

사과 *Agrobacterium* 이용 형질전환에 있어서 AgNO₃ 및 AVG의 기내 CO₂ 농도에 미치는 영향

성은수¹ · 송관정^{2*}

¹강원대학교 농업생명과학대학, ²제주대학교 생물산업학부

Effect of Silver Nitrate (AgNO₃) and Aminoethoxyvinylglycine (AVG) on Carbon Dioxide (CO₂) Concentration within Vessel in *Agrobacterium*-mediated Transformation of Apple

Eun Soo Seong¹ and Kwan Jeong Song²

¹College of Agriculture and Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Faculty of Bioscience and industry, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the effect of silver nitrate (AgNO₃) and aminoethoxyvinylglycine (AVG) on the CO₂ concentration within vessel and the response of shoot regeneration and transformation in *Agrobacterium*-mediated transformation of 'Gala' and 'Fuji' apple. The explants of young leaves harvested from in vitro cultured shoots were inoculated with bacterial suspension, co-cultivated, and incubated on selective medium supplemented with 0, 10, 20, 40, or 80 μM AgNO₃, or 0, 10, 35, or 70 AVG. The CO₂ production of explant was measured at one-week intervals.

The highest transformation rate of 'Gala' and 'Fuji' resulted from at 0 μM or 10 μM, and 40 μM AgNO₃, respectively. However, the shoot regeneration of both cultivars was inhibited completely at all levels of AVG. The CO₂

concentration within vessel was high at range of 5~7 nL · g FW⁻¹ at 0, 10, or 20 μM AgNO₃, and was low at range of 2~3 nL · g FW⁻¹ at above 40 μM AgNO₃ in 'Gala'. On the contrary, the CO₂ concentration was the highest at about 1.0 nL · g FW⁻¹ at 40 μM AgNO₃, while being low at range of 0.4~0.8 nL · g FW⁻¹ at the others of AgNO₃ in 'Fuji'. On the other hand, the CO₂ production was greatly inhibited by AVG in both cultivars. The results indicated that the difference of cultivars in response of shoot regeneration and transformation could be from different CO₂ production patterns of cultivars by AgNO₃ and AVG.

Key words : regeneration and transformation response, CO₂ production, cultivar

서 론

과수 신품종 교배육종은 매우 어려운 분야 중의 하나이다. 이는 과실의 품질과 관련한 주요 형질들의 유전연구가 빈약하기 때문이다. 유년성의 특성을 가지고 있어서 사과와 경우 교배실생 집단에서 특성의 유전 및 분리 평가에 15년 이상의 기간이 소요되는 것과 관계된다. 과수에 있어서 형질전환 기법은 기존 품종의 주요 특성을 변화시키지 않으면서 소수의 단점을 보완해 신품종을 조기에 육성할 수 있는 신기술로 인식되고 있다. 또한 특정 유전자의 기능을 탐색함은 물론, 특정 형질의 대사조절 구멍과 종 분화 구멍에도 유용하기 때문에 많은 연구가 진행되어 오고 있다.

사과의 형질전환은 James 등(1989)이 처음 보고한 이래, 여러 품종에서 *Agrobacterium*-mediation에 의한 형질전환 연구가 진행되어 왔으나, 품종에 따라 형질전환 효율과 반응에 있어서 상당한 차이를 나타내고 있다(Bolar et al. 1999; Bondt et al. 1996; Puite and Schaart 1996; Song et al. 2000; Yao et al. 1995). 특히 국내에서 가장 많이 재배되고 있는 '후지' 품종은 형질전환이 어려운 품종의 하나로 알려져 왔다. *Agrobacterium*의 배양 및 접종 밀도(Seong 등, 2003)와 에틸렌 농도(Seong 등, 2005)가 형질전환 효율에 관여하는 핵심 요인 중의 하나로 알려져 왔다.

