

*Petunia hybrida*에 *Agrobacterium*으로 도입된 *bar* Gene의 발현과 후대검정

하영민³, 김종철², 이상우¹, 이신우³, 김주현^{1*}

¹경상대학교 원예학과, ²경상대학교 응용생명과학부, ³진주산업대학교 작물생명과학과

Expression and Inheritance of *bar* Gene in *Petunia hybrida* Transformed with *Agrobacterium*

Young-Min Ha³, Jong-Chul Kim², Sang-Woo Lee¹, Shin-Woo Lee³, Zoo-Hyeon Kim^{1*}

¹Department of Horticulture, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

²Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

³Department of Crops Biotechnology, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea

ABSTRACT This experiment was carried out to confirm the stability of *bar* gene introduced into petunia plant through *Agrobacterium*-mediated transformation. Twenty-five transgenic plants (T_0), a number of T_1 plants gained by selfing of T_0 plants, back cross (BC_1) populations to wild type and F_1 plants between different T_0 plants were prepared, and polymerase chain reaction (PCR), PCR-Southern blot analysis, and field test with 0.1% Basta[®] treatment were done. The results of PCR, PCR-Southern blot hybridization, and field test indicated that *NPTII* and *bar* gene introduced into the genome of petunia plants were stably transmitted to their progenies, and conferred the plants resistance to herbicide, Basta[®].

Key words: Back cross, Basta[®] herbicide, PCR-Southern blot

서 론

남아메리카 원산의 가지과에 속하는 페튜니아는 조직배양 시, 재분화율이 높아 조직배양 및 형질전환실험에 많이 이용되고 있다 (Michael et al. 1980; Napoli et al. 1990). 지금까지 페튜니아의 형질전환에 관한 연구는 제초제 근사미 (glyphosate) 저항성 계통육성 (Shan et al. 1986), 옥수수 유전자를 이용한 새로운 화색 계통육성 (Meyer et al. 1987), GUS 유전자의 도입 (Chung et al. 1992), bialaphos 제초제 저항성 유전자 도입 (Aeom et al. 1996), *rol C* 유전자 도입 (Chung et al. 1999), 옥수수 유동유전자 Ac를 이용한 유전자 tagging (Ahn et al. 1993) 등 다수의 보고가 있다.

제초제 저항성은 형질전환대상형질 중 가장 실용성이 높아 2002년도 말 전 세계의 유전자변형 (Genetically Modified: GM) 식물의 총 재배면적 (14,500만 에이커)의 대부분을 차지하고 있다 (James 2003). 제초제 저항성유전자 재배작물로는 콩이 9,020, 옥수수가 3,060, 면화가 1,680 에이커의 순이라고 보고되었다 (James 2003). 국내의 경우에도 벼 (Lee et al. 1998; Kwon et al. 2000), 페튜니아 (Chung et al. 1992; Aeom et al. 1996), 현사시나무 (Oh et al. 1999) 등에서 성공적인 결과가 발표된 바 있다. 그러나 상당수의 작물에서 형질전환이 성공적으로 이루어져 이미 재배까지도 되고 있음에도 불구하고 대부분의 형질전환연구에서는 도입 당대의 외래유전자의 확인과 발현 여부를 검정하는 정도를 발표하고 있으며 (Chung et al. 1992; Aeom et al. 1996), 지속적인 재배에 있어서 절대적으로 필요한 제초제 저항성의 안정적 유전성에 관한 후대검정실험에 대한 보고는 많지 않다.

본 연구는 향후 국내에 수입될 것으로 예상되는 다양한 의

*Corresponding author Tel 055-751-5488 Fax 055-751-5483
E-mail zeekim@nongae.gsnu.ac.kr

국산 유전자변형식물과 경쟁할 수 있는 GM작물의 개발을 위한 기초연구로서 페튜니아를 재료로 하여 제초제 저항성 유전자 (*bar*)를 도입시키고 이들의 자가수분, 교배 등을 통해 도입된 유전자의 후대에서의 유전적 안정성을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

경상대학교 원예학과 육종연구실에서 보유하고 있는 *Petunia hybrida* 육성계통 중 GP538계통을 사용하였다. 종자는 무균상에서 70% ethyl alcohol (EtOH)에 30초~1분 정도 침지한 후 2% 상업용 표백제 (유한락스: 유효염소 함유량 4%)용액으로 3~4분 동안 교반하면서 표면 살균한 다음 멸균수로 3번 세척하였다. 이후 페트리디쉬 (직경 8.5 cm)에 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지를 20 mL 분주한 고체배지위에 세척된 종자 50립씩 파종하였다. 배양실의 환경조건은 온도 $25 \pm 3^\circ\text{C}$, 습도 $60 \pm 5\%$ 였고, 오스람형광등 [(OSRAM)]으로 16시간 조명하였다.

