


석사학위논문

까마중(*Solanum nigrum* L.)의 재분화조건 확립과  
Cytochrome P450 유전자를 이용한 형질전환

The logo of Jeju National University is a large, stylized letter 'J' composed of three curved, flame-like shapes in blue, green, and grey. In the center of the 'J' is a smaller logo featuring an open book and the text 'JEJU 1952'. The text 'JEJU NATIONAL UNIVERSITY 1952' is written in a circular path around the 'J' logo, and '제주대학교' is written in Korean characters below it.

제주대학교 대학원

생명과학과

이 세 영

2010년 2월

까마중(*Solanum nigrum* L.)의 재분화조건 확립과  
Cytochrome P450 유전자를 이용한 형질전환

지도교수 고 석 찬

이 세 영

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2010년 2월

이세영의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 \_\_\_\_\_ 김 문 흥 ⑩

위 원 \_\_\_\_\_ 오 순 자 ⑩

위 원 \_\_\_\_\_ 고 석 찬 ⑩

제주대학교 대학원

2010년 2월

Regeneration and transformation with  
cytochrome P450 gene of  
black nightshade (*Solanum nigrum* L.)

Se Yeong Lee

(Supervised by Professor Seok Chan Koh)

A thesis submitted in partial fulfillment of the degree of Master  
of Science

2010. 2.

Department of Life Science

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

## Abstract

This study was conducted in order to transform *Solanum nigrum* L. with *Arabidopsis* CYP78A6 gene presumed as a cytochrome P450 gene and to investigate on the responses to environmental damages and diseases, the resistance to herbicides, the production of useful substances, and the medical value from transformed plants.

The regeneration conditions of the leaf and shoot segments of *Solanum nigrum* L. are similar each other: calli developed well on the MS medium with NAA 0.5 mg/ℓ, multiflous shoots differentiated well on MS medium with BAP 2.0 mg/ℓ, and roots differentiated well on the MS medium with IBA 0.1 mg/ℓ from both of the leaf and shoot segments. Using these culture conditions, therefore, regenerated plantlets were obtained from the shoot and leaf segments, or calli, and subsequently the regenerated plantlets were acclimated on vermiculite in pot.

