배추 작물에 이원적 전사유도 시스템 도입을 위한 조기 검증방법 확립

김수윤¹ · 유희주² · 김정호¹ · 조명철¹ · 박미희^{1*}

¹국립원예특작과학원 채소과, ²가톨릭대학교 생명과학과

Establishment of Early Verification Method for Introduction of the Binary Trans-activation System in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis*)

Soo-Yun Kim¹, Hee-Ju Yu², Jeong-Ho Kim¹, Myeong-Cheoul Cho¹, and Mehea Park^{1*}

¹Vegetable Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Suwon 440-706, Korea

²Department of Life Sciences, The Catholic University of Korea, Bucheon 420-743, Korea

Abstract. Binary trans-activation (pOp/LhG4) system is one of the regulatory systems of transgene expression. The target gene expression is achieved by crossing the reporter plants with an activator in this system. In this study, we used the features of this system in Chinese cabbage as a way to protect genetic resources and new varieties. To establish pOp/LhG4 system in Chinese cabbage, we designed an activator (35SLhG41300), and reporter constructs (pOpGUSBart) and co-transformed using *Agrobacterium*. The transgenic plants were selected by antibiotics and the functional activity of pOp/LhG4 system was confirmed by *GUS* expression. To induce the tissue-specific function, we constructed pOp/LhG4 system (795LhGBart) using female tissue specific promoter (ProAt1g26795) of *Arabidopsis*. Co-transformed transgenic plants clearly showed tissue specific expression in *Arabidopsis*. The results suggest the possibility of the system's application of F₁ generation can be restricted by expressing the target gene to protect a new variety and genetic resource in Chinese cabbages.

Additional key words: co-transformation, Hoyer's medium, promoter, β -glucuronidase

서 언

배추는 우리나라에서 중요한 채소로써, 국내 전체 채소종자 수출량의 10%(Korean seed association, 2011)를 차지하는 중요한 작물이다. 육종기술이 빠르게 발달하고, 해외 종자 생산량이 증가함에 따라 우수한 원예작물의 유전자원 및 신품종 보호를 위한 다각적인 방법이 요구되고 있다.

배추속 작물에서 옹성불임은 중요한 채종 기술로 일대 잡종 종자 생산에 널리 이용될 수 있는 기술이다. 옹성 불임은 다른 작물에서도 중요한 채종 기술로 일찍부터 옹성 배우체 발달에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다(Goldberg et al., 1993; Koltunow et al., 1990). 최근에는 분자 생물학적 방법으로 옹성불임을 유도하는 방법이 담배, 유채, 밀과 배추 등의 작물에서 보고되고 있다(Block et al., 1997; Lee et al., 2003; Mariani et al., 1990). 옹성 불임인 식물체는 자식종자 생산이 안되므로 우수한 유전자원이나 신품종의 유출을 막

을 수 있는 방법으로 이용될 수 있다. 그러나 실제로 옹성불임을 유도하는 방법으로 임성을 완전히 제어하는 데는 한계점이 있기 때문에 종자 형성을 제어할 수 있는 새로운 전략이 요구되고 있다. 종자가 형성되는 기관인 자성배우체는 발달 이상으로 인한 임성이 쉽게 회복될 수 없는 특성이 있어 완전한 상태의 불임을 유도하는 소재로 적합한 특성을 갖추고 있다. 따라서 자성 배우체 발달 관련 유전자 발현 제어를 통해 불임을 유도하는 시스템이 옹성불임을 대신할 수 있는 새로운 대안으로 제시되고 있다.

생명공학 기술의 발달로 형질전환을 통해 외래 유전자를 도입하여 식물의 형질을 개량하는 것이 가능해졌으나, 특정 유전자는 형질전환 식물체의 번식과 생존을 크게 위협할 수 있다. 이러한 문제를 극복하기 위한 방법의 하나로 유전자의 발현을 시간적, 공간적으로 제어할 수 있는 조직 특이적 발현 프로모터가 일부 조직의 세포에서 보고 되었으나 (Gowik et al., 2004; Rogers et al., 2001; Yamamoto et al.,

*Corresponding author: poemmich@korea.kr

※ Received 21 March 2012; Revised 25 July 2012; Accepted 25 September 2012.

199), 실제적으로 작물에 이용할 수 있는 프로모터의 종류는 매우 제한적이라고 할 수 있다.