Agrobacterium 배양

실험에 사용된 *Agrobacterium tumefaciens* 균주는 *bar* 유전자가 삽입된 binary vector pGA643을 내재하고 있는 host strain EHA105였다 (Figure 1). 이 균주는 경상대학교 식물분자생물학 및 유전자조작연구소에서 분양받았다.

A. tumefaciens EHA105는 kanamycin 50 mg/L가 첨가된 LB 고체배지 (sodium chloride 5 g/L, tryptone 5 g/L, bacto-yeast-extract 10 g/L, agar 1.5%)에 형성된 single colony를 취하여 kanamycin 50 mg/L가 첨가된 LB액체배지에 옮겨 28°C에서 170 rpm으로 2일간 암상태에서 진탕배양하였다.

형질전환

형질전환은 Kim (1998)과 Michelmores 등 (1987)의 방법을 사용하였으며, 발아 후 7일된 식물의 자엽에 예리한 편으로 상처를 준 다음, MS기본고체배지에 2 mL의 1/2 MS액체배지

를 넣고 살균된 여과지를 한장 놓은 뒤 그 위에 절편체를 치상하여 2일간 암상태에서 전배양한 후 *Agrobacterium*를 접종시키고 2일간 공동배양하였다. 공동배양은 대수증식기까지 증식시킨 배양액($\text{OD}_{600} = 0.5 \sim 1.0$)을 1/2MS 액체배지로 50배 희석하여 자엽절편체를 2시간 동안 침지하여 *Agrobacterium*를 접종시킨 후 여분의 *Agrobacterium*배양액을 여과지로 제거한 후 RM배지 (MS기본배지, IAA 1 μM , BA 5 μM)에 접종된 자엽절편체를 치상하여 암상태에서 2일간 배양하였다. 공동배양 후 절편체 조직에 침투된 *Agrobacterium*의 제거를 위해 이후 사용된 모든 배지에 carbenicillin 500 mg/L 또는 250 mg/L을 첨가하였다. 재분화 및 1차 선발배지인 SM1 (RM, kanamycin 200 mg/L, carbenicillin 500 mg/L)에서 선발된 캘러스로부터 유기된 shoot를 kanamycin의 농도를 낮춘 2차 선발배지인 SM2 (RM, kanamycin 100 mg/L, carbenicillin 250 mg/L)로 옮기고 2주 간격으로 계대배양하였다. 발근을 유도하기 위해 carbenicillin 250 mg/L을 함유하고 있는 MS기본고체배지에 옮겨 발근이 된 식물체들은 2~3주 동안의 순화과정을 거친 후 화분에 이식하여 온실에서 생육시켰다.

도입된 유전자의 확인

식물체의 genomic DNA는 Edwards 등 (1991)의 방법을 변형시켜 페튜니아의 어린 잎에서 추출하였다. PCR은 buffer용액 (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100)에 MgCl_2 25 mM, *NPTII* 또는 *bar* primer 8 pmol, dNTPs 2.5 mM, 그리고 Taq DNA polymerase 0.5 unit을 혼합 후 mineral oil을 첨가하여 수행하였다. Template DNA의 양은 *NPTII* 유전자 확인시는 100 ng, *bar* 유전자 확인시는 2 μg 을 각각 사용하였다. *NPTII* 유전자의 primer 염기서열은 forward, 5'-GTG GAG AGG CTA TTC GGC TA-3', reverse, 5'-CCA CCA TGA TAT TCG GCA AG-3'으로 PCR 수행 시 551 bp의 산물을 증폭하도록 하였으며, 제초제 저항성 유전자 *bar*의 primer 염기서열은 forward, 5'-GGT CTG CAC CAT CGT CAA-3', reverse, 5'-TCA GAT CTC GGT GAC GGG CA-3'으로 PCR 수행시 492 bp의 산물을 증폭하도록 각각의 primer를 제작하였다. *NPTII* 유전자의 PCR 조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후 94°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 elongation으로 하여 40 cycles을 반응시켰다. *bar* 유전자의 PCR 조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후 94°C에서 30초간 denaturation, 56°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 elongation으로 하여 40 cycle을 반응시켰다. 두 유전자에 대해 40 cycles이 끝난 후 72°C에서 10분간 post-elongation 시켜 증폭된 DNA를 0.5 $\mu\text{L}/10$ mL ethidium bromide (EtBr)가 포함된 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

PCR-Southern blot 분석은 Southern (1975)과 Shon 1998)의 방법에 따라 수행하였다. *bar* primer의 PCR산물을 0.8% agarose

