

저온저항성 유전자를 이용한 국화 형질전환

한수곤¹, 최인영^{1*}, 강찬호¹, 고복래¹, 최정식¹, 이왕휴²

¹전라북도농업기술원, ²전북대학교 생물자원과학부

Genetic Transformation of Chrysanthemum with Cold Regulated Gene (BN115)

Soo-gon Han¹, In-young Choi^{1*}, Chan-ho Kang¹, Bok-rai Ko¹, Joung-sik Choi¹, Wang-hyu Lee²

¹Jeollabuk-do Agricultural Research and Extension Services, Iksan 570-704, Korea

²Department of Agricultural Biology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

ABSTRACT With the use of *Agrobacterium* and gene-gun, cold regulated gene (BN115) has been injected in Chrysanthemum leaf disc and transgenic plants have been produced successfully on the selection media containing phytohormone. To determine the presence of the transferred cold regulated gene (BN115) in the transgenic Chrysanthemum, PCR-amplification indicated the presence of that gene. Real-Time PCR for confirmation of the putative transgenic plants was established. The copy number of cold regulated gene (BN115) is extrapolated on the basis of a standard curve. Serial dilutions of known number of gene copies were in triplicates. In this diagram, PCR cycles are plotted against the fluorescence intensity. The cycle at which the fluorescence reaches a threshold cycle is inversely proportional to the starting amount of target DNA.

Key words: Cold regulated gene (BN115), Chrysanthemum transformation, Real-Time PCR

서 론

화훼재배의 주요 품목 중 하나인 국화는 중국, 일본 등 동양권에서 standard를 중심으로, 유럽에서는 spray를 중심으로 발달해왔다. *Dendranthema grandiflorum* "Puma"는 기호성, 착화성, 상품성이 뛰어나며, 화경 4.5 cm, 화심 3~3.5 cm, 화심 색이 황백색 (저온기 녹색)인 특성이 있다. 본 실험에 사용된 BN115 gene은 겨울유채 품종인 Jetneuf 식물체를 2°C조건에서 저온처리한 후 발현되는 유전자를 cloning한 것으로 저온처리 후 24시간 이내에 잎에서 유전자가 발현되는 것으로 보고되고 있다 (Weretilnyk et al. 1993). 현재 유리온실과 비닐하우스 등 국내 총 시설 재배 면적은 10만 4천 ha로 시설내 작물 생육온도를 1°C만 낮추어도 연간 660억원의 보온 경비를 절감할 수 있다 (농림부,

2004). 특히 연일 계속되는 기름값 상승에 따른 농가의 경영비 상승은 저온기 재배작목의 주요 지출비를 차지하여 농산물 가격상승의 원인으로 작용하고 있다. 따라서 저온 저항성 유전자를 이용하여 다양한 작물에 형질전환이 이루어질 경우 보온 경비를 크게 절감할 수 있어 막대한 경제적 가치가 따를 것으로 기대된다.

국화의 genetic transformation의 발달은 전통적 육종의 단점인 불화합성이나 염색체의 배수성 등을 보완하고자 농업적으로 유용한 유전자를 이용하여 내병성, 내충성, 생육연장, 화색변환 등 품종개발을 목표로 시도되어 왔다 (Robinson and Firoozabady 1993). 국화 형질전환에 대한 연구는 지금까지 계속 보고되어 왔으나 (Seiichi et al. 1995; Sherman et al. 1998a,b) 낮은 형질전환율 또는 품종 특성 때문에 널리 이용되지 못해왔다. 한편, *Agrobacterium* 및 bombardment transformation에 의한 일반적인 genetic transformation 방법은 흔히 silencing을 유발하는 multiple transgene copies 결과를 초래하기도 한다 (Li et al. 2004).

*Corresponding author Tel 063-839-0442 Fax 063-839-0449

E-mail: iychoi@jbare.go.kr

유전자 분석에 대한 신속한 검정방법의 요구로 PCR 방법이 이용되어 왔으나, sensitivity와 specificity면에서 형질전환체를 오판하는 경우가 있어 hybridization을 기초로 한 southern, northern, western blotting 등에 의한 방법으로 재확인을 해왔다. 그러나 이러한 방법은 재현성을 위해 숙련된 기술과 실험에 많은 시간이 소요되며, 많은 양의 DNA가 요구되므로 정확하면서 신속한 방법이 요구된다. 따라서 이러한 단점을 극복하기 위한 Real-Time PCR 분석은 실시간 모니터링화로 최근에 개발되었으며, 45-cycle PCR을 완성하는데 ~30분이 요구되며, 실시간 분석에 의해 중간에 결과를 확인 후 나머지를 하지 않아도 되므로 매력적인 방법 중의 하나이다 (Ke et al. 2000).