이원적 전사유도 시스템(binary trans-activation system)은 식물의 성장과 분화, 번식과 같은 기본 생존에 관련한 연구를 위한 형질전환체 생산기술로 각각 독립된 reporter construct와 activator construct가 하나의 시스템으로 작동된다(Moore et al., 1998). Reporter construct의 pOp 프로모터는 35S 프로모터의 lac operator의 반복 염기서열로 이루어져 있으나 고유한 전사 활성이 없으며, activator construct의 activator, *LhG4* 유전자는 yeast의 *GAL4* 단백질의 변형체로서 전사유도 도메인과 lac repressor와 친화성이 높은 DNA 결합부위로 구성되어 있다. pOp 프로모터의 상위 부분은 전사 활성 인자를 특이적으로 인식하는 DNA 결합부위를 가지고 있어 결합 부위에 activator가 결합하는 방법으로 유전자의 발현을 제어한다(Fig. 1). 즉 reporter construct의 pOp 프로모터는 reporter construct가 단독으로 도입된 식물체에서 어떤 발현도 유도하지 않으므로 reporter 식물체는 목적 유전자의 기능에 상관없이 정상적인 발달과 생장을 할 수 있다. 이러한 이원적 전사유도 시스템은 생존능력에 관련된 유전자 조절을 목적으로 하는 경우에 유용하며, 유전자의 기능을 분석하기 위한 유전적 제거(genetic ablation) 실험이나 필수적인 대사의 교란 또는 분열조직의 중요한 양상변화 실험에 응용될 수 있다. 특히, 배 발생과 유식물체의 생존, 종자의 수정 과정 등에 관련한 유전자 발현을 조절하는데 적합한 시스템으로 알려져 있으며, F₁ 식물체 특이적 발현이나 각기 다른 부위의 조직 특이적 발현을 유도해야 할 때 유용한 시스템이다(Baroux et al., 2001; Moore et al., 1998). 지금까지 이 시스템은 애기장대와 담배, 단자엽 작물인 옥수수에서 기능이 검증되었으나(Moore et al., 2006; Lexa et

al., 2003; Segal et al., 2003), 다른 작물에서는 유전자 기능 분석에 이용된 예가 거의 보고되어 있지 않다. 이 시스템은 교배를 통해 생산되는 F₁ 식물체에서 목적 유전자가 발현되기 때문에, 작물에 도입하기 위해서는 모본과 부분의 형질 전환체 육성, 유전형질의 고정과 F₁ 생산 과정이 필요하다. 이러한 방법으로 이 시스템의 기능을 검증하는 것은 긴 시간이 필요하므로 조기에 검증할 수 있는 새로운 방법이 요구된다.

공동형질전환은 형질전환을 위해 2개 이상의 T-DNA를 이용하는 방법으로 서로 다른 위치에 도입된 T-DNA는 멘델의 유전 법칙에 따라 독립적으로 분리하게 된다(Park et al., 2004). 공동형질전환 방법은 일반적으로 사용되는 형질전환 방법은 아니지만 복합형질 도입과 무마커 형질전환체 개발 방법으로 꾸준히 응용되어 사용되고 있다(Dutt et al., 2008; McCormac et al., 2001; Sreeramanan et al., 2006). 그러므로 본 연구에서는 배추 작물의 불임성 소재 개발과 우수한 유전자원 및 신품종 보호를 위해 이원적 전사유도 시스템의 기능을 공동형질전환 방법을 통해 조기 검증하고자 하였다. 또한 자성 배우체 특이적 발현 프로모터를 이원적 전사유도 시스템에 도입하여 조직 특이적으로 발현을 유도하는 이원적 전사유도 시스템의 기능을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

식물 형질전환용 Activator Construct와 Reporter Construct 작성

이원적 전사유도시스템의 구성요소인 activator construct (35SLhG1300)는 *LhG4* 유전자 카세트(Dr. John Bowman 실험실에서 분양 받음)에 35S 프로모터를 삽입한 후 하이그로마이

Fig. 1. Schematic representation of activator and reporter constructs. In the reporter construct, the reporter gene is driven by promoter 'pOp' that lacks intrinsic transcriptional activity. Upstream of this promoter is specific binding sites for a transcription factor *LhG4*. The transcription factor is expressed by activator construct. Promoter: Promoter for *LhG4* gene expression in activator construct. 35S promoter or female gametophyte specific promoter of *Arabidopsis* was used in this experiment. Block box indicated the binding site of transcription factor *LhG4*. *LhG4*, Transcription factors which contained transcription-activation domain-II from *Gal4* of *Saccharomyces cerevisiae* fused to a mutant lac-repressor operator; pOp, Promoter for reporter construct for reporter gene expression in the reporter construct carrying *lac* operators cloned upstream of a minimal promoter; GUS, Reporter gene; Activator, Transcription factor induced from *LhG4* gene. This figure is modified from binary trans-activation models of Moore et al., 1998).