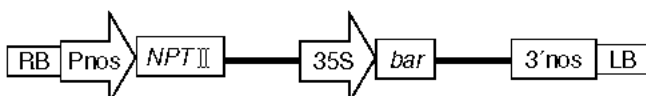


Figure 1. A schematic diagram of the plant expression vector, pGA 643, for the transformation of *Petunia hybrida*. RB, right border; LB, left border; *NPTII*, neomycin phosphotransferase gene II; 35S, cauliflower mosaic virus 35S promoter; Pnos and 3'nos, the promoter and the terminator of nopaline synthase (NOS) gene

gel에서 전기영동한 후, gel을 salt transfer 방법을 이용하여 nylon membrane (Hybond-XL, Amersham)에 transfer시켰다. DNA가 전이된 membrane을 3MM paper에 올려놓고 건조시킨 후 UV transilluminator로 2분 동안 cross-linking시켰다. Pre-hybridization은 6x SSC, 5% dextran sulfate, 0.1% SDS 혼성화용액을 넣고 60°C에서 1시간 동안 수행하였으며, pGA643-bar 유전자를 ³²P로 labelling 한 probe DNA와 overnight하여 hybridization 시킨 후 2x SSC, 0.1% SDS로 5분씩 2회, 0.5x SSC, 0.1% SDS로 65°C에서 15분씩 1회, 0.1x SSC, 0.1% SDS로 65°C에서 15분씩 1회로 하여 세척한 후 X-ray film (Kodak X-OMAT)에 감광시킨 후 band를 확인하였다.

포장검정

삽입된 transgene (bar)이 세대를 진전시켜도 안정적으로 유전되는지를 알아보기 위해 매 세대 식물체에 제초제를 처리하였다.

먼저, 제초제 저항성 판정에 적합한 제초제 농도를 확인하기 위해 포장에서 본엽 3~4매인 야생형 식물체에 각각 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25% (v/v)의 Basta® [(⁺) 경농]를 처리하였다. 0.1% 이상 농도에서는 처리 하루 이내에 피해증상이 나타나기 시작하여 3일째 증상이 극심해지면서 모두 고사하였다. 보다 낮은 0.05% 농도에서는 초기에 피해증상을 나타내다가 어느 정도 시간이 경과함에 따라 엽액 부위에서 새로운 잎이 분화되었다. 따라서 이 농도는 제초제 저항성 선발농도로 사용하기에는 부적절하다고 판단되어 높은 단계인 0.1%를 선발 적정 농도로 결정하였다.

T₀ 식물체들을 자가수분하여 T₁종자를, T₀ 식물체를 대조구인 야생형 식물체와 교배시켜 여교잡 종자 (BC₁)를, T₀ 식물체들간의 교배를 통하여 교잡 (F₁)종자를 각각 얻었다. 종자는 128구 tray에 파종하였으며, 상토는 토질이 (⁺) 신안그로를 사용하였다. 파종 후 4주째 (본엽 2~3매)에 Basta® 0.1% (v/v)을 분무처리하였으며, 처리 후 5일째에 제초제 저항성과 감수성 식물체의 비를 조사하였다. 분리비 검정은 X²-test를 이용하였다.

결과 및 고찰

형질전환체 선발

페튜니아의 자엽을 NPTII 유전자와 bar 유전자를 내재하고 있는 A. tumefaciens와 공동배양한 후, 1차 선발배지로 옮겨왔을 때 7~10일 후부터 캘러스가 형성되기 시작하면서 다수의 신초가 빠르게 유도 되었다. 그러나 Agrobacterium을 접종하지 않은 절편체는 kanamycin선발배지에서 캘러스가 발생되지 않고 서서히 갈색으로 변하여 7일 이내에 고사하였다. 1차 선발

배지에서 재분화되어 저항성을 보인 신초들을 kanamycin에 의한 발근억제현상을 방지 (Valles and Lasa 1994; Hadfi and Batschauer 1994; Aeom et al. 1992)하기 위해 1차 선발배지보다 항생제 농도가 낮은 kanamycin (100 mg/L)과 carbenicilin (250 mg/L)이 함유된 2차 선발배지로 옮겨 주었다. 2주 간격으로 계대배양과정을 거쳐 carbenicilin (250 mg/L)만 함유된 MS기본고체배지에서 발근을 유도시켜 형질전환이 된 것으로 추정되는 식물체들을 확보할 수 있었다. 이 식물체들은 포트 (직경 10.9 cm)에 옮겨 심은 후 미스트장치가 있는 순화실에서 2주간 순화시키고, 이후 이들에 대해 비선택성제초제인 Basta® (0.1%)를 살포하여 제초제 저항성식물체를 선발하였다 (Figure 2). 1차 형질전환 실험에서는 사용된 30개의 절편체로부터 96개의 재분화된 식물체들을 얻었으나 제초제 처리 후 살아남은 식물체는 두 식물체뿐이어서 재분화시켜 포장에 나온 식물체들 중 형질전환에 성공한 식물체의 비율은 2.08%에 불과하였다. 2차 형질전환 실험에서는 60개의 절편체로부터 225개의 재분화된 식물체들을 얻었고 이들 중 23개의 식물체가 제초제에 대해 저항성을 보여 10.22%의 형질전환율을 보였다 (Table 1). 이들 식물체들 중 일부는 Basta® 처리시 앞에서 부분적으로 백화현상을 보이는 식물체들도 있었으나 시간이 경과함에 따라 정상적으로 생장하는 것으로 조사되었다.

