK and DJ Durzan. 1986. Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. Bio/Technology 4:643-645
7. Gupta PK and DJ Durzan. 1987. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. Bio/Technology 5:147-151
8. Von Arnold S. 1987 Effect of sucrose on starch accumulation and adventitious bud formation on embryos of *Picea abies*. Annals of Botany 59:15-22
9. Hood EE, DH Clapham, I Ekberg, and T Johannson. 1990. T-DNA presence and opine production in tumors of *Picea abies* Karst induced by *Agrobacterium*

- tumefaciens* A281. Plant Mol. Biol. 14: 111-117
10. Kartha KK, LC Fowke, NL Leung, KL Caswell, and I Hakman 1988. Induction of somatic embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*). J. Plant Physiol. 132:529-539
  11. Kaul K, and Kochhar TS. 1985. Growth and differentiation of callus of *Pinus*. Plant Cell Reports 4:180-183
  12. Konar RN. 1974. *In vitro* studies on *Pinus* I. Establishment and growth of callus. Physiol Plant 32:191-197
  13. Krogstrup P. 1990. Effect of culture densities on cell proliferation and regeneration from embryogenic cell suspensions of *Picea sitchensis*. Plant Science 72:115-123
  14. Robertson D, AK Weissinger, R Ackley, S Glover, and R Sederoff. 1992. Genetic transformation of Norway spruce using somatic embryo explants by microprojectile bombardment. Plant Mol. Biol. 19: 925-935
  15. Simola LK and A Santanen. 1990. Improvement of nutrient medium for growth and embryogenesis of megagametophyte and embryo callus lines of *Picea abies*. Physiologia Plantarum 80:27-35
  16. Kaul, K. 1986. Establishment of long term cultures from mature white pine (*Pinus strobus* Pinaceae). Amer. J. Bot. 73:242-245
  17. Konar, RN. 1975. *In vitro* studies in *Pinus* 2. The growth and morphogenesis of cell cultures from *Pinus gerardiana*. Phytomorphol. 25:55-59