Fig. 2. Schematic map for binary trans-activation construction. (A) Activator construct (35SLhG1300) containing hygromycin resistance gene. Hygromycin, Hygromycin resistance gene; P35S, Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter; LhG4, The chimeric transcription factor modified from GAL4 of *Saccharomyces cerevisiae*; OCS 3', Terminator. (B) Reporter construct (pOpGUSBart) containing herbicides resistance gene. pOp, Operate promoter activated by LhG4 gene; GUS, *GUS* gene; Tnos, Nos terminator; Bar, Herbicides resistance gene. (C) Tissue specific activator construct (795LhGBart) containing herbicides resistance gene. ProAt1g26795, Promoter region of female gametophyte specific gene *At1g26795*; LhG4, activation gene of promoter 'pOp'; OCS 3', Terminator; Bar, herbicides resistance gene.

신($C_{20}H_{37}N_3O_{13}$) 선발 유전자를 포함하고 있는 pCambia1300 카세트에 옮겨 작성하였다(Fig. 2A). 또한 pOp 프로모터 카세트(Dr. John Bowman 실험실에서 분양 받음)에 *GUS*(β -glucuronidase) 유전자를 삽입한 후 제초제 저항성 유전자를 포함하는 pMLBart 카세트에 옮겨서 reporter construct (pOpGUSBart)를 작성하였다(Fig. 2B).

조직 특이적 activator construct 작성을 위해 애기장대의 자성 배우체 특이적 발현 유전자 *At1g26795*의 상위 약 1.1kb 부분을 이용하였다. *LhG4* 유전자 카세트(Dr. John Bowman 실험실에서 분양 받음)에 *At1g26795* 프로모터(Pro*At1g26795*)를 삽입한 후 제초제 저항성 유전자를 포함하는 pMLBart (Gleave, 1992) 카세트에 옮겨 조직 특이적 activator construct (795LhGBart)를 작성하였다(Fig. 2C).

이원적 전사유도 시스템 도입을 위한 공동형질전환

배추 형질전환은 Lee et al.(2000)와 Kang and Park(2001)의 방법을 기초로 '서울' 배추(*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis* cv. Seoul)를 이용하여 수행하였다. 배추의 공동 형질전환은 각각의 카세트가 도입된 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101) 배양액을 혼합하는 방법이 사용되었다(Kim et al., 2008; Komari et al., 1996). 혼합 배양액에 접종한 배추 조직은 공동배양 배지에서 2일간 공동배양 후 하이그로마이신과 phosphinothricin(PPT)가 포함된 선발배지에 치상한 후 2주마다 계대배양하였다.

재분화 신훈은 하이포넥스 발근 배지로 옮겨 발근을 유도한 후 순화하였고, 뇌수분을 통해 세대진전 하였다(Kim et

al., 2011). 애기장대의 형질전환은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*, Columbia-0) 종자와 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101)을 사용하였다. 애기장대의 공동형질전환은 혼합된 배양액을 애기장대의 꽃봉오리에 분무하는 방법이 사용되었으며 접종 후 1일간 온도 25°C, 습도 100% 배양기 내에서 배양하였다. 공동형질전환으로 획득한 애기장대의 T_1 형질전환체는 1차적으로 제초제(0.3%, phosphinothricin)로 선발 한 후 PCR을 이용하여 공동형질전환체를 선발하였다.

GUS 활성 분석을 통한 이원적 전사 유도 시스템 확인

배추 형질전환체에서 *GUS* 유전자의 활성을 확인하기 위하여 *GUS* 염색방법을 이용하였다(Jefferson et al., 1987). 형질전환체의 잎조직을 샘플링하여 *GUS* 침전액에 37°C에서 16시간 동안 침지하였다. 염색이 끝난 조직은 70% 에탄올을 이용하여 염록체를 완전히 제거한 다음 실체 현미경(iMT technology i-30, USA)을 이용하여 관찰하였다.