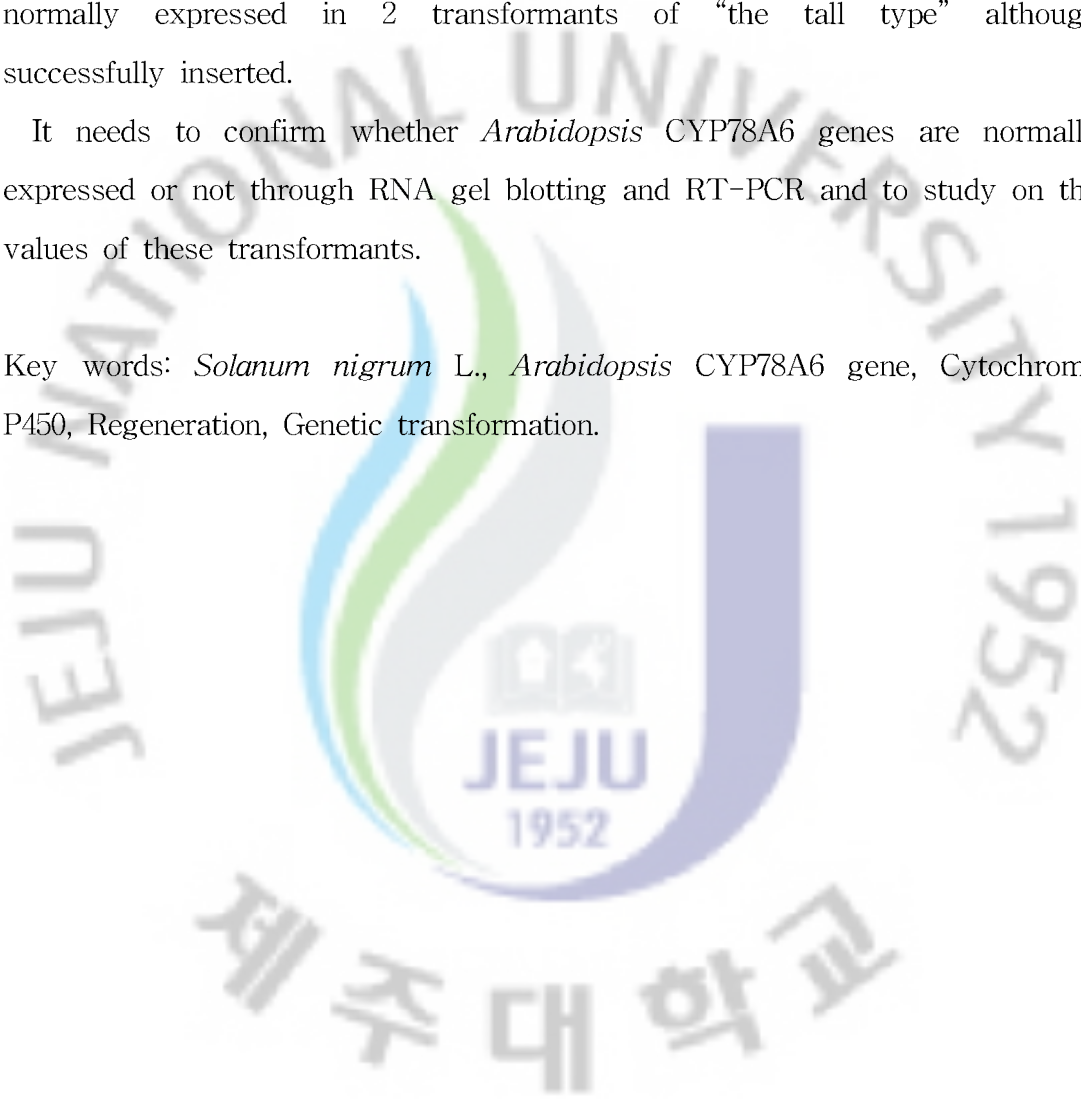
For genetic transformation, leaf segments of *Solanum nigrum* L. were co-cultured with *Agrobacterium* GV3101 including *Arabidopsis* CYP78A6 genes and subsequently cultured on MS medium including BAP 2.0 mg/ℓ, kanamycin 100 mg/ℓ and carbenicillin 100 mg/ℓ to induce multiflous shoots. Shoots isolated from multiflous shoots were acclimated on vermiculite in pot. From this transformation experiment, 2 types of transformants, "the dwarf type" and "the tall type", were observed. Differentiation and initial growth rate of these transformants slowed down to 2 times as slow as those of the control plants.

The PCR analysis was executed in order to confirm whether genes are inserted into *Solanum nigrum* L. or not. As results, NPTII genes which is a negative selective marker gene were transferred into all transformants while

*Arabidopsis* CYP78A6 genes not into 1 transformant of "the tall type". However, morphological characteristics of all transformants of "the tall type" are similar each other regardless that *Arabidopsis* CYP78A6 genes were inserted or not. These results suggest that *Arabidopsis* CYP78A6 genes were inserted into and normally expressed in "the dwarf type" and that it did not normally expressed in 2 transformants of "the tall type" although successfully inserted.

It needs to confirm whether *Arabidopsis* CYP78A6 genes are normally expressed or not through RNA gel blotting and RT-PCR and to study on the values of these transformants.

Key words: *Solanum nigrum* L., *Arabidopsis* CYP78A6 gene, Cytochrome P450, Regeneration, Genetic transformation.



## 목차

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| Abstract .....                   | i   |
| 목 차.....                         | iii |
| List of Figures .....            | iv  |
| List of Table.....               | iv  |
| I. 서론.....                       | 1   |
| II. 재료 및 방법 .....                | 4   |
| 1. 식물재료.....                     | 4   |
| 2. 재분화 및 토양 순화.....              | 5   |
| 3. 형질전환.....                     | 6   |
| 4. 형질전환체의 확인.....                | 7   |
| III. 결과 및 고찰.....                | 9   |
| 1. 재분화를 위한 기관분화 조건 확립.....       | 9   |
| 1.1. 기관분화에 미치는 NAA와 BAP의 효과..... | 9   |
| 1.2. 효과적인 뿌리유도 조건 확립.....        | 13  |
| 2. 캘러스를 통한 식물체 재분화.....          | 17  |
| 3. 형질전환 양상.....                  | 20  |
| 3.1. 항생제 적정 농도 규명.....           | 20  |
| 3.2. 신초 재분화.....                 | 22  |
| 3.3. 발근 및 순화.....                | 24  |
| 4. 형질전환체의 확인.....                | 26  |
| IV. 요 약.....                     | 28  |
| V. 참고문헌.....                     | 30  |