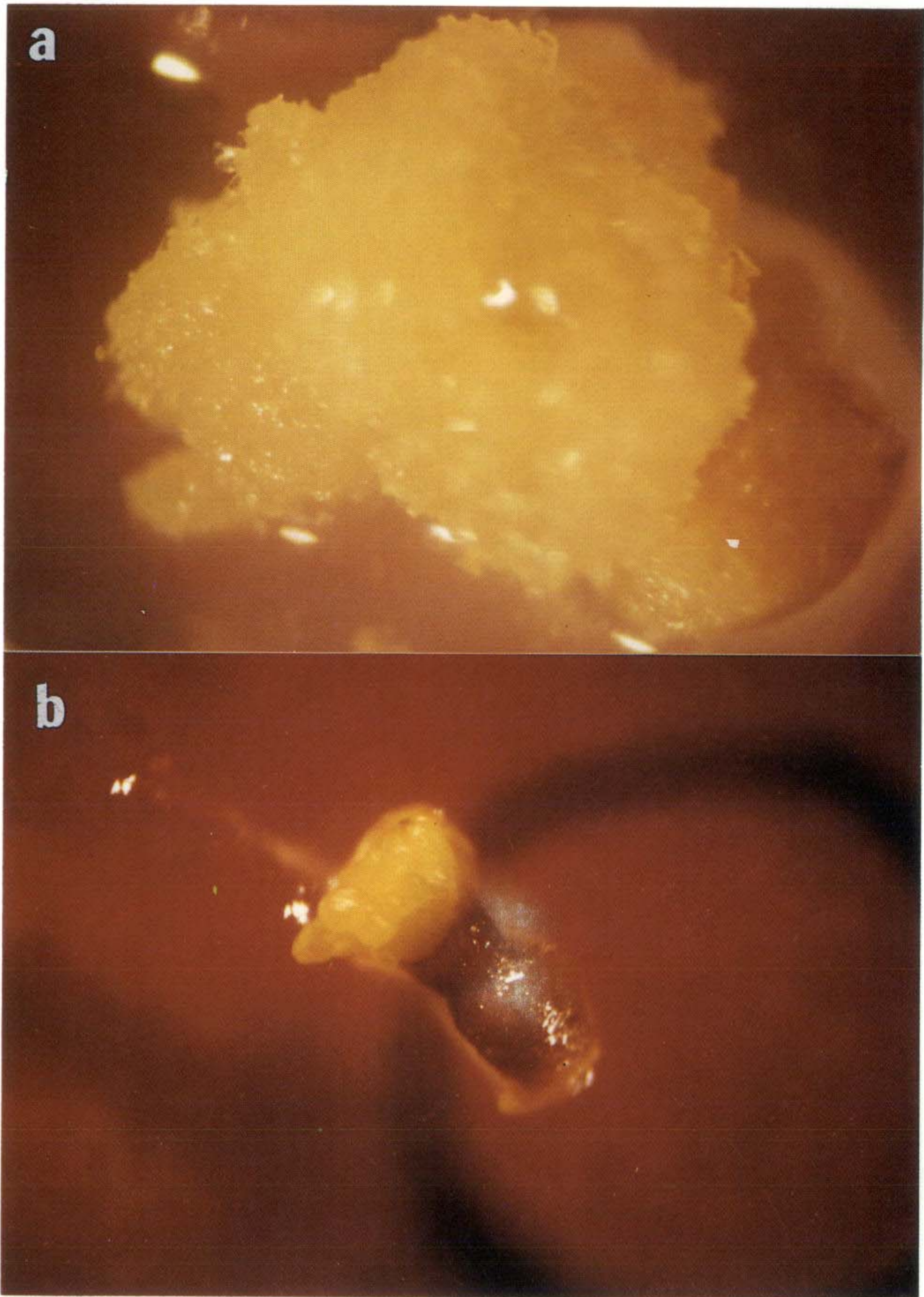


그림 1. 소나무 배 배양에 의한 캘러스(a) 체세포배 유도(b)

