

사업구분	지역특화기술개발	수행구분	전반기	연구기간	'05~(1년차)
연구과제명	강원지역특화작물 형질전환체 육성			연구책임자	권순배
세부과제명	강원지역 특화작물의 형질전환체 육성				
세부과제책임자	농산물이용시험장 농업연구사 권 순배 (033-258-4511)				
색인용어	형질전환체 육성				

1. 당해연도 목표

- 단자엽 식물인 칼라(*Zantedeschia* sp.)의 *Agrobacterium*법을 이용한 형질전환에 적합한 벡터구축 및 형질전환체의 선발에 적합한 항생제(제초제) 농도 구멍과 공동배양시간 등 형질전환 효율성제고 조건 구멍을 목표로 함

2. 수행방법

- 가. 형질전환체의 선발에 적합한 항생제 농도 구멍 : 품종별 캘러스와 유식물체
- 캘러스 및 캘러스 유래 shoot의 항생제 DL-phosphinotricin(PPT) 저항성 농도측정 : PPT (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10 mg/l)를 넣은 배지에 shoot를 치상, 3주 후 생존율 및 생육상태
 - 유식물체 바스타(basta) 저항성 농도 측정 : 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5% 바스타를 농도대로 준비하여 붓으로 제 2엽에 도달한 10일 후 식물체 상태 조사
- 나. 형질전환 벡터 : pSBCG-M (GFP 발현 벡터 : 명지대학교 김주곤 교수로부터 분양)
- 다. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환
- 공동배양 시간 검토: 캘러스와 *Agrobacterium*을 10, 30분, 1, 3, 6, 12, 24, 72시간 처리

3. 시험성적

가. 형질전환체의 선발에 적합한 항생제 농도 구멍

캘러스 및 캘러스 유래 shoot의 항생제 PPT 저항성 농도 선정은 1 mg/l 부터 1 간격으로 10 mg/l 까지 PPT를 넣은 배지에 shoot를 치상하여 3주 후 생존율 및 생육상태를 1차로 조사하였고, 다시 농도를 세분하여 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 mg/l ppt 농도로 실시한 결과, 0.2 mg/l에서 대부분의 개체가 뿌리와 잎의 생장이 이루어지지 않았으므로, 차후의 기내 selection 에 이 농도를 사용하기로 하였다(표 1). 캘러스도 마찬가지로의 결과를 얻었다 (Data not shown).

<표 1> BM 캘러스 유래 성장점의 PPT 농도별 생존률

PPT 농도(mg/l)	치상 개체수	생존개체수	생존률(%)
0	30	30	100
0.1	60	49	81.6
0.2	60	13	21.6
0.5	60	0	0
1	60	0	0
2	60	0	0
5	60	0	0

나. 포트 식재 유식물체 바스타 저항성 농도 측정

0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5%로 처리를 두어, 붓으로 제 2엽에 도말한 10일 후 식물체 상태 조사를 조사하였다. 온실에서 순화한 BM과 GA의 제2엽에 다양한 농도의 바스타를 처리하여 10일 후 식물체의 상태를 관찰한 결과 BM은 0.3%, GA는 0.4%의 농도에서 처리한 잎이 완전히 고사하였으므로 순화한 칼라의 selection에 각각의 농도를 사용하기로 하였다 (그림 1).