## List of Figure

|   |    |
|---|----|
| Figure. 1. Oxidazation of substrates by Cytochrome P450에  | 2  |
| Figure. 2. Four week-old seedlings of <i>Solanum nigrum</i> L.  | 4  |
| Figure. 3. The culture of stem segments of <i>Solanum nigrum</i> L.                                     | 10 |
| Figure. 4. The culture of leaf segments of <i>Solanum nigrum</i> L.                                     | 12 |
| Figure. 5. Root formation from adventitious shoot   | 15 |
| Figure. 6. Plant regeneration from callus induced from stem segments of<br><i>Solanum nigrum</i> L.     | 18 |
| Figure. 7. Plant regeneration from callus induced from leaf segments of<br><i>Solanum nigrum</i> L.     | 19 |
| Figure. 8. Response of leaf segments of <i>Solanum nigrum</i> L.  | 21 |
| Figure. 9. Genetic transformation of <i>Solanum nigrum</i> L. with <i>Arabidopsis</i><br>CYP78A6 gene   | 23 |
| Figure. 10. Morphological characteristics of plants transformed with<br><i>Arabidopsis</i> CYP78A6 gene | 25 |
| Figure. 11. Leaf forms of the leaf  | 25 |
| Figure. 12. PCR analysis of NPTII gene and cytochrome P450 gene   | 27 |

## List of Table

|   |    |
|---|----|
| Table. 1. Growth of roots from adventitious shoot | 16 |
|---|----|

## 서론

Cytochrome P450 (P450)은 모든 고등식물, 동물, 곤충, 곰팡이, 세균에 존재하는 다기능 효소계이다 (Pyon, 2000). Cytochrome P450은 소포체, 미토콘드리아, 원형질막, 글리옥시솜을 포함한 세포막 물질(microsome)에서 볼 수 있으며, 약 55kDa의 분자량을 갖고 있다 (Diehl *et al.*, 1995). Cytochrome P450은 cytochrome P450 monooxygenase 효소계 (EC 1.14.14.1)를 총칭하며, 60개 이상의 반응을 촉매한다 (Wislocki *et al.*, 1980). Cytochrome P450에 의해 촉매 되는 반응은 대부분 산화반응이며 (Fig. 1) 일반적 반응식은 다음과 같다.



고등식물에서 Cytochrome P450은 발아 중인 배유, 황화된 유식물의 지상부, 유근, 하배축, 자엽 및 성장점에서 검출된다 (Ohkawa *et al.*, 1996). Cytochrome P450은 내생기질뿐만 아니라 외부기질, 즉 항생제, 농약, 기타 유기화합물 등의 대사를 촉진하며, 다양한 외부물질의 불활성화 및 활성화대사에서 중요한 역할을 한다 (Porter *et al.*, 1991). Cytochrome P450효소는 불안정하고 대부분 식물조직에서 활성수준이 매우 낮으며 식물에서 cytochrome P450의 생성물은 소수성을 나타내기 때문에 cytochrome P450을 분리하여 그 특성을 연구하는 어려움이 많았다 (Donaldson and Luster, 1991). 그러나 cytochrome P450은 여러 요인에 의하여 효소의 활성 자체가 증진되기도 하는데, 이에 관여하는 것은 광, 상처, 병원균, 외부물질인 제초제, 제초제 해독제, 중금속, 에탄올, phenobarbital 등을 예로 들 수 있다 (Pyon and Balke, 1997). 따라서 식물의 P450에 관한 연구는 식물의 환경반응이나 병해, 제초제 저항성 및 유용물질의 생산에 관한 기작을 해명하고, 더 나아가 관련된 유전자를 조작하거나 조절함으로써 식물에 새로운 기능을 부여하려는 시도로 이루어지고 있다 (Doo, 2007).