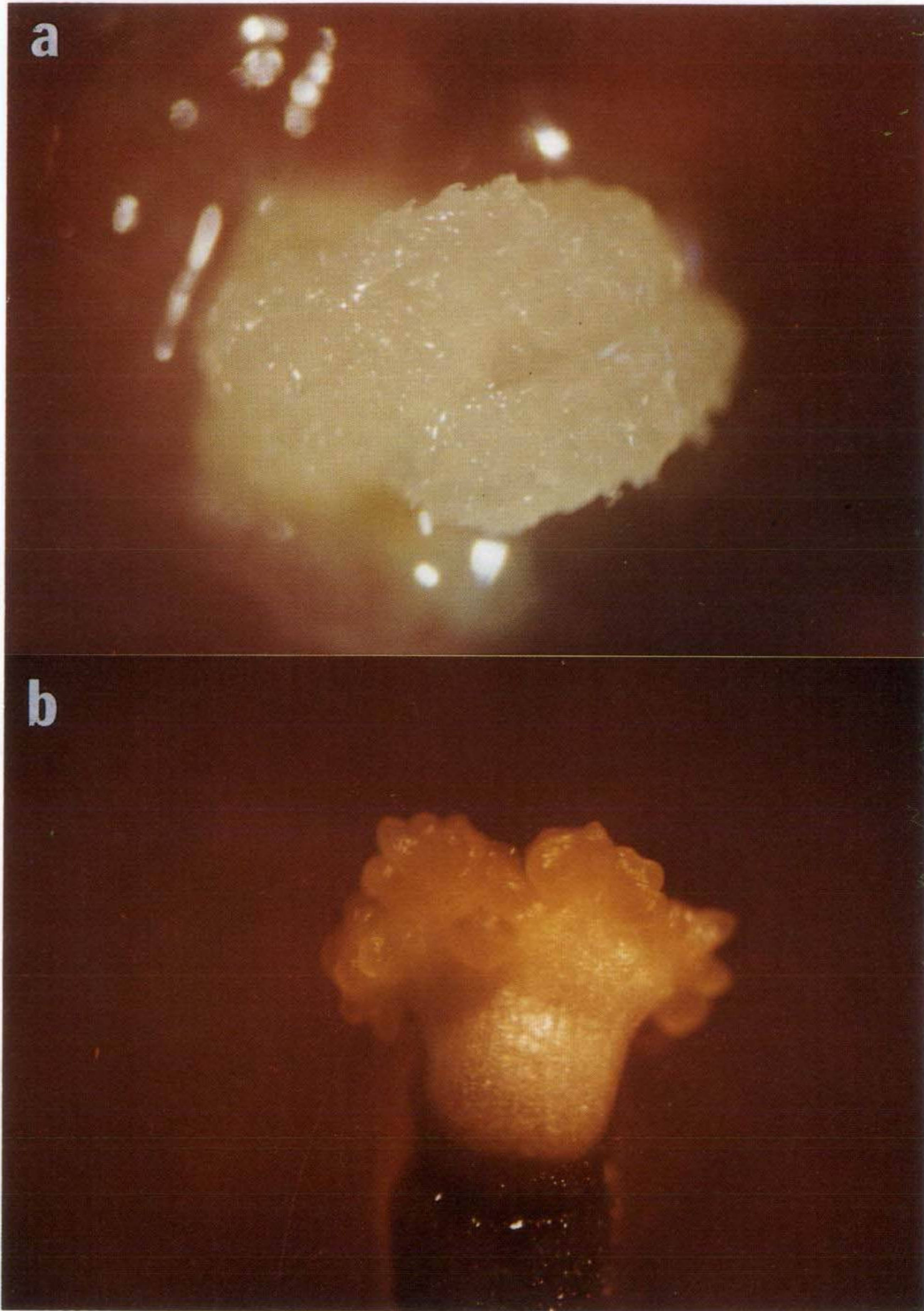


그림 2. 해송 배 배양에 의한 켈러스(a) 체세포배 유도(b)