이와 같이 1~2차 실험을 통하여 kanamycin배지에서 선발되었음에도 불구하고 재분화된 식물체 모두가 Basta®에 대해

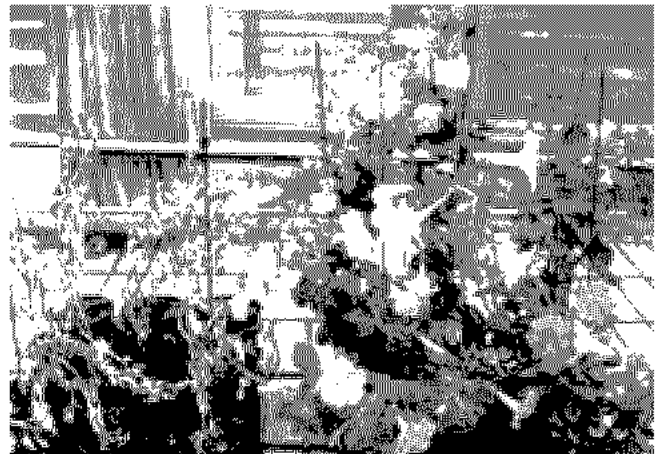


Figure 2. Response of wild type plants (left) and transgenic plants (right) at 7 days after 0.1% Basta® treatment in the greenhouse.

Table 1. Transgenic plants derived from petunia leaf disc cocultivated with A. tumefaciens.

No. of Explants	No. of Shoots	No. of regenerated ^{a)} Plants (A)	Transformed ^{b)} plants (B)	B/A (%)
30	175	96	2	2.1
60	418	225	23	10.2

^{a)}Total plants transplanted in a green house

^{b)}Number of plants survived after 0.1% Basta® treatment in a greenhouse

저항성을 보이지 않고 일부 식물체만 저항성을 보이는 것은 캘러스단계에서 형질전환된 kanamycin 저항성 세포에서 생성된 물질로 인해 비형질전환된 세포가 분화되어 식물체가 성장한 것이거나 (Aeom et al. 1996; Chung et al. 1992), *NPTII* 유전자와 *bar* 유전자는 삽입되었으나 *bar* 유전자가 발현되지 않는 식물체들이 포함된 것으로 (Ulian et al. 1994) 사료되었다.

도입된 유전자의 확인

형질전환실험에서 얻어진 321개체의 재분화 식물체들에 대해 제초제 처리 후, 저항성을 보인 25개체 중 무작위로 12개체를 선택하여 PCR을 수행하였다. *bar* primer를 사용한 PCR 분석 결과, 제초제에 저항성을 보였던 12개체의 T_0 식물체들에서는 *bar* 유전자의 marker size와 동일한 위치에서 492 bp의 band가 확인되었으나 야생형에서는 band가 나타나지 않았다 (Figure 3). *bar* 유전자가 후대에 정상적으로 전달되는지의 여부를 확인하기 위하여 형질전환체로 추정된 두 개의 식물체 (T_01 , T_02)들을 자가수분하여 얻은 T_1 세대 식물체들 중에서 제초제 저항성을 보인 5개체를 각각 선택하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, T_1 세대 식물체들은 *NPTII* 유전자와 *bar* 유전자의 marker size에 해당하는 551 bp와 492 bp에서 특이 band가 각각 확인되었으나 야생형에서는 나타나지 않았다 (Figure 4). 따라서 kanamycin (200 mg/L)을 함유한 배지에서 파종후 저항성을 보인 개체들에 대해, 다시 Basta® (0.1%)를 처리하여 생존 하였던 개체들은 T_0 식물체이든 T_1 식물체들이든 모두 *NPTII* 유전자와 *bar* 유전자를 함유하고 있는 것으로 확인되었으므로, 이들 삽입된 유전자가 한 세대가 진전되어도 안정적으로 전달됨을 알 수 있었다.

Figure 5는 대조구인 야생형에 T_0 식물체를 여교잡하여 얻은 BC_1 집단 ($WT \times T_01$)개체들 중에서 kanamycin과 Basta®에 대해 저항성을 보인 11개의 식물체들과 감수성을 보인 1개의 식물체에서 분리한 DNA를 *NPTII* primer와 *bar* primer를 이용하여 PCR을 수행하고 전기영동한 결과이다. 저항성을 보인 11개의 식물체들에서는 transgene인 *NPTII* 유전자의 marker size에 해당하는 551 bp와 *bar* 유전자의 marker size에 해당하는 492 bp에서 특이 band가 각각 확인되었으나 야생형과 감

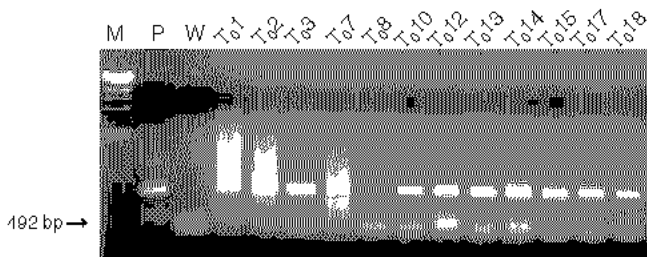


Figure 3. PCR products amplified from genomic DNA of putative transgenic plants (T_0) with *bar* primer. M, λ /HindIII size marker; P, positive control of pGA643; W, wild type plant; Lane 4-15, putative transgenic plants (T_0).