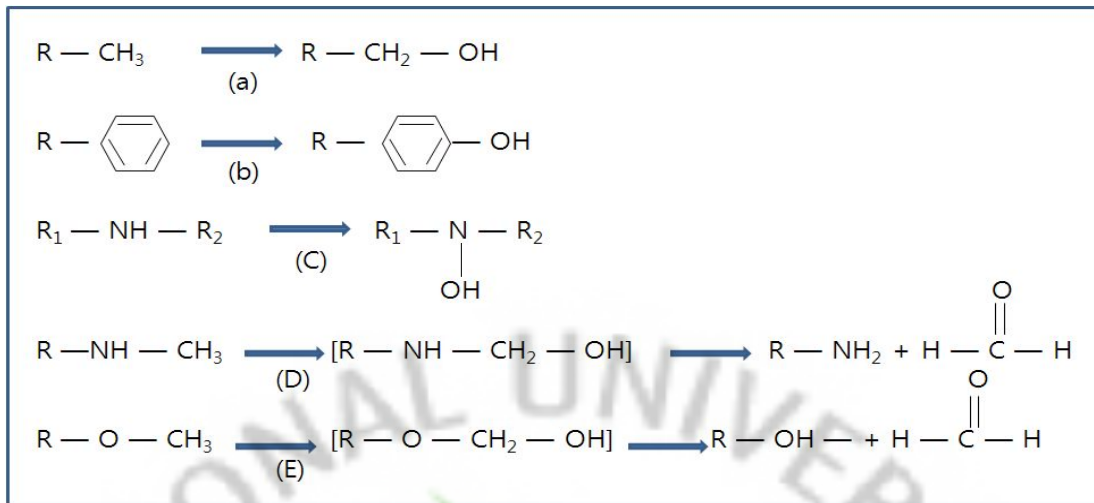


Figure 1. Oxidization of substrates by Cytochrome P450

- (a) oxidation of saturated hydrocarbon      (b) Hydroxylation of aromatic compounds  
(c) N-hydroxylation                              (d) N-dealkylation                              (e) O-dealkylation

까마중(*Solanum nigrum* L.)은 가지과에 속하는 1년생 초본으로 미국, 중국, 오스트레일리아 및 우리나라 전국 각지의 야산이나 들에 분포하고 있으며, 어린 잎은 나물로 이용되고 열매는 흑색으로 완전히 익으면 단맛이 있어 식용으로 이용되고 있다. 지상부와 뿌리를 말린 것을 용규(龍葵)라고 하며, 청열, 해독, 활혈, 소종에 효능이 있고, 옹종, 단독, 만성기관지염, 급성신장염을 치료한다고 보고되어 왔다 (Bae, 2000). 일본에서는 까마중의 미성숙 종자에서 항암효과가 있는 solasonine, solamargine, diosgenin, solasodine 같은 스테로이드성 배당체를 발견하기도 하였다 (Saijo *et al.*, 1982). 또한 까마중을 포함한 가지과 식물의 잎은 단백질과 아미노산, 칼슘을 포함하는 미네랄, 철과 인, 비타민 A와 C, 지방과 섬유소, 게다가 다른 식물에는 부족한 메티오닌, 아미노산의 함량도 높으며, 열매는 많은 양의 철, 칼슘, 비타민 B와 C, 카로틴을 함유하고, 종자도 매우 많은 비타민 C와 카로틴을 함유하고 있다. 이러한 영양학적 측면 때문에 까마중은 세계 각지에서 채소 작물로도 널리 사용되어 왔는데 중국에서는 고대에 기근 작물로 사용되었다고 기록이 남아있다 (Henderson, 1974). 이외에도 까마중은 종종 ‘spinach’라 불리며, 식량자원으로서, 그리고 민간요법으로도 중요하게 여겨졌다. 현재 감자, 토마토, 피망, 고추 같은 다른 가지과 식물들은 전 세계적으로 잘 알려져 있

는 채소작물인 반면에 까마중은 고대에는 채소작물로서의 가치도 높았으며, 민간 요법으로도 많이 사용되었던 식물임에 틀림이 없지만 현재에는 그러한 주요 가치는 거의 찾아볼 수가 없으며, 약용적 가치는 지속적인 연구가 필요한 실정이다.