애기장대 형질전환체의 잎조직과 꽃봉오리는 동일한 방법으로 염색한 후 염록체를 제거하고 관찰하였다. 자성배우체 검경을 위해 암술을 염색한 후 자성배우체만 분리하여 Hoyer 배지를 이용하여 조직을 투명화 한 다음 광학 현미경(Lica DMLB, Germany)으로 관찰하였다(Meinke et al., 1994).

형질전환 식물체 확인을 위한 PCR 검정 및 Southern 분석

PCR 검정과 Southern 분석을 통해 형질전환체의 유전자의 도입여부를 확인하였다. 식물체 내에서 카세트의 도입여부를 확인하기 형질전환 식물체의 잎으로부터 DNeasy

kit(QIAGEN, USA)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. Activator construct (35SLhG1300와 795LhGBart)의 도입을 검정하기 위해 *LhG4* 유전자 특이적 프라이머 F1 (5'-ATGAAACCGGTAACGTTATACGACG-3')과 R2 (5'-TTACTCTTTTTTTGGGTTTGGTGGGG-3')를 사용하였고 reporter construct (pOpGUSBart)의 도입을 검정하기 위하여 *GUS* 유전자 특이적 프라이머 F2 (5'-CAAGAAAAAGCA GTCTTACTTCCATGAT-3')와 R2 (5'-CTATCAGCTCTT TAATGCCTGTAAGT-3')를 사용하였다. PCR 반응은 94°C에서 3분간 변성 후에 94°C에서 30초 55°C에서 30초 72°C에서 1분으로 총 30회 반응한 후 72°C에서 7분 반응시키는 조건으로 수행하였다.

Southern 분석을 위해 2-3g 배추 식물체로부터 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 버퍼를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다(Raz and Ecker, 1997). DNA 농도는 NanoVue(GE healthcare, USA)로 측정한 후 각각의 카세트 도입을 검정하기 위하여 30µg의 DNA를 100units의 *Sa*I (Fig. 2A) 또는 *Not*I(Fig. 2B)으로 각각 자른 후 전기영동하여 Nylon Hybond™-N+ membrane(Amersham Life science, UK)에 블롯팅하였다. Redyprimell™ Random Prime labeling System (Amersham Life science, UK)을 이용하여 *hpt* 유전자와 *bar* 유전자의 탐침을 제작하여 혼성화 반응을 수행한 후 세척하고(Sambrook et al., 1989) BAS-1800II Bio-Imaging

analyzer(FUJIFILM, Japan)를 이용하여 밴드를 확인하였다.

결과 및 고찰

배추에서 이원적 전사유도 시스템 도입 초기 검정을 위한 공동형질전환

배추 작물에서 이원적 전사유도 시스템의 초기 검정을 위해 activator construct(35SLhG1300)와 reporter construct (pOpGUSBart)가 각각 도입된 아그로박테리움을 혼합하여 배추의 절편체에 접종한 후, 하이그로마이신과 PPT가 포함된 배지에서 선발하였다. Activator construct와 reporter construct가 도입되지 않은 절편체는 빠르게 갈변되어 고사하였으나 두 construct가 동시에 도입된 절편체는 캘러스를 형성한 후 신초로 분화되어 총 7974개의 절편체 중에서 8개가 신초로 재분화하였다. 공동형질전환된 재분화 신초를 PCR을 이용하여 검정한 결과, 재분화된 모든 신초에서 activator construct의 *LhG4* 유전자가 증폭된 1346bp의 DNA 밴드와 reporter construct의 *GUS* 유전자가 증폭된 728bp의 DNA 밴드가 증폭되어 각각의 construct가 안정적으로 도입되어 있다는 것을 확인하였다(Figs. 3A and 3B).

대조구로 activator construct(35SLhG1300)와 reporter construct(pOpGUSBart)가 도입된 아그로박테리움을 각각 배추 절편체에 접종하여 형질전환하였다. Activator construct가

Fig. 3. PCR analysis of transgenic Chinese cabbage using gene specific primer sets. (A-B) Dual PCR for transgenic plants co-transformed with binary trans-activation constructs. PCR products indicate amplified *LhG4* gene (1.3 kb) and *GUS* gene (0.7 kb) of each of binary trans-activation constructs. Lane 1-8: Transgenic plants co-transformed with activator construct (35SLhG1300) and reporter construct (popGUSBart). (C) PCR for transgenic plants transformed with activator construct. The arrow indicates approximately 1.3 kb of amplified *LhG4* gene of activator construct. Lane 1-8: Transgenic plants transformed with activator construct (35SLhG1300). (D) PCR for transgenic plants transformed with reporter construct. The arrow indicates approximately 0.7 kb of amplified *GUS* gene of reporter construct. Lane 1-8: Transgenic plants transformed with reporter construct (popGUSBart). M, 1 kb ladder (Invitrogen, USA); NC, Negative control.