최근에 유용한 미생물 및 식물체로부터 유용한 유전자를 분리하여, 목적으로 하는 작물에 형질전환하는 방법이 여러 작목에서 시도되고 있다. 이러한 분자육종 기술은 신품종을 단시간에 육성할 수 있는 장점이 있다. 따라서 본 연구는 저온저항성 유전자인 BN115를 이용하여 국화에 형질전환하기 위한 방법 및 형질전환된 식물체내에 목적으로 하는 유전자가 안정적으로 도입되어 발현됨을 확인하고자 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

국화 (*Dendranthema grandiflorum*)는 Puma 품종을 sucrose가 3% (w/v) 첨가된 MS 기본 배지에서 계대 배양하였으며, 0.8~1.0 cm² 잎 절편을 형질전환용 재료로 사용하였다.

Callus 형성 및 재분화

국화잎으로부터 식물체 재분화를 위해서는 3% sucrose가 첨가된 MS 기본배지에 성장조절제 1.0 mg/L BA와 0.3 mg/L 2,4-D를 첨가하여 배지를 제조한 다음 잎 절편 중앙을 핀으로 상처를 가한 후 접종하였다. 재분화 관찰은 해부현미경 및 SEM (Scanning Electron Microscopy)을 사용하여 *Agrobacterium* 형태, 식물체내로 침입과정, callus형성과정 등을 관찰하였다.

유전자

저온저항성 형질전환체 육성을 위해 사용한 저온관련 유전자는 BN115는 *Brassica napus*에서 분리된 것으로 binary vector에 도입하여 pBin19::BN115로 재조합한 다음 disarmed Ti-plasmid를 함유하고 있는 *A. tumefaciens* MP90에 도입한 것을 경희대학교로부터 분양받아 사용하였다 (Weretilnyk

et al. 1993; Choi et al. 1996; Jeong et al. 2000, Fu et al. 1999). 저온저항성 유전자를 함유하고 있는 *A. tumefaciens* MP 90는 경희대학교 Dr. Yang이 Agriculture Canada의 Dr. Singh로부터 공여 받은 균주로 50 mg/L kanamycin이 첨가된 LB broth배지에 접종한 후 2~3일 동안 28°C 암조건에서 배양하였다.

유전자 접종 및 조건

공동배양을 위한 *Agrobacterium*은 첫째 날 kanamycin이 포함된 LB broth에서 28°C, 250 rpm으로 12시간 배양한 후 다음날 MM (Minimal Media)+Km broth에서 같은 조건으로 다시 12시간 배양하였다. 셋째 날 IM (Induction Media)+As (Acetosyringone) broth에서 6시간 배양한 후 국화잎과 공동 배양하였다. 유전자 접종 후 5 mg/L kanamycin과 300 mg/L cefotaxime이 함유된 MS 기본배지에서 4~6주 후 형질전환체를 1차로 배지내 선발하였다. Particle bombardment (PDS-1000, Bio-Rad)에 의한 접종은 유전자가 들어 있는 *E. coli*로부터 plasmid DNA를 분리하여 (Plasmid Miniprep kit. Corebiosystem co. Ltd., Korea) 1.0 µ gold-microcarrier에 coating시킨 후 4°C에 미리 보관된 국화잎 절편에 접종하였으며, Helium 압력 (psi) 및 접종거리에 따른 형질전환율을 조사하였다.

형질전환체 검정

· PCR

선발배지에서 재분화된 식물체는 plant genomic DNA isolation kit (Corebiosystem co. Ltd., Korea)를 이용하여 DNA를 추출하였으며, genomic DNA 정량에 앞서 RNase가 처리되었다. 최종 DNA 산물은 agarose gel 전기영동과 흡광도 260 nm 측정치와 비교한 후 정량하여 형질전환체 선발을 위한 PCR분석에 사용하였다. PCR 검정에 nptII gene의 증폭을 위한 primer는 700 bp의 PCR 산물을 증폭하는 forward primer ATGGGGAGCGGCGATACCGTA와 reverse primer GAGGCTATTCGGCTATGACTG를 사용하였으며, PCR 증폭은 Gradient Type Program Temp. Control System PC-818 (Astec, Japan)을 사용하여 94°C에서 4분간 pre-denaturation을 반응시키고, 94°C에서 1분, 57°C에서 1분, 72°C에서 1.5분의 cycle을 35회 실시하였다. 72°C에서 7분간 final extension이 끝난 PCR 최종산물은 10 µl를 1% agarose gel에서 loading한 후 형질전환여부를 판별하였다.