에틸렌은 식물의 형태 형성에 관여하는 중요한 요인의 하나인데, 스트레스와 노화에 관계되는 식물 성장조절제로 알려져 있다. 특히 *Agrobacterium*-mediation 형질전환에서 상처 유도 및 균 접종에 따른 스트레스에 의해 기내 에틸렌 농도가 급격히 증가하는 것이 보고되어 왔다(Ezura 등, 2000). 그런데 에틸렌의 합성과 작용에 CO₂가 관여하는 것으로 알려져 있다(Jobling과 McGlasson, 1995; Yang, 1985). 또한 CO₂는 식물의 형태형성에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Kumar 등, 1996; Pereira-Netto, 2001). 그러므로 사과 형질전환 효율을 증대시키기 위해 사용하는 silver nitrate (AgNO₃)와 aminoethoxyvinylglycine (AVG)가 기내 CO₂ 농도와 형질전환 효율에 미치는 영향을 평가코자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

기내 배양 중인 '갈라'와 '후지' 사과의 어린 잎을 *Agrobacterium*-mediated 형질전환에 이용하였다. 기본 식물의 계대배양 및 *Agrobacterium*-mediated 형질전환은 Seong 등(2005)의 방법에 의하여 수행하였다. AgNO₃와 AVG의 기내 CO₂ 농도 및 형질전환 효율에 미치는 영향을 평가하고자 재분화 선발 배지에 0, 10, 20, 40 및 80μM AgNO₃와 0, 10, 35 및 70μM AVG를 첨가하였다. 1.0×1.0cm 크기 절편체의 *Agrobacterium* 접종 및 공동배양 후 25mL Petri dish의 재분화 선발배지에 5개씩 치상하여 암상태 배양하였다.

배양 기간동안 1주일 간격으로 구멍을 이용하여 주사기로 1mL의 공기를 채취하였다. 채취한 공기를 GC-14B (일본, Shimadzu)의 gas chromatograph에 주입하여 CO₂ 농도를 분석하였다. 형질전환 신휐는 발근을 유도하고 순화한 후 PCR 및 Southern blot 분석으로 확인하였다(Seong 등, 2005).

결과 및 고찰

AgNO₃ 처리에 대한 '갈라' 및 '후지' 사과의 재분화 및 형질전환 반응을 Table 1에 나타내었다. '갈라'의 경우 신휐 재분화율은 AgNO₃ 농도가 10 μM에서 41.1%로 가장 높았고, 0, 20, 40, 80μM 순으로 높았다. 그러나 형질전환율은 첨가하지 않은 경우가 6.5%로 가장 높았고, 10μM 농도에서는 첨가하지 않은 경우와 차이가 없었으나, 20μM 이상의 농도에서는 신휐 재분화가 이루어지지 않았다. 반면, '후지'의 경우 40μM 농도에서 재분화율이 33.8%로 가장 높았고 나머지 농도에서는 다소 낮았으나, 농도 간에 반응의 차이는 크게 나타나지 않았다. 또한 형질전환율은 40μM 농도에서 6.5%로 가장 높게 나타났고, 더 높은 80μM 농도에서는 재분화 신휐가 escape으로 판명되어 형질전환체가 얻어지지 못했고, 20μM 이하의 낮은 농도에서는 형질전환율이 1.4~1.9% 내외로 낮게 나타났다. 그러나, AVG 첨가의 경우는 모든 농도에서 신휐

Table. 1. Effect of AgNO₃ on shoot regeneration and transformation of 'Gala' and 'Fuji' in *Agrobacterium*-mediated transformation of apple.

AgNO ₃ (μM)	'Gala'		'Fuji'	
	Regeneration rate (%)	Transformation rate (%)	Regeneration rate (%)	Transformation rate (%)
0	20.1b	6.5±4.1	14.7b	1.9ab
10	41.1a	5.1±0.1	23.6b	1.4ab
20	18.0bc	0.0±0.0	21.9b	1.4ab
40	10.3cd	0.0±0.0	33.8a	6.5a
80	8.6d	0.0±0.0	21.9b	0.0b

Mean values of 3 replicates of 20 explants each. Means followed by the same letter are not significantly different at the 5% level using Duncan's multiple range test.