도입된 2988개 절편체는 접종 후 하이그로마이신을 포함하는 선발배지에 선발하여 73개의 재분화 식물체를 획득하였다. PCR 검정 결과, *LhG4* 유전자 도입이 확인된 개체는 70개였다. Reporter construct가 도입되어 PPT로 선발된 형질전환체는 7416개 절편체 중에서 18개의 재분화 식물체를 획득하였고, PCR 검정 결과 15개체에서 *GUS* 유전자의 도입을 확인하였다(Figs. 3C and 3D). 배추에서 공동형질전환의 선발효율은 0.1%로써 하이그로마이신의 선발효율 2.3%

보다 낮았지만 PPT의 선발효율 0.2%와는 큰 차이가 없었다. 이러한 공동형질전환의 선발 효율은 공동형질전환이 다양한 목적으로 배추의 형질전환체 생산에 이용될 수 있는 가능성을 보여 주는 것으로 생각된다. PCR 검정으로 유전자 도입여부를 확인한 형질전환체는 Southern 분석을 통하여 도입 유전자 수를 확인하였다. Southern을 통한 검정결과, 형질전환되지 않은 대조군(NC)에서는 어떠한 밴드로 나타나지 않았으나 형질전환된 식물체는 1-6개의 밴드가 확인되어 각각의 이원적 전사유도 카세트가 배추의 genomic DNA 내에 각각 안정적으로 도입되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

Fig. 4. Southern blot analysis of Chinese cabbage co-transformed with binary trans-activation constructs using *hpt* gene (A) and *bar* gene (B) as probes. Lane 1-8: Co-transformed transgenic plants with activator construct (35SLhG1300) and reporter construct (popGUSBart). Leaf tissues were taken from the transgenic plants shown in Figs. 3A and 3B. M, λ HindIII DNA ladder; NC, Genomic DNA of Chinese cabbage variety 'Seoul' as a negative control.

배추 형질전환체의 *GUS* 활성 분석을 통한 이원적 전사유도 시스템 검정

이원적 전사유도 시스템의 기능을 검정하고자 reporter 유전자 *GUS*의 발현을 분석하였다. 형질전환된 배추 형질전환체(T_0 세대)의 잎 조직을 *GUS* 침전액에 염색하여 관찰한 결과 공동형질전환된 식물체의 잎 조직은 모두 푸른색이 나타났으나, activator construct 또는 reporter construct 단독으로 도입된 형질전환체의 잎은 모두 색이 나타나지 않았다(Figs. 5A, 5B, 5C, and 5D). 공동형질전환된 식물체의 *GUS* 발현은 형질전환 내의 activator *LhG4*가 reporter construct를 활성화시켜 이원적 전사유도 시스템이 정상적으로 작동되었기 때문에 *GUS* 유전자의 발현이 유도된 것으로 생각된다. 한편 각각 형질전환된 대조구는 activator의 부재로 프로모터 pOp가 활성화 되지 않아 reporter 유전자인 *GUS* 유전자가 발현되지 않아 푸른색을 띄지 않은 것으로 생각된다(Figs. 5E, 5F, 5G, and 5H). 또한 activator construct와

Fig. 5. Histochemical assay in leaf tissue of Chinese cabbage transformed with binary transactivation system. (A-D) Transgenic plants co-transformed with activator construct (35SLhG1300) and reporter construct (popGUSBart). Leaf tissues were taken from the transgenic plants shown in lane 1, 3, 4 and 5 of Figs. 3A and 3B. (E-F) Transgenic plants transformed with activator construct (35SLhG1300) as a negative control. Leaf tissues were taken from the transgenic plants shown in lane 2 and 3 of Fig. 3C. (G-H) Transgenic plants transformed with reporter construct (popGUSBart) as a negative control. Leaf tissues were taken from the transgenic plants shown in lane 1 and 2 of Fig. 3D.

reporter construct가 독립적으로 도입된 대조구는 앞으로, 부분을 이용한 이원적 전사유도 시스템 검정에 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

위의 결과는 배추 형질전환체에서 activator와 프로모터의 활성화에 의해 reporter 유전자의 발현이 유도되는 것을 보여줌으로써 이원적 전사유도 시스템이 배추작물에서 이용될 수 있다는 것을 보여주고 있다. 또한 이 시스템의 이용가능성을 공동형질전환 방법으로 검정하여 이원적 전사유도 시스템의 기능을 배추 작물에서 조기에 검정할 수 있는 방법을 구축하였다.