토양미생물 중에 자연상태에서 식물세포를 감염시킬 수 있는 *Agrobacterium*의 발견으로 인해 새로운 형질을 갖는 식물체를 만들 수 있게 되었다. 이러한 형질전환기술은 생물이 갖는 기능을 이용하기 위하여 개발된 기술의 하나로서, 어떤 생물로부터 목적하는 유용한 유전자를 취하여 개량하고자 하는 식물에 도입하여 새로운 성질을 부여하는 획기적인 기술이다 (Park, 1998). 까마중에서는 *Agrobacterium rhizogenes*를 이용하여 모상근을 유도하여 형질전환 방법을 확립하였으며 (Ko *et al.*, 1991), 토양 내 수은 정화를 위한 까마중의 형질전환 및 수은 내성 특성에 관한 연구가 있다 (Kim *et al.*, 2008). 또한 organomercurial lyase 유전자를 도입한 환경정화용 형질전환 까마중을 선발해내는 연구가 수행되었다 (Choi *et al.*, 2008). 같은 가지과식물인 토마토는 그 연구사례가 더 많았는데, 살충제 저항성 형질전환 토마토 식물체의 육종에 관한 연구와 (Rhim, 1998) 과수 외래 유전자 조기 선발을 위해 마이크로 토마토 형질전환이 수행되기도 하였고 (Kim *et al.*, 2003), 형질전환된 토마토 켈러스의 superoxide dismutase와 peroxidase 활성을 연구하기도 하였다 (Yoo *et al.*, 1998).

따라서, 본 연구는 까마중의 잎과 줄기 절편의 신속한 재분화 조건을 이용하여 cytochrome P450 유전자라고 추측되는 *Arabidopsis* CYP78A6 유전자로 형질전환하고, 생산된 형질전환체의 약용적 가치 및 식물의 환경반응이나 병해, 제초제 저항성 및 유용물질의 생산에 관한 연구의 기초자료를 제공하고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 식물재료

본 실험에 사용된 까마중(*Solanum nigrum* L.)은 제주도 삼양지역에서 채취한 성숙한 열매로부터 종자를 분리하고 건조시킨 후 실온에 보관하며 실험에 사용하였다. 종자는 중성세제 2~3방울을 넣은 증류수에서 15분간 표면을 세척하고 70% ethanol로 1분간 처리 후 1% sodium hypochlorite 용액으로 15분간 처리하여 살균하였으며, 멸균수로 3회 세척하였다. 소독된 종자는 0.8% agar를 함유한 MS(Murashige and Skoog, 1962) 배지에 파종하여 무균 발아시켰다. 이어서 16hr light / 8hr dark의 일장 조건하에서 온도  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 광도 1,500 lux에서 4주간 무균배양하였으며 4주 동안 자란 어린 개체를 실험에 사용하였다 (Fig. 2).



Figure 2. Four week-old seedlings of *Solanum nigrum* L. grown *in vitro*

## 2. 재분화 및 토양 순화

### 2.1. 줄기·잎 절편을 이용한 기관 분화

4주간 무균배양한 유식물체의 줄기와 잎을 실험재료로 사용하여 기관분화에 미치는 NAA와 BAP의 영향을 조사하였다. 까마중의 줄기는 0.5~1.0 cm 정도의 크기로, 잎은 0.5 x 0.5 cm의 크기로 절단하여 NAA (0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mg/l) 와 BAP (0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mg/l)가 단독 및 혼합처리 된 MS 배지에 각각 치상하였다. 무균상태로 16hr light / 8hr dark의 일장 조건하에서 온도 28±1℃, 광도 1,500 lux에서 4주간 배양하였으며, 3반복 수행하였다.

### 2.2. 신초 및 뿌리의 분화 유도

신초유도를 위해 줄기와 잎 절편을 1.0~6.0 mg/l의 BAP가 첨가된 MS 배지에 치상을 하였고 16hr light / 8hr dark의 일장 조건하에서 온도 28±1℃, 광도 1,500 lux에서 4주간 배양하여 멀티슈트를 유도하였다. 뿌리유도를 위해 형성된 멀티슈트는 3~4cm 정도의 동일한 길이로 절단한 후 NAA (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg/l) 또는 IBA (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg/l)가 단독처리된 MS 배지에 치상하였다. 그리고 무균상태로 16hr light / 8hr dark의 일장 조건하에서 온도 28±1℃, 광도 1,500 lux에서 4주간 배양하였으며 3반복 수행하였다. 그리고 4주 후에 각 처리구별로 부정근 형성율, 발근 수 및 뿌리의 길이 등을 측정하였다.

### 2.3. 캘러스 유도를 통한 식물체 재분화

까마중의 줄기와 잎 절편을 0.5 mg/l NAA가 첨가된 MS 배지에 치상하여 다수의 유백색 캘러스를 얻어내었다. 발생한 캘러스는 2.0 mg/l BAP가 첨가된 MS 배지에서 8주간 배양하여 다수의 신초를 유도해 내었으며, 유도된 신초는 다시 0.1 mg/l IBA가 첨가된 MS 배지에서 약 4주간 배양하여 발근을 유도하였으며 3반복 수행하여 유사성을 관찰하였다.