수성을 보였던 1개의 식물체에서는 모두 band가 나타나지 않았다.

한편 삽입된 유전자들이 후대에서 일반교배에서의 분리와 같은 분리양상을 따르는지를 PCR 수준에서 확인하기 위하여 형질전환개체로 선발된 두개의 독립적인 T_0 세대 형질전환체들을 서로 교배하여 얻은 F_1 집단 ($T_02 \times T_01$)에서 제초제 처리를 하기 전에 무작위로 12개의 식물체를 선발한 후 PCR 수행한 결과, 선발한 12개의 F_1 식물체들 중 9개체에서 *NPTII* 유전자의 marker size에 해당하는 551 bp와 *bar* 유전자의 marker size에 해당하는 492 bp에서 특이 band가 각각 확인되었으나, 야생형과 3개의 F_1 식물체 [($T_02 \times T_01$)-31, ($T_02 \times T_01$)-44, ($T_02 \times T_01$)-45]에서는 이들 특이 band가 없는 것으로 확인되었다 (Figure 6). 여기서 T_01 식물체와 T_02 식물체는 *NPTII* 유전자와 *bar* 유전자에 있어서 각기 hetero 상태이므로 이들 간의 교잡에서 얻은 F_1 집단은 *NPTII*와 *bar* 유전자에 대해서 일반교

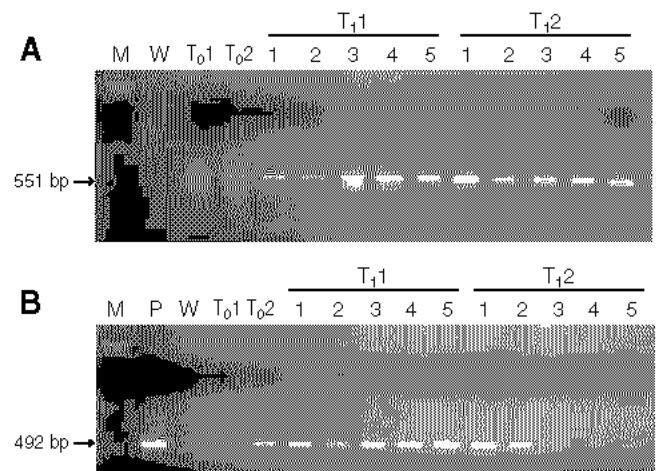


Figure 4. PCR products amplified from genomic DNA of wild type plant and two individual T_1 transgenic plants of petunia with *NPTII* primer (A) and *bar* primer (B). M, λ /HindIII size marker; P, positive control of pGA643; W, wildtype plant; T_01 and T_02 , two primary transgenic plants; T_11 (1-5) and T_12 (1-5), plants obtained from selfing of T_01 and T_02 plant, respectively.

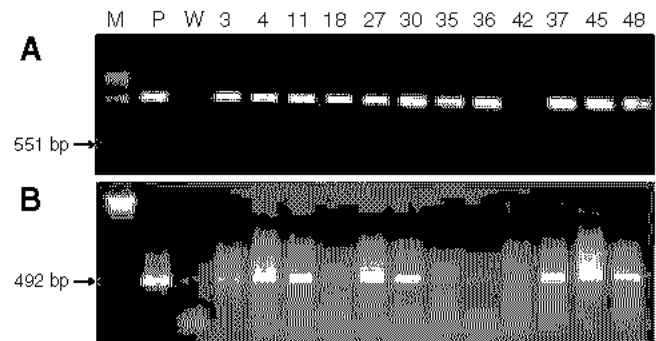


Figure 5. PCR products amplified from genomic DNA of back crossed plants (BC_1) of primary transgenic petunia plants (T_01) to wild type plant with *NPTII* primer (A) and *bar* primer (B). M, λ /HindIII size marker; P, positive control of pGA643; W, wild type plant; Lane 4-15, BC_1 plants of transgenic plants to wild type plant.