· Real-Time PCR

Real-Time PCR 분석은 Real-Time PCR 7500 system (Applied Biosystems, USA)을 사용하였으며, PCR 반응은

위한 TaqMan BN115 probe는 Applied Biosystems에서 합성하였다. Probe는 forward primer (5' to 3') AAGTCGT-TGATCTACGCCGATAAA와 reverse primer (5' to 3') GCTCTCTTTGTGGCTTCATTGAG로 합성되었다. 또한 TaqMan reaction을 위한 AmpliTaq Gold DNA polymerase, AmpErase UNG, dNTPs, Passive reference dye (ROX), Buffer 등이 포함된 TaqMan universal Master Mix는 Applied Biosystems로부터 공급받아 사용하였다. Real-Time PCR 반응은 총량 25 μl 에 1 μl DNA (30 ng), 12.5 μl 2 \times TaqMan universal PCR master mixture, 1.25 μl TaqMan BN115 probe mixture, 10.25 μl RNase-free water를 혼합하여 최초 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 반응시키고, 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15초와 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간의 cycle을 40회하여 각 sample 당 3회 반복으로 실시하였다. Standard curve는 positive control (purified pBN115)을 45, 4.5, 0.45, 0.045, 0.0045, 0.00045 ng/ μl 를 10-fold serial dilution하여 curve를 그린 후 unknown samples과 비교하여 7500 system SDS software v.1.3 (Applied Biosystems, USA)에 의해 분석하였다 (Ding et

al. 2004). pBN115량에 따른 유전자 copy수 측정방법은 1. (Number of base pairs) (Average weight of double stranded DNA) / (Avogadro's number= 6.022×10^{23} /mol)=Grams/plasmid molecules, 2. (Grams/ μl) / (Grams/plasmid molecules) = Plasmid molecules/ μl 또는 copies/ μl 에 따라 계산하였다 (Sen 2000).

결과 및 고찰

Agrobacterium 침입 및 callus 형성

국화잎과 공동배양에 사용된 *Agrobacterium*은 $5.0 \times 1.0 \mu\text{m}$ ($4.4 \times 1.6 \mu\text{m}$, Hernandez 1999) 크기로 gram-negative, non-sporing, motile, rod형이며, clover에 nitrogen-fixing nodules을 형성하는 *Rhizobium*과 밀접한 관련이 있다 (Figure 1A). *Bacteria* 속의 *Agrobacterium tumefaciens*은 대다수의 쌍떡잎 식물 (dicotyledonous), 특히 apple, pear,