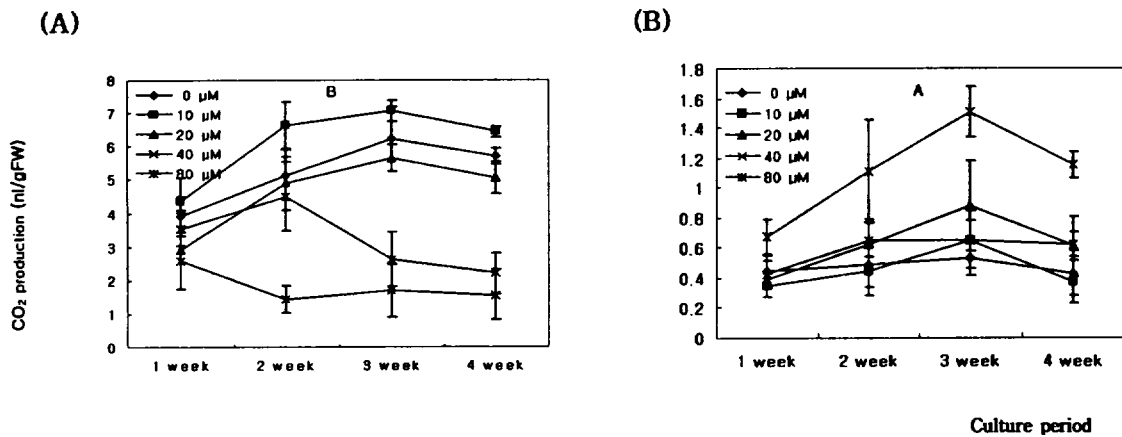


Fig. 1. Effect of AgNO₃ on CO₂ production during selection from leaf discs of 'Gala' (A) and 'Fuji' (B) inoculated with *Agrobacterium*. Vertical bars represent SE.

재분화가 이루어지지 않았다(자료 미제시).

'갈라' 및 '후지' 사과 형질전환에서 재분화 배지에 첨가한 AgNO₃ 농도에 따른 재분화 단계에서

의 CO₂ 발생은 Fig. 1과 같다. '갈라'의 경우 0, 10, 20μM 처리에서 5~7nL · g FW⁻¹로 높게 나타났고, 40μM 이상에서는 2~3nL · g FW⁻¹로 낮게

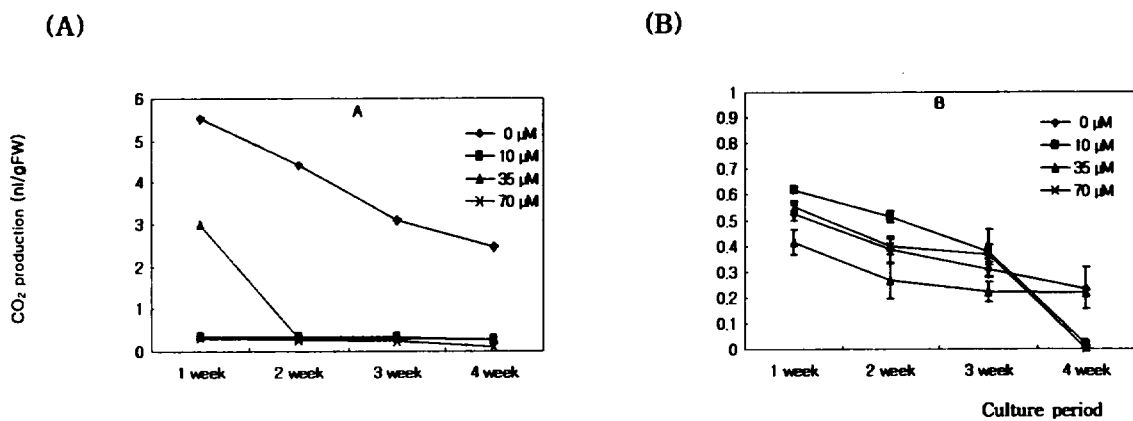


Fig. 2. Effect of AVG on CO₂ production during selection from leaf discs of 'Gala' (A) and 'Fuji' (B) inoculated with *Agrobacterium*. Vertical bars represent SE.