배에서의 F₂집단의 분리양식과 같은 분리현상을 보일 것으로 예상할 수 있다. 이들의 특이 band 존재유무로 본 분리양식은 저항성(9) : 감수성(3)으로 정확하게 3 : 1의 분리비에 일치하고 있다. 따라서 이입된 *bar* 유전자와 *NPTII* 유전자들이 모두 교잡에 의해서도 정상적인 식물체들의 형질유전 분리양식과 동일하게 후대에 유전되고 있음을 알 수 있다.

PCR 산물의 Southern blot hybridization 분석

PCR 수행결과 확인된 산물들이 형질전환 시 이입시킨 pGA643-*bar* 유전자가 증폭된 것인지를 재확인하기 위해 형질 전환된 개체들 중 T₀15개체의 T₁세대, T₀2와 T₀1을 교배한 F₁ 개체들, 그리고 T₀1을 야생형에 역교잡한 BC₁개체들에 대해 Southern blot 분석을 하였다 (Figure 7). 그 결과, 형질전환이 확인된 제초제 저항성 식물체들은 PCR 수행결과와 동일한 marker size에서 특이 band를 보였다. 반면 대조구로 사용된

야생형과 PCR에서 492 bp의 위치에서 band가 확인되지 않았던 개체들 (A; W, 17, 31 : B; W, 31, 44, 45 : C; W, 42)은 Southern blot 분석에서도 특이 band가 확인되지 않았다. 따라서 자가수분한 T₁세대나, 서로 다른 T₀세대 식물체들간의 잡종 F₁ 세대, 또는 T₀ 식물체와 야생형간의 역교잡 집단 (BC₁) 모두에서 제초제에 저항성을 가지는 개체들은 삽입시킨 *bar* 유전자를 내포하고 있는 것으로 확인되었다.

형질전환체의 후대검정

PCR과 PCR-Southern blot을 통해 유전자 도입이 확인되어진 형질전환 개체들의 세대진전에 따른 유전적 안정성을 검정하고자 포장에서의 각 개체들에 대한 제초제저항성을 조사하였다. Table 2는 형질전환실험에서 얻은 T₀1 식물체와 T₀2 식물체의 자가수분 (T₁1, T₁2), 대조구인 야생형과의 역교잡 (BC₁), 그리고 T₀1 식물체와 T₀2 식물체간의 교배에서 얻은 F₁

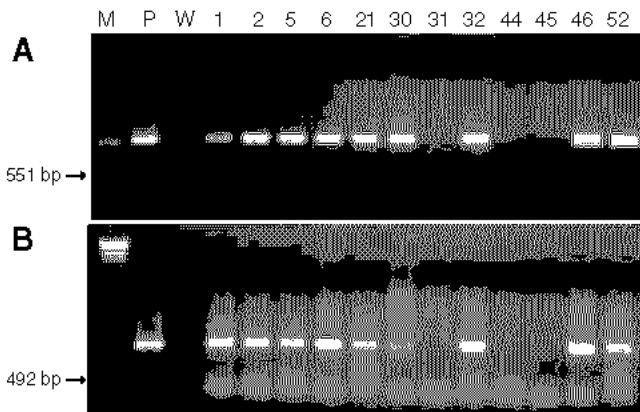


Figure 6. PCR products from F₁ plants between two different transgenic petunia plants, T₀2 and T₀1, with *NPT II* primer (A) and *bar* primer (B). M, λ /Hind III size marker; P, positive control of pGA643; W, wild type plant; Lane 4-15, transgenic plants (F₁).

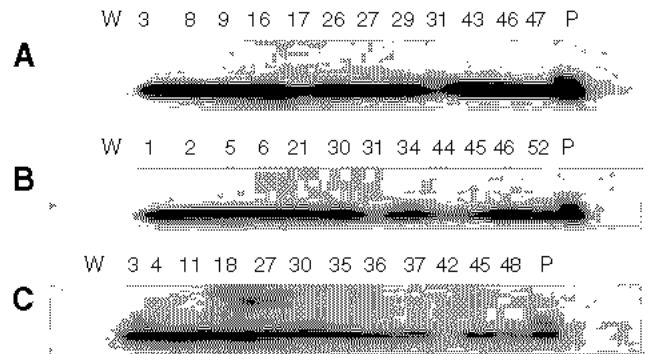


Figure 7. Southern blot hybridization of PCR-amplified DNA from Basta-resistant petunia. PCR products were hybridized with plasmid pGA643 as a probe. Lane 1, wild type; lane 14, plasmid DNA (pGA643). A, Lane 2-13, T₁15 plants derived from selfing of T₀15 plant; B, Lane 2-13, F₁ plants derived from hybridization between two different transgenic plants, T₀2 and T₀1; C, Lane 2-13, back cross plants (BC₁) of primary transgenic plants (T₀1).

Table 2. Segregation of kanamycin and Basta[®] resistance in T₁1, T₁2, Wild×T₀1, and F₁ populations obtained from two petunia (T₀1 and T₀2) transformed with *A. tumefaciens*.