### 2.4. 토양순화

발근유도 배지에서 뿌리 발달이 활발히 이루어진 식물체는 기내에서 꺼내어

수돗물로 뿌리에 묻은 배지를 깨끗하게 씻어낸 후 원예용 상토가 들어있는 포트에 한 개체씩 옮겨 심었다. 그리고 기내배양과 비슷한 습도를 맞추기 위하여 랩을 씌워주어 습도를 유지시켜 주고, 2~3일 후에 랩을 조금씩 벗겨준 후 5일 이후에 랩을 완전히 제거한 상태에서 관리하였다.

### 3. 형질전환

#### 3.1. Kanamycin 적정 농도 결정

까마중의 형질전환에 앞서 형질전환체를 선별하기 위한 kanamycin의 적정 농도를 규명하기 위하여 MS 배지에 kanamycin을 0, 50, 100, 200, 300 mg/l의 농도로 처리하여 실시하였다. 잘라낸 잎 절편을 4주간 배양하여 각 처리구에서 잎 절편의 괴사정도를 관찰하고 3반복 실험을 통해 유사성을 파악한 후 형질전환에 사용할 kanamycin의 적정 농도를 결정하였다.

#### 3.2. Vector 와 *Agrobacterium* strain

애기장대 유래의 CYP78A6 유전자를 식물체내에서 과발현을 유도하는 CaMV 35S promoter와 kanamycin 저항성유전자를 가지고 있으면서 형질전환체의 선별을 위한 마커인 neomycin phosphotransferase (NPTII) 유전자와 함께 pCAMBI A1300 벡터안에 subcloning 하였고, *Agrobacterium tumefaciens* GV3101에 도입하여 형질전환에 이용하였다.

*Agrobacterium*의 배양은 20 µg/ml gentamycin과 50 µg/ml spectinomycin이 첨가된 Luria-Broth (1% bacto yeast extract, 1% NaCl, 0.5% trypton) 액체배지에 접종한 후, 2일간 28°C 암조건에서 200 rpm으로 배양하였다. 배양된 *A. tumefaciens*는 10,000 rpm으로 10분간 원심분리 후 침전물을 항생제가 없는 액체 LB 배지로 세척하여 재차 원심분리하고 침전물을 액체 LB배지로 현탁시켜 식물체 접종에 사용하였다.

#### 3.3. *Agrobacterium* 매개에 의한 형질전환

*Agrobacterium* 현탁액이 들어있는 튜브에 까마중 잎 절편을 침지하여 10분간

접종시킨 후 잎 절편을 멸균된 여과지에서 물기를 제거하고 MS 기본배지에 치상하여 28°C 암 조건에서 2일간 공동배양 하였다. 공동배양한 후에 멸균수 20 ml 에 100 mg/l carbenicillin 20  $\mu$ l를 첨가하고 공동배양한 잎 절편을 넣고 표면에 묻어있는 *A. tumefaciens*를 깨끗이 제거한 후 멸균된 여과지에서 물기를 제거한 후에 멸균수에서 30분간 다시 세척하였다.

#### 3.4. 형질전환체의 선발 및 재분화

*Agrobacterium*을 제거하고 여분의 물기를 제거한 뒤 100 mg/l kanamycin과 100 mg/l carbenicillin이 처리된 BAP 선발배지에 치상하였다. 치상 후 주기적으로 선발배지를 교체해 주었고, 8~10주가 경과하여 슈트가 신장하기 시작하고 길이가 약 3cm 정도 될 때 뿌리 유도 배지로 옮겨 뿌리를 신장시켜 원예용 상토로 채워진 포트에 이식하여 순화시켰다.

### 4. 형질전환체의 확인

목적유전자가 식물체의 genome 내로 삽입되었는지의 유무를 확인하기 위하여 NPTII 유전자와 AtCYP78A6 유전자를 PCR (Polymerase chain reaction)을 이용하여 증폭하였다.