나타났다. 반면 '후지'의 경우에는 40 μ M에서 가장 높은 1.0nL·g FW⁻¹ 내외이었으나, 다른 농도에서는 0.4~0.8nL·g FW⁻¹ 내외의 낮은 편이었다. 한편, AVG의 처리에서는 '갈라'와 '후지'의 경우 모두 CO₂ 발생이 급격히 감소하였다(Fig. 2).

신초 재분화 및 형질전환율과 CO₂ 발생과의 관계를 비교해 볼 때, '갈라'에서 재분화율과 형질전환율이 높이 나타난 것은 5~7nL·g FW⁻¹의 높은 CO₂ 발생과 관계되는 것으로 나타났다. 이는 CO₂ 농도가 높은 경우 mint와 thyme 식물에서 신초발생 및 신초 소질의 종계 나타난 것과 유사한 경향이다(Tisserat 등, 2002). 또한 '후지'에서는 40 μ M의 AgNO₃ 첨가에서만 신초 재분화율과 형질전환율이 가장 높게 나타났는데, CO₂ 발생이 '갈라'에서보다는 상대적으로 낮은 편이었으나 1.0nL·g FW⁻¹ 이상으로 가장 높게 나타난 것과 관계되는 것으로 보아졌다. 그러므로 AgNO₃ 및 AVG에 의한 신초 재분화 및 형질전환의 영향은 에칠렌의 발생량(Seong 등, 2005)과 더불어 CO₂ 발생량과 밀접하게 연관되는 것으로 나타났다. 이는 CO₂ 농도가 에칠렌의 발생과 작용에 중요하게 영향한다는 보고와 일치하는 것이다(Poneleit와 Dilley, 1993).

또한 AgNO₃와 AVG가 첨가하지 않은 경우 '갈라'에서는 CO₂ 발생이 3~6nL·g FW⁻¹ 내외이었으나, '후지'에서는 0.3~0.6nL·g FW⁻¹ 내외를 나타내어 사과 품종 간에 CO₂ 발생 양상에 있어서 뚜렷한 차이를 보여 주었다. 일반적으로 사과 품종 간에는 과실에서 CO₂ 발생량에 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 조생종인 '갈라'의 경우 과실 성숙기에 에칠렌 생성의 climacteric 양상이 뚜렷하고 높게 나타나는 것에 반해, 만생종인 '후지'의 경우에는 에칠렌 생성량이 '갈라'의 1/100 수준이었다(Jobling 등, 1995). 그러므로 에칠렌 발생과 CO₂ 발생에 있어서의 '후지' 품종의 특성이 형질전환에서 recalcitrant 품종으로 알려진 것과도 관계되는 것으로 생각되었다. 이러한 품종 간의 생리적 특성이 명확히 밝혀진 바는 아직까지 없으나, 품종 간에 잎의 두께와 polyphenol 함량의 차이가 있는 것과도 관계되는 것으로 보아진다.

적 요

사과 '갈라'와 '후지'의 *Agrobacterium*-mediated 형질전환에서 silver nitrate (AgNO₃) 및 aminoethoxyvinylglycine (AVG)가 기내 CO₂ 농도와 신초 재분화 및 형질전환 반응에 미치는 영향을 평가하고자 본 연구를 수행하였다. 기내 배양 신초의 어린 잎 절편체의 균 접종 및 공동배양 후, 0, 10, 20, 40 및 80 μ M의 5수준 AgNO₃, 또는 0, 10, 35 및 70 μ M의 4수준 AVG를 첨가한 재분화 선발배지에 첨가하여 배양 1주일 간격으로 CO₂ 발생 농도를 측정하였다.