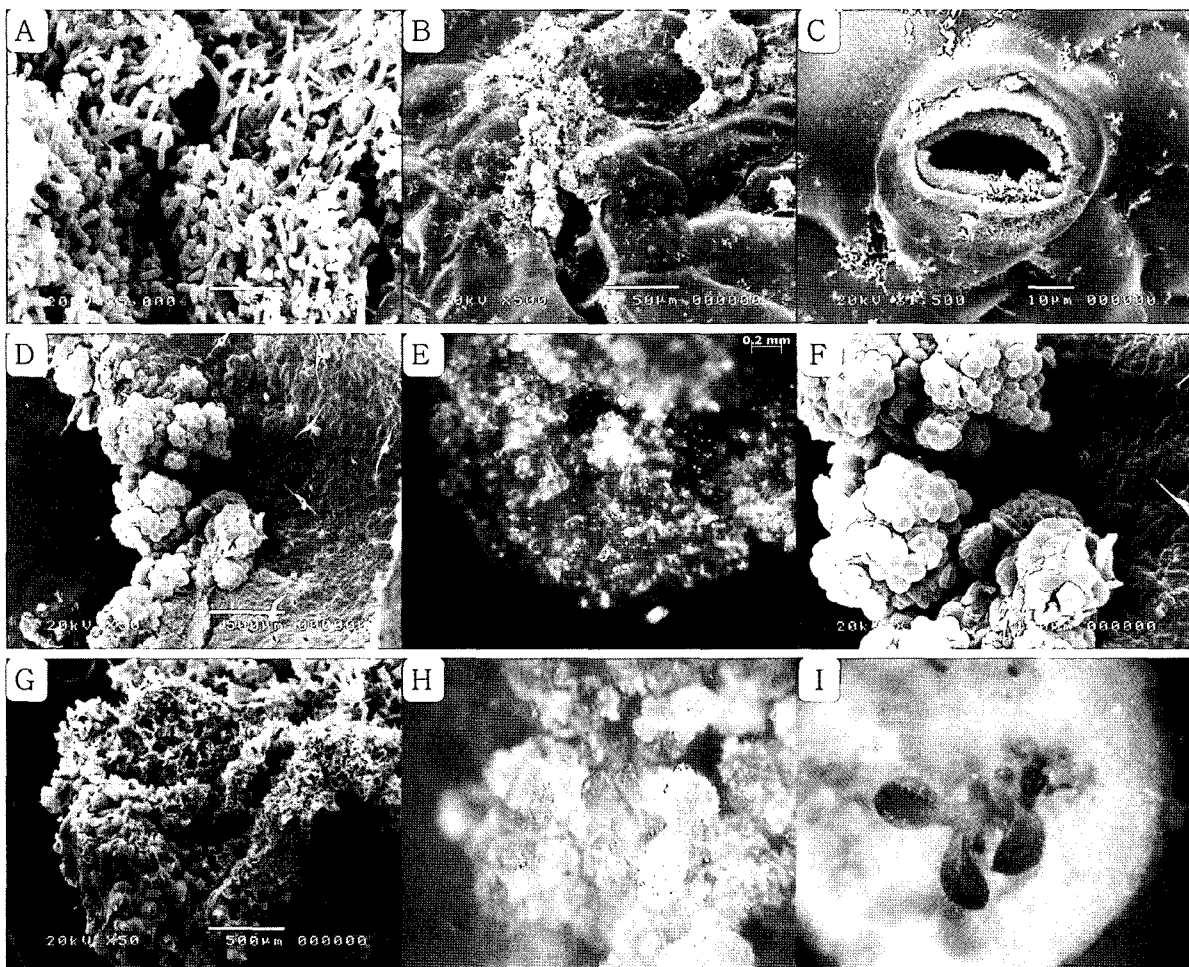


Figure 1. *Agrobacterium* characteristics, infection through injured parts and formation steps of callus on *Chrysanthemum* leaves. A, *Agrobacterium tumefaciens*. B, C, A. *tumefaciens* infection into injured part and stoma. D~G, Formation steps of callus on leaves. H~I, Regeneration of *Chrysanthemum*.

peach, cherry, almond, raspberry, roses 등의 장미과에 속하는 식물체에 crown gall을 유발하는 식물병원균으로 알려져 있다. 기본적으로 세균은 식물 genome에 DNA 부분을 운반하므로 식물 육종의 도구로써 이용되고 있다 (Tindland 1996). 형질전환에 사용된 *Agrobacterium*은 잎 절편의 상처부위 등을 통해 식물체에 침입하는 것으로 관찰되었으며 (Figure 1B,C), 상처난 식물세포는 lignin을 합성할 뿐만 아니라 어떤 전구물질 (lignin precursors)은 병원균에 의해 자극을 받는다. 또한 섬유소 (cellulose fibrils)는 식물체에 *Agrobacterium*의 부착을 유도하는 것으로 보고되고 있다 (Sforza et al. 2002). 국화의 callus 및 재분화는 접종 2~3주 후 핀 또는 cork-borer에 의해 상처난 잎 가장자리로부터 초기에 구형~난형의 세포덩어리가 이슬방울 모양으로 무수히 형성을 시작하여 점점 커지다가 가장바깥의 세포로부터 분화하여 callus가 형성되고 callus로부터 식물체가 재분화되는 것으로 관찰되었다 (Figure 1D~I).

유전자 접종조건 설정

유전자 접종조건 설정을 위하여 *Agrobacterium* 및 particle bombardment에 의한 효율적 유전자 도입방법에 관한 연구를 수행하였다. *Agrobacterium*에 의한 유전자 접종조건은 O.D.₆₀₀ ≈ 0.5에서 20분간 공동배양시 callus 형성률 100%, shoot 형성률 5.1%, shoot 수 2.2개로 가장 효율적인 형질전환율을 나타냈으며, 115개 (93.5%)의 형질전환체를 얻었다. 반면, Particle bombardment에 의한 유전자접종은 helium 압력은 1,100 psi와 target 거리를 9 cm로 조정했을 때 callus 형성률 100%, shoot 형성률 11.8%, shoot 수 2.5개로 가장 효율적이었다 (Table 1). 이와 관련된 형질전환 방법으로 MS 액체배지에서 *Agrobacterium*을 1:50로 희석하여 잎절편과 overnight하였을 때, 2,4-D의 농도에 따라 재분화율이 달라졌으며, 0.25~1.0 mg/L 수준에서 2,4-D가 걸쭉된 처리보다 shoot 및 잎당 shoot 형성률이 높았다고 보고하였다 (Sherman et al. 1998a).

형질전환체 검정

· PCR

저온저항성 BN115 gene과 표지유전자로서 kanamycin에 저항성 있는 nptII gene을 가지고 있는 식물발현용 binary vector pBin19/BN115가 도입된 *A. tumefaciens* MP90과 국화잎을 공동배양한 후 5 mg/L kanamycin이 들어있는 MS +3% sucrose 배지에서 4~6주 후 선발된 123개의 잎의 형질전환체 중 10개체를 대표로 선발하여 PCR 및 Real-Time PCR 검정을 실시하여 형질전환여부를 판별하였다. 식물체로부터 gDNA를 추출하여 표지유전자인 nptII gene을 증폭하도록 제작된 primer를 이용하여 PCR 검정 결과 비형질전환체 (wild type)는 증폭되지 않았으나 대표 선발된 10개 중 9개의 형질전환체는 purified pBN115 (+ve control)와 같은 크기의 700 bp에서 밴드가 형성되었다 (Figure 2). 이는 kanamycin 배지에서 선발된 형질전환체에서 추출된 DNA안에 nptII gene이 존재함을 확인해 주는 결과로 저온저항성 유전자가 국화에 도입되었음을 의미한다.