[그림 1] BM 캘러스 유래 성장점의 PPT 저항성 테스트 결과

다. *Agrobacterium* 이용 형질전환 수행

형질전환용 벡터로는 pSBCG-M을 이용하여, 방법은 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 이용하는 방법으로 수행하였다. 각 공시시료 캘러스의 multiple-shoot 부분을 성장점에 가깝게 가능한 많이 잘라버린 후 실험에 사용하였고, 상처를 주는 방법은 a. PDS-1000의 압력으로 물리적 충격, b. 다수의 곤충핀으로 물리적 자극, c. 메스를 이용하는 세가지 방법을 사용하였다. 공동배양은 시간별로(캘러스와 *Agrobacterium*을 10, 30분, 1, 3, 6, 12, 24, 72시간) 액체배지에서 실시하였으나, 6시간 이상 길어지면 차후 배양시에 캘러스 덩어리의 괴사율이 높아져 재분화율이 극히 낮았다. 따라서 10분에서 3시간의 시간으로 결정하고, 여기에 형질전환 효율을 높일 수 있는 조건을 추가할 계획이다. 계대배양 직후, 3일 후, 1주일 후, 15일 후 등의 실험재료를 사용하여 형질전환 실험에 가장 적합한 캘러스 상태를 결정하고자 하였는데, 계대배양 직후의 재료가 식물체에 상처를 주기에 가장 좋고 성장점이 가장 많이 나출될 수 있는 상황이어서 적합하다고 판단되었다. 균주를 접종한 후 세척하여 기내에서 안정화 시킨 칼라는 원활히 잎과 뿌리를 발달시키며 건강하게 성장하였다. 이렇게 발생한 개체들은 PPT 0.2 mg/l가 포함되어 있는 배지에 각각의 개체를 옮겨 selection 하였다 (그림 2 A, B). 0.2 mg/l PPT selection 결과 그림 2C와 같이 putative transformant가 selection 되었다. 초기에 치상한 767 개체 중 selection 된 개체는 225 개체로 29%의 비율이었다. selection된 개체들은 현재 shoot elongation 배지에 치상하여 배양중이다. 또한 PPT selection 농도가 결정되기 이전에 형질전환한 식물체들은 기내에서 PPT를 처리하지 않고 바로 순화하였으며 이들의 잎에 바스타를 처리하여 유전자의 도입 여부를 확인하고자 하였다. 그림 3과 같이 BM 900여 개체를 순화하여 이중 살아남은 약 820개체에 바스타 0.3%를 처리한 결과 10일 후에도 처리한 잎이 시들지 않는 249개체, 30%를 선발하였다(그림 3C).

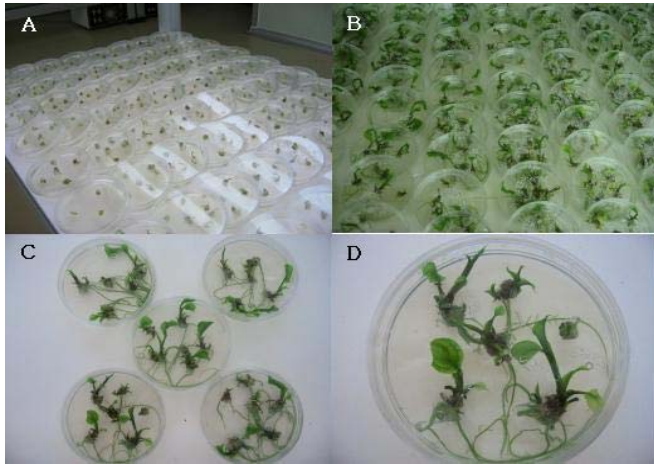


그림 2. PPT 0.2 mg/l가 들어있는 배지에서의 selection 과정
 A : 각각의 개체를 독립적으로 치상
 B : 3주 후 selection 배지에서의 성장
 C, D : 잎과 뿌리가 잘 성장한 putative transformant와 잎이 성장하지 못하는 non-transformant



그림 3. 기내에서 PPT selection 하지 않은 BM의 바스타 처리 실험
 A. 온실 차광막 하에서 순화된 칼라
 B. 바스타 처리 후 결속기로 표시
 C. 약 1주일 후 처리한 잎이 고사하면서 selection 됨
 D. Putative transformant(좌)와 non-transformant

그러나 이들도 시간이 지날수록 신염이 발생하지 않는 등 약해를 입은 결과를 보이고 있어 명확한 형질전환체라고 보기는 어려울 것이라 사료된다. 현재 DNA를 추출하여 PCR로 확인 중에 있다 (그림 3 C, D).

4. 주요결과 요약

- 칼라의 형질전환체 선발을 위하여 PPT 농도 구명 : 적정 농도 0.2 mg/l
- 포트 식재 유식물체 바스타 저항성 농도 : BM 0.3%, GA 0.4%
- *Agrobacterium* 이용 형질전환 시험 : 수행 중

5. 금후계획

- *Agrobacterium*법을 이용한 유색칼라의 형질전환 ('07 논문)