애기장대의 조직 특이적 프로모터를 이용한 이원적 전사유도 시스템의 기능 검정

이원적 전사촉진 시스템의 활용성을 높이기 위하여 이 시스템에 조직 특이적 프로모터를 도입하여 기능을 검정하였다. 조직 특이적 프로모터 중에서 자성배우체 특이적 발현 프로모터(*ProAtlg26795*)를 도입한 activator construct(795LhGBart)를 작성 후 reporter construct와 동시에 애기장대에 공동형질전환 하였다(Fig. 2C). 제초제 저항성을 가진 32개 형질전환체 중에서 activator construct와 reporter construct가 도입된 형질전환체는 각각 78.1%와 84.3%였으며 두 construct가 동시에 도입된 개체는 20개체로써 전체 형질전환체의 62.5%를 차지하였다. 또한 공동형질전환체 중에서 activator construct와 reporter construct가 단독으로 형질전환되어 제초제 저항성을 가지는 형질전환체는 각각 16.5%와 21.8%

로써 두 종류의 카세트를 이용한 공동형질전환의 효율이 대체적으로 높다는 것을 알 수 있었다(Fig. 6).

16개의 형질전환체 중에서 2단계의 PCR 검정을 통해 선발된 10개의 T₁ 공동형질전환체를 이용하여 reporter 유전자의 발현을 분석하였다. *GUS* 발색시약에 암술 조직을 침지한 결과 공동형질전환된 애기장대의 암술조직 내의 자성 배우체에서 *GUS* 유전자의 발현에 의해 푸른색이 나타났다(Fig. 7A). 또한 화기의 어린 꽃 봉오리에서도 약간의 푸른

Fig. 6. Dual PCR of transgenic *Arabidopsis* co-transformed by using binary trans-activation system with tissue-specific promoter. Lane 1-16, T₁ transgenic plants; M, 1 kb ladder (Invitrogen, USA). PCR analysis for detection *LhG4* gene (A) and *GUS* gene (B) using gene specific primer set. The arrow is indicated approximately 1.3 kb of amplified *LhG4* (A) and 0.7 kb of amplified *GUS* product (B).

Fig. 7. Histochemical assay of *Arabidopsis* transformed by using binary trans-activation system with tissue-specific promoter. Transgenic plants co-transformed with female gametophyte specific activator construct and reporter construct: Female gametophyte (A), Flower buds (B), and Leaf (C). Transgenic plants transformed with female gametophyte specific activator construct: Female gametophyte (D), Flower buds (E), Leaf (F). Transgenic plants transformed with reporter construct: Female gametophyte (G), Flower buds (H), Leaf (I). Scale bar: 50 μ m.

색을 띄었는데 이는 *GUS* 염색이 변진 것으로 생각되며, 대부분이 자성 배우체에서만 선명한 푸른색을 나타내었고 (Fig. 7B), 잎 조직에서는 *GUS* 유전자의 발현이 관찰되지 않았다(Fig. 7C). 이 결과는 이원적 전사유도 시스템에서 reporter 유전자의 발현이 activator의 발현패턴과 동일하게 나타나는 특성으로 조직특이적으로 발현하는 activator에 의해 reporter 유전자 *GUS*가 조직특이적으로 유도된 것이라고 생각된다. 반면에 activator construct 또는 reporter construct가 단독으로 도입된 형질전환체의 자성 배우체는 푸른 색을 나타내지 않았으며 화기와 잎 조직에서도 *GUS* 유전자 발현이 관찰되지 않았다(Figs. 7D, 7E, 7F, 7G, 7H, and 7I).