· Real-Time PCR 검정

PCR 반응은 식물체내에 존재하는 유전자의 여부를 판별하는 간편하면서 용이한 방법 중의 하나지만 *Agrobacterium*과 식물체와의 공동배양 과정에서 식물체에 부착되어 선발

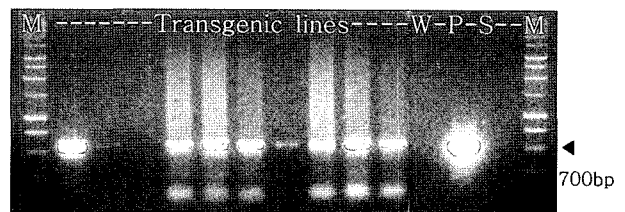


Figure 2. Polymerase chain reaction (PCR) analysis of transgenic Chrysanthemum. M : Size marker (1kb), Transgenic lines : Selected transformants from medium including 5 mg/L kanamycin, W : Wild type (negative control), P : Positive control (purified pBN115), S : Sterilize distilled water.

Table 1. The inoculation methods using *Agrobacterium* and particle bombardment for transgenic Chrysanthemum

Inoculation		% of callus formation (%)	% of shoot formation (%)	No. of shoot (No./explant)	No. of transgenic Chrysanthemum (%)
<i>Agrobacterium</i>	0.5 ^a 10 ^b	57.5	2.0	1.0	115 (93.5)
	0.5	100.0	5.1	2.2	
	1.0	40.1	1.4	1.1	
	1.0	35.4	1.3	1.0	
Particle bombardment	900 ^c 9 ^d	100.0	13.7	2.0	8 (6.5)
	1100	100.0	11.8	2.5	
Control (MS basal medium)		35.0	0	0	0

^aO.D.₆₀₀ ≈, ^bco-culture time (min), ^chelium pressure (psi), ^dtarget distance (cm), vacuum (inches Hg) : 28, particle size : 1.0 μ gold.