'갈라'의 경우 형질전환율은 AgNO₃의 0 μ M 또는 10 μ M 첨가에서 가장 높게 나타났고, '후지'의 경우는 40 μ M 첨가에서 가장 높게 나타났다. 반면 AVG의 첨가에서는 모든 농도에서 신초 재분화가 저해되었다. AgNO₃의 첨가에 따른 기내 CO₂ 농도는 '갈라'의 경우 0, 10, 20 μ M 처리에서 5~7nL·g FW⁻¹로 높게 나타났고, 40 μ M 이상에서는 2~3nL·g FW⁻¹로 낮게 나타났다. 이와 달리 '후지'의 경우 40 μ M에서 가장 높은 1.0nL·g FW⁻¹ 내외이었으나, 다른 농도에서는 0.4~0.8nL·g FW⁻¹ 내외의 낮은 편이었다. 한편, AVG의 처리에서는 '갈라'와 '후지'의 경우 모두 CO₂ 발생이 크게 억제되었다. 따라서 사과 품종 간 재분화 및 형질전환 반응의 차이가 AgNO₃ 및 AVG 처리에 따른 품종 간 CO₂ 발생 양상과 관계되는 것으로 나타났다.

주요어 : 재분화 및 형질전환 반응, CO₂ 발생, 품종

인 용 문 헌

- Bolar, J.P., S.K. Brown, J.L. Norelli, and H.S. Aldwinckle. 1999. Factors affecting the transformation of Marshall McIntosh apple by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 55:31-38.
- Bondt, A, K. Eggermont, P. Druart, M. De Vil, I. Goderis, J. Vanderleyden, and W.F.

- transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. *Plant Cell Rep.* 13:587-593.
- Ezura, H., K.I. Yuhashi, T. Yasuta, and K. Minamisawa. 2000. Effect of ethylene on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to melon. *Plant Breeding* 119:75-79.
- James, D.J. A.J. Passey, D.J. Barbara, and M.W. Bevan. 1989. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Rep.* 7:658-661.
- Jobling, J.J. and W.B. McGlasson. 1995. A comparison of ethylene production, maturity, and controlled atmosphere storage life of Gala, Fuji, and Lady Williams apples (*Malus domestica* Borkh). *Postharvest Biol. Technol.* 6:209-218.
- Kumar, P.P., C.D. Rao, and C.J. Goh. 1996. Ethylene and CO₂ affect direct shoot regeneration from the petiolar ends of *Paulownia kawakamii* leaves cultures in vitro. *Plant Growth Reg.* 20:237-243.
- Pereira-Netto, A.B. 2001. Effect of inhibitors of ethylene biosynthesis and signal transduction pathway on the multiplication of in vitro-grown *Hancornia speciosa*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 66:1-7.
- Poneleit, L.S. and D.R. Dilley. 1993. Carbon dioxide activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate(ACC) oxidase in ethylene biosynthesis. *Postharvest Biol. Technol.* 3:191-199.
- Puite, K.J. and J.G. Schaart. 1996. Genetic modification of the commercial apple cultivars Gala, Golden Delicious and Elstar via an *Agrobacterium*-mediated transformation method. *Plant Sci.* 119:125-133.
- Seong, E.S., J.E. Cha, S.W. Park, C.Y. Yu, and K.J. Song. 2003. The effect of *Agrobacterium* density on transformation efficiency in apple. *Korean J. Plant Biotech.* 30:215-219.
- Seong, E.S., K.J. Song, S. Jegal, C.Y. Yu, and I.M. Chung. 2005. Silver nitrate and aminoethoxyvinylglycine affect *Agrobacterium*-mediated apple transformation. *Plant Growth Reg.* 45:75-82.
- Song, K.J., S.Y. Ahn, J.H. Hwang, Y.U. Shin, S.W. Park, and G.H. An., 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of 'McIntosh Wijcik' apple. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 41(6):541-544.
- Tisserat, B., S.F. Vaughn, and R. Silman. 2002. Influence of modified oxygen and carbon dioxide atmospheres on mint and thyme plant growth, morphogenesis, and secondary metabolism in vitro. *Plant Cell Rep.* 20:912-916.
- Yao, J.L., D. Cohen, R. Atkinson, K. Richardson, and B. Morris. 1995. Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala. *Plant Cell Rep.* 14:407-412.
- Yang, S.F. 1985. Biosynthesis and action of ethylene. *HortSci.* 20:41-45.