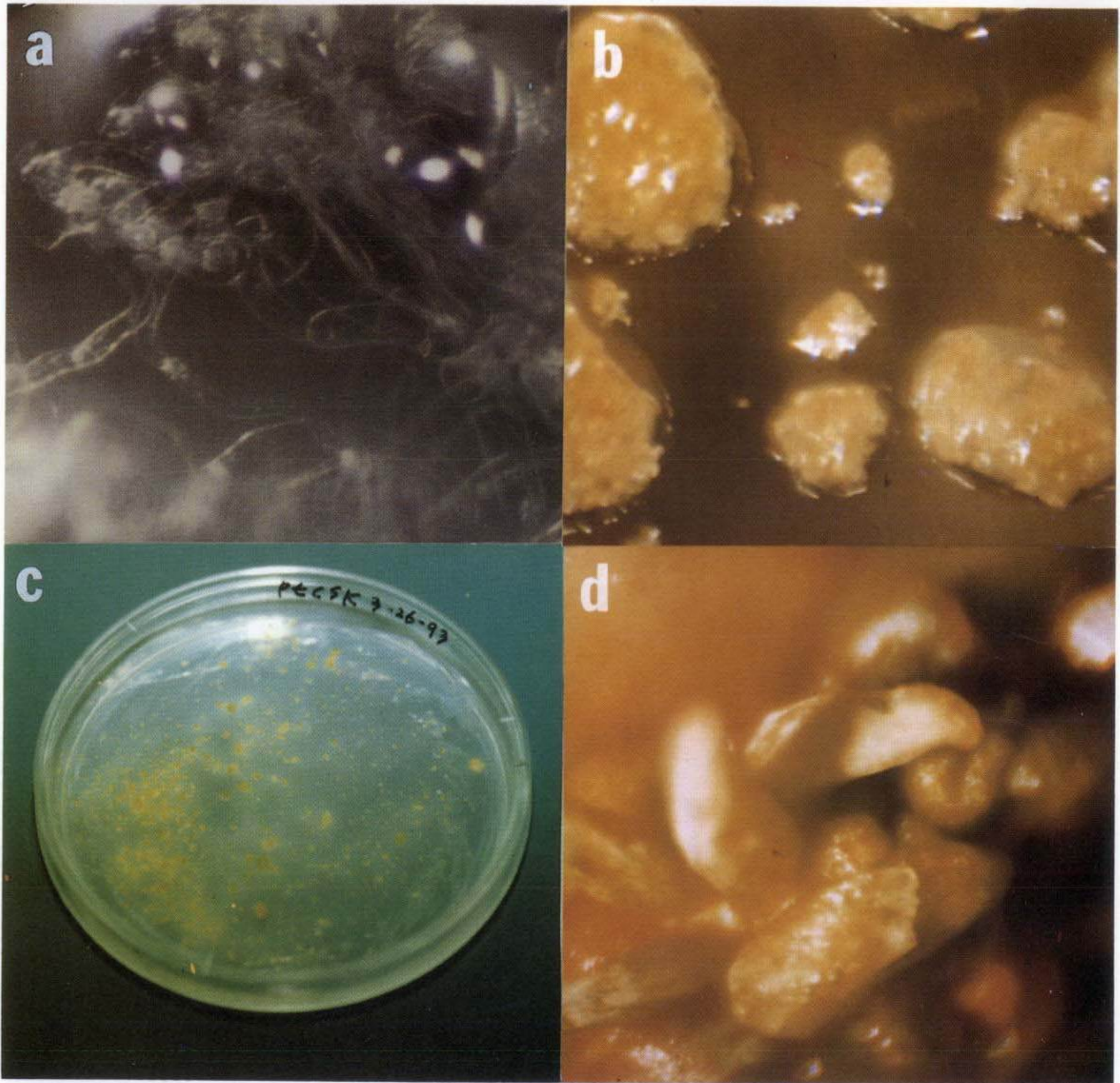


그림 3. 해송 체세포에 의한 식물체 유도

(a) 현탁세포배양      (b-c) 캘러스 유도