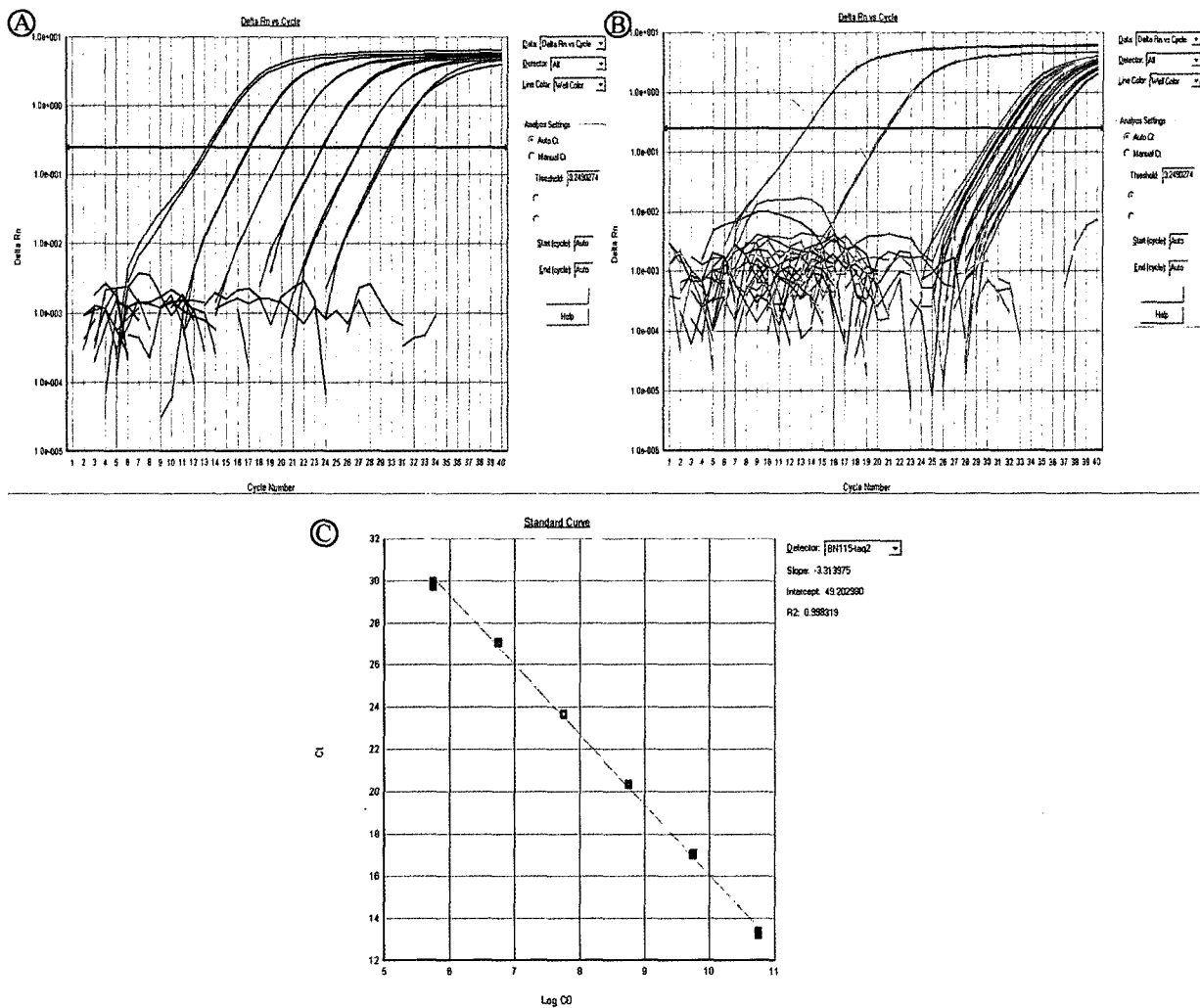


Figure 3. Real-Time PCR amplification of BN115 gene. A, Amplification plots resulting from the amplification of six 10-fold serial dilution of purified pBN115 gene ranging from 45 to 0.00045 ng/ μ l with the TaqMan probe. B, Amplification plots of transgenic lines showing the changes in fluorescence of TaqMan probe dye plotted versus cycle number. C, The relative standard curve obtained with the threshold cycle (CT) values versus the log of the each initial concentration.

된 경우 형질전환되지 않은 식물체에서도 PCR 증폭 후 밴드를 형성하여 유전자가 존재하는 것으로 나타나 형질전환 여부를 잘못 판별하는 경우가 생긴다. 따라서 국화 형질전환체로부터 추출한 gDNA를 가지고 Real-Time PCR에 의한 유전자의 존재 여부를 확인하였다. TaqMan probe를 이용한 BN115 gene의 Real-Time PCR 결과 slope는 -3.313975, R2 (CT값과 logDNA concentration 사이의 상호관계)는 0.998319를 얻었다. amplification efficiency는 $[10^{-(1/slope)}]-1$ 의 공식에 따라 slope가 -3.313975일 때 amplification efficiency가 100%이므로 45~0.00045 ng/ μ l 범위의 pBN115 gene 10배씩 serial dilution한 amplification plot는 일정한 간격으로 standard curve가 그려졌다 (Figure 3A,C). Cycle 수에 따른 TaqMan probe dye의 형광 변화를 보여주는 amplification plots에서 형질전환체는 CT값이 20.75~35.62 범위로 나타났다 (Figure 3B, Table 3). 또한 serial dilution에서 상대정량에 따른 정량분석의 정확성 test결과 CT 값의 범위

Table 2. Reproducibility of the CT measurement of standards (positive control, purified pBN115) from 45 to 0.00045 ng/ μ l using the TaqMan assay system

DNA amount (ng)	CT value for reaction	Quantity
45	13.41	5.6×10^{10}
4.5	17.07	5.6×10^9
0.45	20.31	5.6×10^8
0.045	23.64	5.6×10^7
0.0045	27.07	5.6×10^6
0.00045	29.97	5.6×10^5
SDW	undet.	0

는 13.41~29.97이었으며, SDW는 검출되지 않았다 (Table 2). 정량분석 결과를 기초로 pBN115량에 따른 유전자 copy 수 측정방법을 1. (Number of base pairs) (Average weight of double stranded DNA) / (Avogadro's number = 6.022

Table 3. C_T value and quantity of transgenic lines according to their standard curves using the TaqMan assay system

Sample	C _T				Quantity			
	once	twice	thrice	mean	once	twice	thrice	mean
T 2	20.70	20.74	20.82	20.75	4.00×10 ⁸	3.89×10 ⁸	3.68×10 ⁸	3.86×10 ⁸
T35	35.60	35.66	35.60	35.62	12,754.84	12,195.79	12,746.49	12,565.71
T56	35.00	34.57	35.73	35.10	19,310.04	25,955.08	11,657.79	18,974.30
T59	34.13	33.64	33.66	33.81	35,245.02	49,715.84	49,105.04	44,688.63
T63	33.63	33.32	33.71	33.55	49,947.11	61,965.61	47,414.09	53,108.94
T74	31.39	31.56	31.37	31.44	236,961.91	210,970.92	239,838.48	229,257.10
T84	34.54	33.30	34.65	34.16	26,615.15	76,741.88	246,10.01	42,655.68
T96	32.08	32.01	32.16	32.08	147,173.17	154,260.94	139,251.77	146,895.29
T101	30.78	31.08	31.08	30.98	362,092.09	293,662.59	294,041.53	316,598.74
T111	33.08	32.90	32.87	32.95	73,091.57	82,940.68	84,872.75	80,301.67
-ve	undet.	undet.	undet.	undet.	undet.	undet.	undet.	undet.
+ve	13.40	13.37	13.37	13.38	6.37×10 ¹⁰	6.50×10 ¹⁰	6.50×10 ¹⁰	6.46×10 ¹⁰
SDW	undet.	undet.	undet.	undet.	undet.	undet.	undet.	undet.