본 실험에 사용된 조직 특이적 프로모터(*ProAtlg26795*)를 리포터 유전자를 이용하여 배추작물에서 검정한 결과, 조직 특이적인 발현을 보였으므로(자료 미제시) 이 프로모터는 앞으로 이원적 전사유도 시스템과 더불어 배추작물에 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 이 시스템은 activator construct가 도입된 식물체와의 교배를 통해서만 reporter 유전자의 발현을 유도할 수 있어, 목적 유전자의 기능에 관계없이 reporter construct가 도입된 형질전환체는 정상적인 생육을 나타낸다(Moore et al., 1998). 따라서 자성 배우체 발달 관련과 같은 식물 생존과 번식에 치명적인 영향을 미칠 수 있는 유전자의 발현제어에 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 즉 배추의 자성 배우체 발달에 필수적인 유전자를 reporter construct에 자성 배우체 특이적 프로모터를 activator construct로 작성하여 모본과 부분으로 형질전환한 후 교배를 통하여 자성불임 F₁을 생산하는 방법으로 불임성 소재 개발에 사용될 수 있을 것이다. 또한 최근 애기장대의 자성 배우체 돌연변이체와 유전자 침을 기반으로 한 자성 배우체 발달과 자성불임 기능 연구에 대한 유전자 정보가 축적되고 있으므로(Drews and Yadegari 2002; Yu et al, 2005) 이들 유전자의 발현을 이원적 전사유도 시스템을 통하여 제어함으로써 자성 배우체 불임을 유지하는 방법으로 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 이것은 목적 유전자의 발현을 시간적 공간적으로 조절할 수 있는 종합 제어 시스템으로 앞으로 배추 작물의 불임성 소재 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것이며 더 나아가 우수한 유전자원을 보호하는 전략에 응용 될 수 있을 것으로 생각된다.

초 록

이원적 전사유도 시스템(binary trans-activation system)은 도입유전자의 발현을 조절하는 기작(mechanism) 중에 하나로, 목적 유전자의 발현이 전사활성 인자를 가지고 있

는 식물체와의 교배를 통해서만 발현되는 시스템이다. 본 연구에서는 이원적 전사유도 시스템을 원에 작물의 우수한 유전자원 및 신품종 보호 방법으로 이용하고자, 배추에서 이 시스템의 기능을 검정하였다. 배추작물에서 이원적 전사유도 시스템의 이용가능성을 검정하기 위하여 activator construct(35SLhGBart)와 reporter construct(pOpGUS1300)를 작성하였고 공동형질전환방법으로 배추에 형질전환하였다. 두 종류의 카세트가 도입된 형질전환체는 항생제를 이용하여 선발하였으며, 재분화된 신초의 *GUS* 유전자 발현으로 이 시스템의 활성을 확인하였다. 또한 이 시스템을 조직 특이적으로 유도하기 위하여 애기장대의 자성 배우체 특이적 프로모터를 이용하여 activator construct(795LhGBart)를 작성하여 애기장대에 형질전환 하였다. 공동형질전환된 애기장대는 자성 배우체에서 조직 특이적인 발현을 나타냈다. 이러한 결과는 이원적 전사유도 시스템이 목적유전자의 발현을 배추의 F₁ 종자에서 선택적으로 유도하는 방법으로써 우수한 유전자원 및 신품종 보호에 이용될 수 있다는 것을 보여주는 것이라고 생각된다.

추가 주요어 : 공동형질전환, Hoyer 배지, 프로모터, β -glucuronidase

인용문헌

- Baroux, C., R. Blanvillain, and P. Gallois. 2001. Paternally inherited transgenes are down-regulated but retain low activity during early embryogenesis in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 509:11-16.
- Block, M.D., D. Debrouwer, and T. Moens. 1997. The development of a nuclear male sterility system in wheat. Expression of the *barnase* gene under the control of tapetum specific promoters. *Theor. Appl. Genet.* 95:125-131.
- Drews, G.N. and R. Yadegari. 2002. Development and function of the angiosperm female gametophyte. *Annu. Rev. Genet.* 36:99-124.
- Dutt, M., Z.T. Li, S.A. Dhekney, and D.J. Gray. 2008. A co-transformation system to produce transgenic grapevines free of marker genes. *Plant Sci.* 175:423-430.
- Gleave, A.P. 1992. A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Mol. Biol.* 20: 1203-1207
- Goldberg, R.B., T.P. Beals, and P.M. Sanders. 1993. Anther development: Basic principles and practical applications. *Plant Cell* 5:1217-1229.
- Gowik, U., J. Burscheidt, M. Akyildiz, U. Schlue, M. Koczor, M. Streubel, and P. Westhoff. 2004. *cis*-Regulatory elements for mesophyll-specific gene expression in the C₄ plant *Flaveria trinervia*, the promoter of the C₄ phosphoenolpyruvate