(d) 유도된 shoot bud



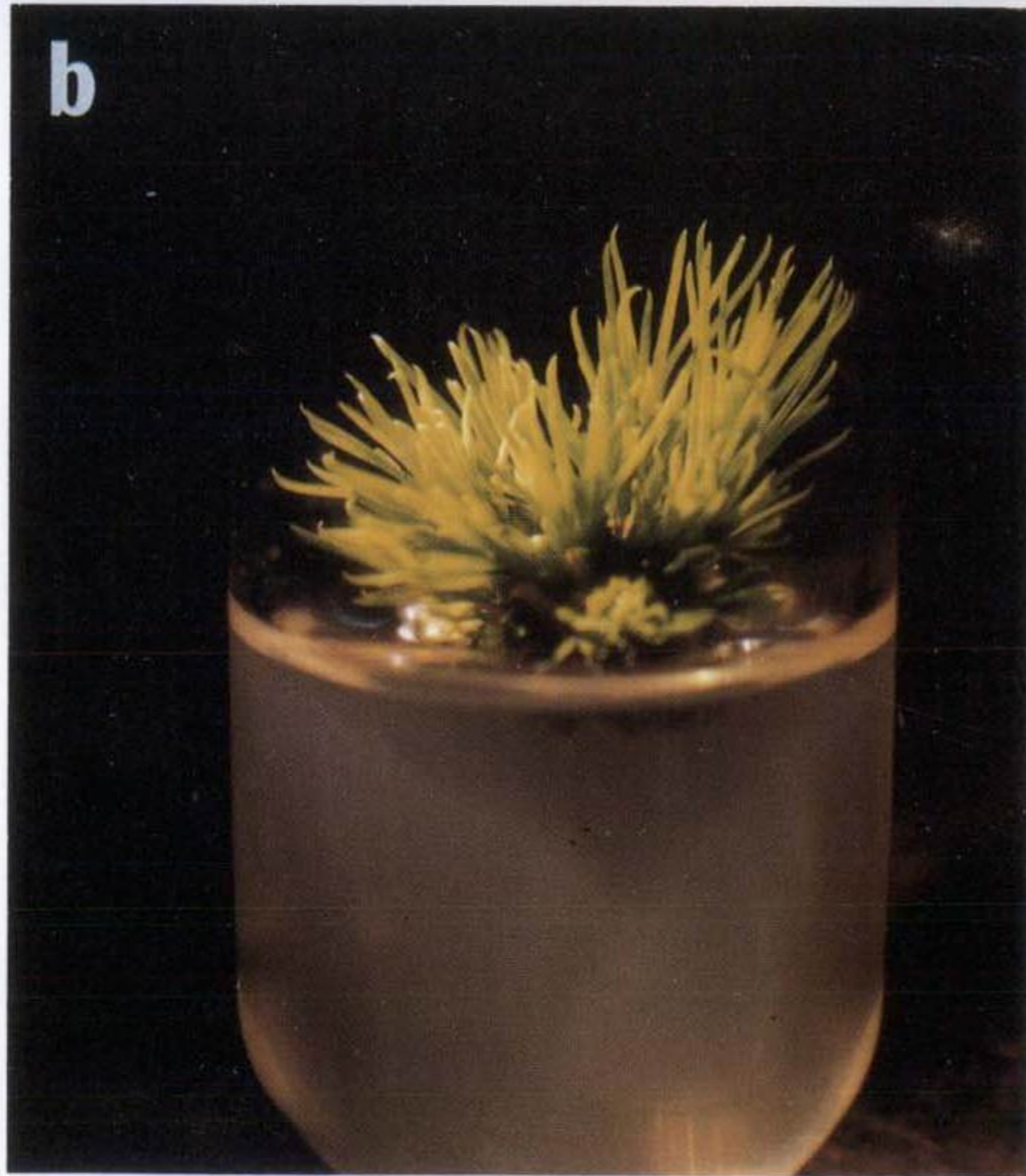
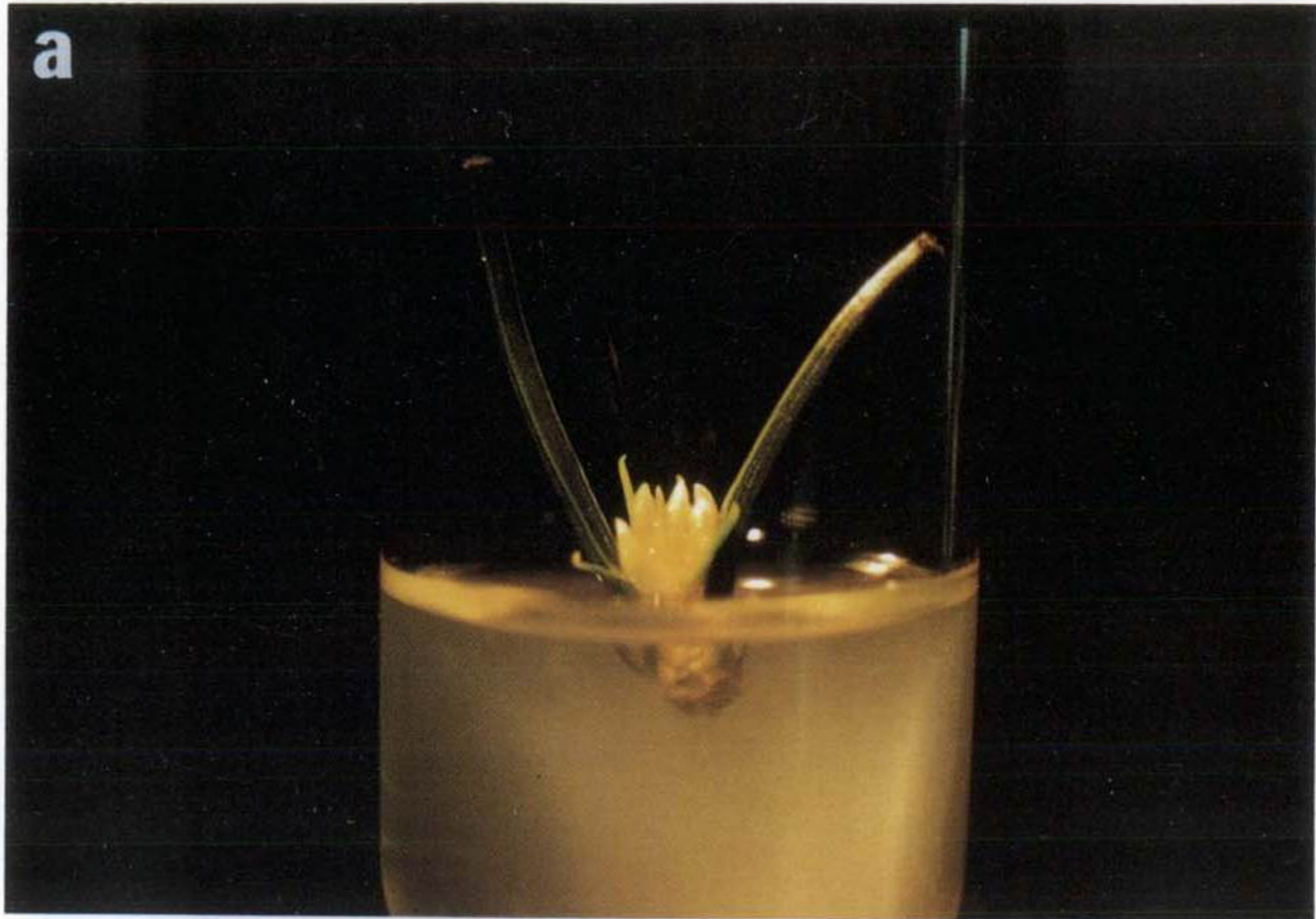