×10²³/mol) = Grams/plasmid molecules, 2. (Grams/μl) / (Grams/plasmid molecules) = Plasmid molecules/μl 또는 copies/μl에 따라 계산하였다. 45 ng/μl plasmid DNA를 serial dilution했을 때 standard는 5.6×10¹⁰ ~ 5.6×10⁵ copies/μl이었으며 (Table 2), 형질전환체는 3.86×10⁸ ~ 12565.71 copies/μl (Table 3)이었다.

이상의 Real-Time PCR과 PCR 결과를 바탕으로 저온저항성 BN115 gene과 표지유전자로서 kanamycin에 저항성 있는 npt II gene을 가지고 있는 식물발현용 binary vector pBin19/BN115가 도입된 *A. tumefaciens* MP90과 국화잎을 공동배양한 후 5 mg/L kanamycin이 들어있는 배지에서 선발된 10개체 중 PCR에서는 9개체가 plasmid DNA (+ve control)과 같은 크기의 700bp에서 밴드가 형성되므로 형질전환체로 판별되었으나 Real-Time PCR에서는 C_T값 35 이상을 보인 T35와 T56은 비형질전환체로 판별되었다. Li 등 (2004)은 Real-Time PCR을 이용하여 형질전환체 copy수를 계산하는 방법으로 2^{ΔΔC_T} [ΔΔC_T=ΔC_T (unknown sample)-ΔC_T (reference sample)]과 Weng 등 (2004)은 X₀/R₀ = 10^{[(C_T,X-1X)/SX]-[(C_T,R-1R)/SR]} 식을 이용하였으며, Southern blot analysis와 상호 비교하여 일치 여부를 판별하였을 때 상호 일치하는 결과로 보고하였다.

Real-Time PCR 분석은 보편화된 PCR 방법에 비해 sensitivity와 specificity가 좋을 뿐만 아니라, 증폭부터 분석까지 한 시간 이내에 완료할 수 있으며, 결과를 확인하기 위해 전기영동 단계를 생략할 수 있으므로 분석 시간 및 비용을 줄일 수 있다. 또한 컴퓨터 프로그램을 기초로 data를 정량화 할 수 있으므로 객관적인 결과를 얻을 수 있다. 특히 20-30 nt의 TaqMan probe를 이용하여 forward와 reverse primer 사이의 internal sequence를 인식함으로써 일반적인 PCR 방법보다 선택적으로 PCR product를 검출 할 수 있다.

이 probe는 5'-end에 있는 fluorescent reporter dye와 3'-end에 있는 quencher dye를 labeling하며, reporter dye와 quencher dye의 FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) 현상을 이용하여 증폭산물이 증가되는 양을 모니터링 한다. DNA를 정량하기 위하여 C_T (threshold cycle) 값을 이용하는데, PCR product 축적에 의한 C_T값은 starting template amount와 상호관련 있다. 따라서 C_T값이 작을수록 target으로 하는 gene량이 많이 존재함을 의미한다. 또한 unknown samples안에 있는 target gene에 대한 정량값은 sample의 C_T 값을 standard curve에 대입하여 구할 수 있으며, standard curve는 serial dilution된 표준 sample들의 C_T값과 대비하여 log함수의 linear plot가 만들어진다 (Li et al. 2004). 한편, 본 연구과 같은 유전자를 이용하여 선행된 연구결과가 국내의 경우 감자와 상추 등에서 수행되었다. 감자의 경우 (Choi et al. 1996) *Agrobacterium* MP90과 공동배양으로 약 6~8주 후에 항생제가 첨가된 선발배지에서 multiple shoots를 얻을 수 있었으며, 선발된 형질전환체를 대상으로 PCR, southern 분석 결과 저온저항성 유전자가 식물체의 genome에 안정적으로 도입되었음을 확인하였고 보고하였다. 또한 상추 (Jeong et al. 2000)의 경우 잎 절편을 *Agrobacterium*과 공동배양으로 약 3~4주부터 multiple shoots들이 생성되기 시작하였으며, 선발된 shoots들은 PCR, southern, RT-PCR 반응을 이용하여 도입 유전자가 상추내에 안정적으로 도입되어 발현됨을 확인하였다고 보고한 바 있다.