Accessions	No. of Plants	Observed		X ²	P	Observed		X ²	P
		Km ^R	Km ^S			Bar ^R	Bar ^S		
Wild type	80	0	80	-	-	-	-	-	-
T ₁ 1	81	61	20	0.005 (3:1)	0.9-0.97	(60) 60	(1) 21	0.005(3:1)	0.9-0.97
T ₁ 2	80	-	-	-	-	60	20	0.000(3:1)	0.99-1.00
Wild×T ₀ 1	59	30	29	0.016 (1:1)	0.9-0.97	(29) 29	(1) 30	0.016(1:1)	0.9-0.97
F ₁ (T ₀ 2×T ₀ 1)	73	56	17	0.057 (3:1)	0.5-0.9	-	-	-	-

Km^R: kanamycin resistance, Km^S: kanamycin sensitive.

Bar^R: Basta[®] resistance, Bar^S: Basta[®] sensitive.

Seeds were plated on MS medium containing 200 mg/L kanamycin for 3 weeks in vitro.

Seedlings were sprayed with 0.1% Basta[®] in a greenhouse.

집단의 kanamycin과 Basta[®]에 대한 저항성 분리비를 조사한 결과이다. T₁, BC₁, F₁, 그리고 야생 형종자를 kanamycin이 함유된 선발배지에 파종하였던 바, T₁집단은 kanamycin 처리에서 저항성 개체와 감수성 개체의 분리비가 61 : 20으로 단인자 유전분리비에 해당하는 3 : 1로 나타났으며, kanamycin 저항성 개체를 다시 제초제인 Basta[®] (0.1%)로 처리한 결과 감수성을 가지는 개체는 1개뿐으로 Basta[®]에 대한 T₁집단의 분리비는 60 : 21로 3 : 1의 분리비에 잘 일치하였다. 또한 T₁종자에 대한 kanamycin 감수성을 조사하지 않고 바로 Basta[®]를 처리한 T₂집단에서도 저항성과 감수성이 정확하게 3 : 1로 분리하였다. 한편 야생형과 T₀1 개체간의 여교잡집단 (BC₁)의 종자에 대한 kanamycin 처리결과 저항성 개체들과 감수성 개체들이 각각 30과 29개체로 1 : 1의 분리비에 잘 일치하였으며 ($X^2 = 0.016, p = 0.9 - 0.97$), kanamycin 저항성 개체들을 Basta[®]로 처리한 결과 kanamycin 저항성 개체들 중 1개만이 Basta[®]에 대해 감수성을 가진 것으로 나타났다. 따라서 이를 kanamycin 처리에서 감수성을 가졌던 29개체들과 합쳐서 고려할 경우 역시 Basta[®]에 대한 저항성과 감수성 개체비는 29 : 30으로 1 : 1의 분리비에 잘 일치하였다 ($X^2 = 0.016, p = 0.9 - 0.97$). T₀2와 T₀1간의 교잡으로 얻은 F₁집단에서의 kanamycin 저항성과 감수성 개체비는 각각 56 : 17로 저항성과 감수성이 3 : 1로 분리하는 것으로 나타났다. 그러나 대조구로 사용된 야생형 집단은 기내 kanamycin 처리에서나 포장 Basta[®] 처리 (자료 미제시)에서 모두 백화되어 고사하였다.

따라서 T₀1과 T₀2 두 형질전환체의 genome내로 도입된 NPTII 유전자와 bar 유전자는 모두 T₁세대에 정상적으로 전달되어 발현됨을 확인할 수 있었다. 또한 두 형질전환체 T₀1과 T₀2 내에는 각기 한 copy씩의 NPTII 유전자와 bar 유전자가 삽입된 것으로 추정되며, 이 두 T₀1과 T₀2 식물체는 이들 유전자에 대해 모두 hetero 상태를 확인할 수 있었다. *A. tumefaciens*를 이용한 식물체내에 도입된 외래유전자는 우성으로서 후대에 유전되므로, 식물의 핵 속에 삽입되는 외래유전자가 한 개라면 멘델의 유전법칙에 따라 이론적으로 3 : 1로 분리될 것이라는 Choi와 Kim (1993)의 설명과 잘 일치하고 있다. 따라서 T₀1과 T₀2의 자식이나 여교잡, 교잡세대에서는 이입된 유전자가 일반 형질의 유전과 똑같은 양식으로 안정적인 유전을 하고 있는 것으로 나타났다. 그러나 식물체 내로 도입된 유전자의 후대검정에서 분리양상이 일반 교배에서의 Mendel식 분리양상과는 달랐다는 보고 (Rotino et al. 1992; Zheng et al. 1997)들도 있다.