그림 4. 엽속배양에 의한 다경줄기 유도

(a) 엽속유래의 줄기    (b) 유도된 다경줄기

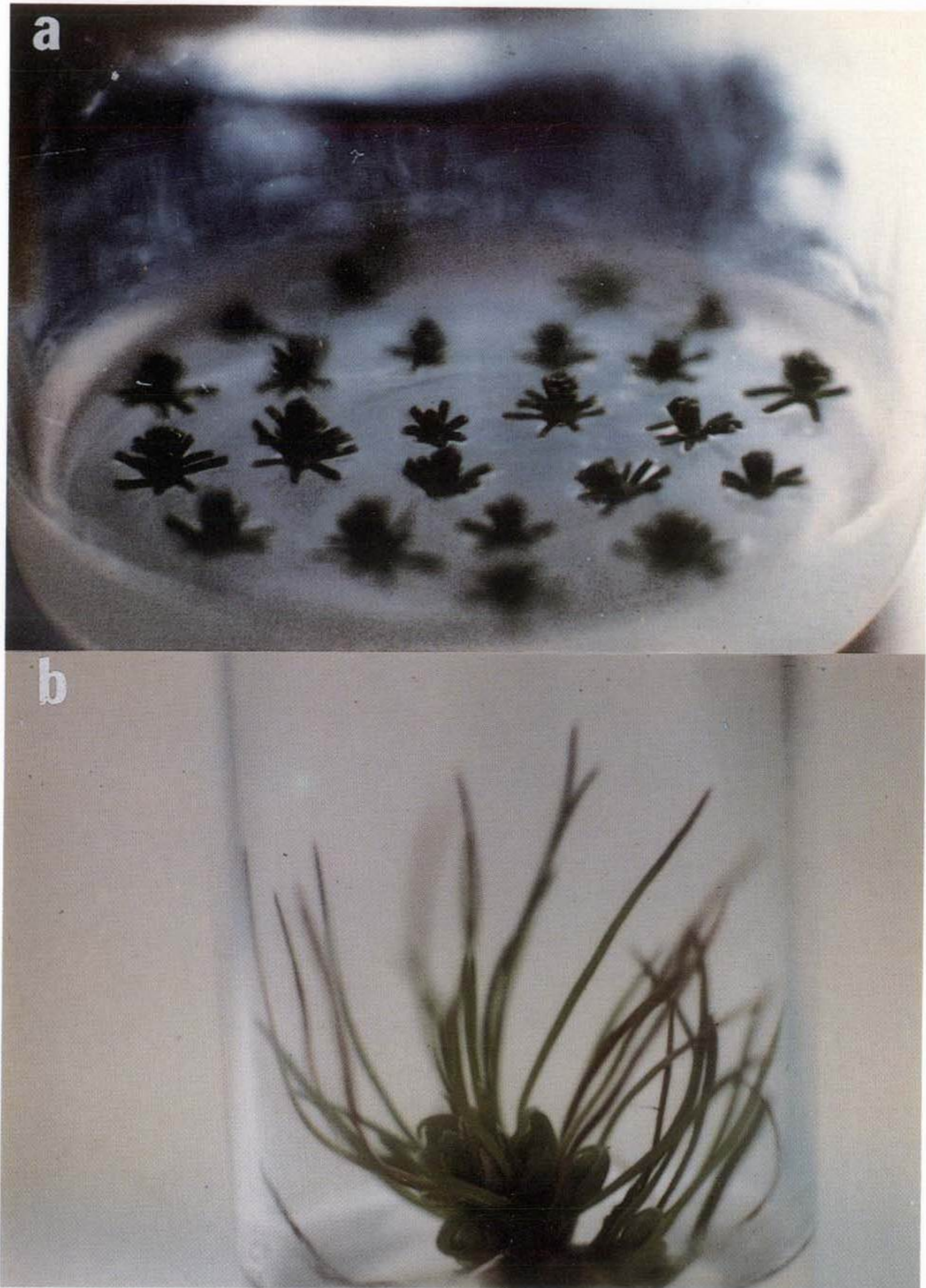


그림 5. Seedling explant로 부터 다경줄기 유도

(a) 시료치상

(b) 유도된 다경줄기