- carboxylase gene. *Plant Cell* 16:1077-1090.
- Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh, and M.W. Bevan. 1987. *GUS* fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Plant Cell Physiol.* 6:3901-3907.
- Kang, B.K. and Y.D. Park. 2001. Effect of antibiotics and herbicide on Shoot regeneration from cotyledon and hypocotyl explants of Chinese cabbage. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 19:17-21.
- Kim, K.H., J.E. Lee, S.H. Ha, B.S. Hahn, J.S. Park, M.H. Lee, C.S. Jung, and Y.H. Kim. 2008. *Perilla* transformation using selection markers containing antibiotics and basta. *J. Plant Biotechnol.* 35:299-306.
- Kim, S.Y., J.S. Kim, J.A. Kim, B.S. Park, J.K. Hong, Y.D. Part, and Y.H. Lee. 2011. Induction of *Brassica rapa* transgenic plant line showing delayed bolting time using over expression of *BrFLC* genes. *Korean J. Intl. Agri.* 23:218-225.
- Koltunow, A.M., J. Truettner, K.H. Cox, M. Wallroth, and R.B. Goldberg. 1990. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell* 2:1201-1224.
- Komari, T., Y. Hiei, Y. Saito, N. Murai, and T. Kumashiro. 1996. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.* 10:165-174.
- Korean Seed Association. 2011. Current extent of vegetable seed's exports in 2011. http://www.kosaseed.or.kr/html/mu4_sub02_view.asp?bbs_num=1222.
- Lee Y.H., S.B. Lee, S.C. Suh, M.O. Byun, and H.I. Kim. 2000. Herbicide-resistant cabbage (*Brassica oleracea* ssp. *capitata*) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *J. Plant Biotechnol.* 2:35-41.
- Lee Y.H., K.H. Chung, H.U. Kim, Y.M. Jin, H.I. Kim, and B.S. Park. 2003. Induction of male sterile cabbage using a tapetum-specific promoter from *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*. *Plant Cell Rep.* 22:268-273.
- Lexa, M., T. Genkov, J. Malbeck, I. Machackova, and B. Brzobohaty. 2003. Dynamics of endogenous cytokinin pools in tobacco seedlings: A modeling approach. *Ann Bot.* 91: 585-597.
- McCormac, A.C., M.R. Fowler, D.F. Chen, and M.C. Elliott. 2001. Efficient co-transformation of *Nicotiana tabacum* by two independent T-DNAs, the effect of T-DNA size and implications for genetic separation. *Transgenic Res.* 10:143-155.
- Mariani, C., M.D. Beuckeleer, J. Truettner, J. Leemans, and R.B. Goldberg. 1990. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347:737-741.
- Meinke, D.W. 1994. Seed development in *Arabidopsis*, p. 253-295. In: E.M. Meyerowitz and C.R. Somerville (eds.). *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Moore, I., L. Gälweiler, D. Grosskopf, J. Schell, and K. Palme. 1998. A transcription activation system for regulated gene expression in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:376-381.
- Moore, I., M. Samalova, and S. Kurup. 2006. Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *Plant J.* 45:651-83.
- Park, J., Y.K. Lee, B.K. Kang, and W.I. Chung. 2004. Co-transformation using a negative selectable marker gene for the production of selectable marker gene-free transgenic plants. *Theor. Appl. Genet.* 109:1562-1567.
- Raz, V. and J. Ecker. 1997. *Analyzing DNA: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Rogers, H.J., N. Bate, J. Combe, J. Sullivan, J. Sweetman, C. Swan, D.M. Lonsdale, and D. Twell. 2001. Functional analysis of *cis*-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene *g10*. *Plant Mol Biol.* 45:577-585.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Segal, G., R. Song, and J. Messing. 2003. A new opaque variant of maize by a single dominant RNA-interference-inducing transgene. *Genetics* 165:387-397.
- Sreeramanan, S., M. Maziah, N.M. Rosli, M. Sariah, and R. Xavier. 2006. Particle bombardment-mediated co-transformation of chitinase and β -1, 3 glucanase genes in Banana. *Biotechnology* 5:203-216.
- Yamamoto, Y.T., C.G. Taylor, G.N. Acedo, C.L. Cheng, and M.A. Conkling. 1991. Characterization of *cis*-acting sequences regulating root-specific gene expression in tobacco. *Plant Cell* 3:371-382.
- Yu, H.J., P. Horgan, and V. Sundaresan. 2005. Analysis of the female gametophyte transcriptome of *Arabidopsis* by comparative expression profiling. *Plant Physiol.* 139:1853-1869.