배양한 후 kanamycin 저항성 개체를 얻고, 이들 식물체들에 대해 온실에서 Basta[®] (0.1%)를 처리하여 제초제 저항성을 가진 개체들을 최종 선발하였다. 선발된 형질전환 식물체들 (T₀세대)과 이들의 자가수분으로 얻은 T₁세대, 야생형과의 여교잡에 의하여 얻은 BC₁세대, 그리고 T₀ 식물체들 간의 교잡으로 얻은 F₁ 식물체들에 대하여 PCR과 PCR-Southern 분석, 그리고 제초제 Basta[®]를 포장에서 처리하여 본 결과, NPTII 유전자와 bar 유전자가 성공적으로 도입되어 있고 교잡이나 세대진전에서도 안정적으로 발현됨을 확인할 수 있었다.

인용문헌

- Aeom SI, Park SK, Lim YP, Lee CH, Kim HJ, Kim HR, Lee HY (1996) Development of bialaphos-resistant petunia *hybrida* by introduction of the *bar* gene using *Agrobacterium tumefaciens*. Korean J Plant Tiss Cult 23: 177-181
- Ahn BJ, Noh HY, Choi YY (1993) T-DNA-mediated transformation of maize transposable element for petunia gene tagging. Korean J Plant Tiss Cult 20: 9-14
- Choi SJ, Kim JC (1993) Transmission of insecticidal endotoxin gene in selfpollinated progeny of transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*). Korean J Plant Tiss Cult 20: 321-327
- Chung JD, Kim CK, Kwon MY, Jee SO (1992) Putative GUS (β -glucuronidase) gene transfer into petunia *hybrida* using *Agrobacterium tumefaciens*. Korean J Plant Tiss Cult 19: 7-11
- Chung JD, Kim KM, Nam YY, Kim CK, Chung WI (1999) Introduction of rolC gene into petunia *hybrida*. Korean J Plant Tiss Cult 26: 21-26
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res 19: 1349
- Hadfi K, Batschauer A (1994) *Agrobacterium*-mediated transformation of white mustard (*Sinapis alba* L.) and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Rep 13: 130-134
- James C (2003) Global review of commercialized transgenic crop. ISAAA briefs. No. 24
- Kim YH (1998) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfer of flavonoid 3',5'-hydroxylase gene into *Gerbera hybrida*. Korean J Breed 30: 325-330
- Kwon YS, Lee HS, Kim KM, Lee BH, Jo JK, Sohn JK (2000) Effects of variety and acetosyringone influencing transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Korean J Plant Tiss Cult 27: 95-100
- Lee HY, Lee CH, Kim HI, Han WD, Choi JE, Kim JH, Lim YP (1998) Development of bialaphos-resistant transgenic rice using *Agrobacterium tumefaciens*. Korean J Plant Tiss Cult 25: 283-288
- Meyer P, Heidmann I, Forkmann G, Saedler H (1987) A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a

적 요

*A. tumefaciens*을 이용하여 도입된 유전자의 유전적 안정성을 확인하고자 제초제 저항성 유전자(*bar*)와 NPTII 유전자를 가진 *A. tumefaciens* EHA105과 페튜니아 자엽 절편체를 공동

- maize gene. *Nature* 330: 677-678
- Michael AZ, Hanson MR, Skvirsky RC, Ausubel FM (1980) Anther culture of petunia: genotypes with high frequency of callus, root, or plantlet formation. *Z Pflanzenphysiol Bd* 100(S): 131-146
- Michelmore R, Marsh E, Susan Seely, Benoit Landry (1987) Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 6: 439-442
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-479
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-289
- Oh KE, Yang DC, Moon HK, Park JI (1999) Transformation of *Populus alba* × *Populus glandulosa* using phosphinothricin acetyltransferase gene. *Korean J Plant Tiss Cult* 26: 163-169
- Rotino GL, Perrone D, Ajmone-Marsan P, Lupotto E (1992) Transformation of *Solanum integrifolium* Poir via *Agrobacterium tumefaciens*: Plant regeneration and Progeny analysis. *Plant Cell Rep* 11: 11-15
- Shan DM, Horsch RB, Klee HJ, Kishore GM, Winter JA, Turner NE, Hironaka CM, Sanders PR, Gasser CS, Aykent S, Siegel NR, Rogers SG, Fraley RT (1986) Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233: 479-481
- Shon YG (1998) Factors involved in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). Ph. D. Thesis. Gyeongsang National University. Jinju.
- Southem EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 505-517
- Ulian EC, Magill JM, Smith RH (1994) Expression and inheritance pattern of two foreign genes in petunia. *Theor Appl Genet* 88: 433-440
- Valles MP, Lasa JM (1994) *Agrobacterium*-mediated transformation of commercial melon (*Cucumis melo* L., cv. Amarillo Oro). *Plant Cell Rep* 13: 145-148
- Zheng HH, Li Y, Yu ZH, Li W, Chen MY, Ming XT, Casper R, Chen ZL (1997) Recovery of transgenic rice plants expressing the rice dwarf virus outer coat protein gene (S8). *Theor Appl Genet* 94: 522-527

(접수일자 2003년 5월 13일, 수리일자 2003년 6월 14일)