적 요

저온저항성 BN115 gene과 표지유전자로서 kanamycin에

저항성 있는 nptII gene을 가지고 있는 식물발현용 binary vector pBin19/BN115가 도입된 *A. tumefaciens* MP90을 국화잎과 공동배양 하였다. 또한 particle bombardment를 이용하여 목적으로 하는 유전자가 식물체에 안정적으로 도입되어 발현됨을 PCR 및 Real-Time PCR 검정으로 확인하였다. 국화잎과 공동배양에 사용된 *Agrobacterium*은 $5.0 \times 1.0 \mu\text{m}$ 로 non-sporing, motile, rod 형이며, Callus는 pin이나 cork-borer에 의해 상처 난 잎 가장자리로부터 형성되어 식물체가 재분화 되었다. 유전자 도입조건은 *Agrobacterium*을 O.D.₆₀₀ ≈ 0.5 에서 20분간 공동배양 할 때, Particle bombardment는 helium 압력을 1,100 psi, target 거리를 9 cm로 유지했을 때, 가장 효율이 높았다. 5mg/L kanamycin이 들어 있는 배지에서 선발된 형질전환체는 PCR 분석으로 형질전환 여부를 판별할 수 있었으며, 선발 10개체 중 9개체에서 purified pBN115와 같은 크기의 밴드가 형성되었다. Taq-Man probe를 이용한 Real-Time PCR 결과 45~0.00045 ng/ μL 범위에서 pBN115 gene을 10배씩 serial dilution한 amplification plot는 일정한 간격으로 standard curve를 보였으며, slope는 -3.313975, R₂는 0.998319이었다. Amplification plots의 형질전환체 C_T값은 20.75~33.81범위였으며, 유전자 copy수는 정량분석을 기초로 산출하였다. pBN115의 plasmid DNA를 serial dilution했을 때, standard는 $5.6 \times 10^{10}/45\text{ng} \sim 5.6 \times 10^5/0.00045\text{ng}$ copies/ μL 이었으며, 형질전환체는 $3.86 \times 10^8 \sim 12565.71$ copies/ μL 이었다. 따라서 PCR, Real-Time PCR 분석 결과 저온저항성 유전자가 국화의 genome에 안정적으로 도입되었음이 확인되었다.

인용문헌

- Choi KH, Yang DC, Jeon JH, Kim HS, Joung YH, Joung H (1996) Expression of cold-regulated gene in transgenic *Solanum tuberosum* L. Korean J Plant Tissue Culture 23: 311-315
- Ding J, Jia J, Yang L, Wen H, Zhang C, Liu W, Zhang D (2004) Validation of a rice specific gene, sucrose phosphate synthase, used as the endogenous reference gene for qualitative and Real-Time quantitative PCR detection of transgenes. J Agric Food Chem 52: 3372-3377
- Fu P, Singh J, Keller W, McGregor I (1999) Sucrose content and freezing tolerance of *Brassica napus* canola (rapeseed) seedlings overexpressing an *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase. 10th international rapeseed congress, Australia
- Hernandez JBP, Remy S, Souco VG, Swennen R, Sagi L (1999) Chemotactic movement and attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to banana cells and tissues. J Plant Physiol 155: 245-250
- Jeong JH, Yang DC, Jang HG, Paek KY (2000) Transformation of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) using cold regulated gene (BN115). Korean J Plant Tissue Culture 27: 7-12
- Ke D, Menard C, Picard FJ, Boissinot M, Ouellette M, Roy PH, Bergeron MG (2000) Development of conventional and Real-Time PCR assay for the rapid detection of group B *Streptococci*. Clinical Chemistry 46: 324-331
- Lee SW, Heinz R, Robb J, Nazar RN (1994) Differential utilization of alternate initiation sites in a plant defense gene responding to environmental stimuli. Eur J Biochem 226: 109-114
- Li Z, Hansen JL, Liu Y, Zemetra RS, Berger PH (2004) Using Real-Time PCR to determine transgene copy number in wheat. Plant Molecular Biology Reporter 22: 179-188
- Robinson KEP, Firoozabady E (1993) Transformation of floriculture crops. Sci. Hort. 55: 83-99
- Seiichi F, deJong J, Rademaker W (1995) Efficient genetic transformation of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* (Ramat.) Kitamura) using stem segments. Breed Sci 45: 179-184
- Sen K (2000) Rapid identification of *Yersinia enterocolitica* in blood by the 5' nuclease PCR assay. J Clin Microbiol 38: 1953-1958
- Sherman JM, Moyer JW, Daub ME (1998a) A regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation system for genetically diverse Chrysanthemum cultivars. J Amer Soc Hort Sci 123: 189-194
- Sherman JM, Moyer JW, Daub ME (1998b) Genetically engineered resistance to tomato spotted wilt virus in Chrysanthemum. *Dendranthema grandiflora* : A model system for virus protection in ornamental crops. Acta Hort 431: 432-441
- Tinland B (1996) The integration of T-DNA into plant genomes. Trends in Plant Science 1 pp178-184
- Weng H, Pan A, Yang L, Zhang C, Liu Z, Zhang D (2004) Estimating number of transgene copies in transgenic rapeseed by Real-time PCR assay with *HMG II* as an endogenous reference gene. Plant Molecular Biology Reporter 22: 289-300
- White TC, Simmonds D, Donaldson P, Singh J (1994) Regulation of BN115, a low-temperature-responsive gene from winter *Brassica napus*. Plant physiology 106: 917-928
- Weretilnyk E, Orr W, White TC, Lu B, Singh J (1993) Characterization of three related low-temperature-regulated cDNAs from winter *Brassica napus*. Plant Physiol 101: 171-177
- 농림부 (2004) 농림통계연보. pp94-95

(접수일자 2006년 2월 3일, 수리일자 2006년 3월 3일)