#### 4.1. DNA 분리

Genomic DNA의 분리는 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)를 이용하였다. 형질전환된 까마중의 건강한 잎을 채취하여 막자사발에서 액체질소를 가하여 분말로 곱게 마쇄하였다. 마쇄된 분말을 Eppendorf tube에 담고 nucleic lysis solution을 600  $\mu$ l를 첨가하여 1~3초간 vortex하였다. 65°C에서 15분간 정치하고 RNase solution 3  $\mu$ l를 첨가한 후, 37°C에서 15분간 정치하고 실온에서 5분간 식혀주었다. Protein precipitation solution 200  $\mu$ l를 첨가한 후 20초간 vortex를 시켜 13,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 얻은 상층액에 isopropanol 600  $\mu$ l을 첨가하여 inverting한 후, 다시 13,000 rpm으로 1분간 원심분리를 하였다. 침전물에 70% 에탄올 600  $\mu$ l을 첨가하여 씻어낸 후 13,000 rpm으로 1분간 원심

분리하여 침전물 이외의 남은 용액을 제거하여 주었다. 남은 침전물에 DNA rehydration solution 100  $\mu$ l를 첨가하여 침전물을 녹인 후 65°C에서 1시간 정치한 후 4°C 냉장고에서 하루 보관하여 사용하였다.

#### 4.2. PCR을 이용한 DNA 증폭

PCR 분석은 0.5  $\mu$ l Eppendorf tube에 dNTP 1.6  $\mu$ l, Taq polymerase 0.2  $\mu$ l, 10x buffer 2  $\mu$ l, primer 10pM, DNA 10 ng을 넣고 멸균수를 이용하여 최종 volume을 20  $\mu$ l로 맞춰주고 잘 섞은 후, spin down 하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation한 후, 94°C에서 30초간 denaturation하고 55°C에서 30초간 annealing한 후, 72°C에서 2분간 extension을 하였고, 이 과정을 35회 반복하고 72°C에서 7분간 post extension하여 PCR이 끝난 tube는 4°C에서 보관하였다. NPT-II forward primer는 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3'을, reverse primer는 5'-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3'을 사용하였으며, AtCYP78A6 forward primer는 5'-ATGAATCTGACTTGGCTTCCTTCC-3'을, reverse primer는 5'-CACTCTCCTCTCAGACTCACAAGTT-3'을 사용하였다.

#### 4.3. Agarose gel 전기영동

0.5x TBE buffer를 제조하여 전기영동 탱크에 넣고 1%의 agarose gel을 넣었다. PCR 과정을 거친 DNA 10 $\mu$ l와 10x loading dye를 혼합하여 agarose gel의 well에 loading 하였다. 분자량 확인을 위해 1kb의 molecular marker를 한쪽 well에 loading 하였다. 전기영동은 50V의 전류하에서 0.5~1시간 동안 수행하였으며, 전기영동이 끝나면 gel을 ethidium bromide (EtBr)이 들어있는 용액에 10분간 담궈 DNA를 염색하고 증류수로 10분간 씻어 UV lamp로 밴드를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

형질전환 개체를 얻기 위해서는 유전자 삽입에 앞서 까마중의 줄기조직 또는 잎 절편으로부터 캘러스를 거쳐서 또는 절편으로부터 직접 재분화 개체를 얻을 수 있는 조건이 확립되어야 한다. 따라서 본 실험에 앞서 까마중의 줄기와 잎 절편을 사용하여 재분화를 위한 기관분화 조건을 확립하는 연구를 수행하였다.

### 1. 재분화를 위한 기관분화 조건 확립

#### 1.1. 기관분화에 미치는 NAA와 BAP의 효과

먼저 소독처리된 까마중 종자를 MS 배지에서 4주간 발아시켜 얻은 유식물로부터 줄기를 0.5~1cm 정도로 자른 후 옥신류인 NAA와 시토키닌류인 BAP가 단독 및 혼합 처리된 MS 배지에서 배양하였다.

그 결과, 캘러스는 BAP가 단독 처리된 조건에서는 발생하지 않았고, NAA 첨가에 따라 발생한 것으로 보아 NAA에 의해 영향을 받는 것으로 보여졌다 (Fig. 3). 특히 0.5 mg/l NAA가 첨가된 MS 배지에서 유백색의 부서지기 쉬운 형태의 캘러스가 형성되었다. 다른 조건에서는 단단한 캘러스들이 유도되었으며, 색은 전체적으로는 유백색을 띄지만 BAP가 혼합된 처리구에서는 부분적으로 녹색을 띄는 경우도 관찰할 수가 있었다.

뿌리 또한 BAP 단독처리구에서는 발생되지 않고, NAA 단독처리구와 BAP 혼합 처리구에서 활발하지는 않지만 분화가 일어나는 것으로 보아 NAA에 영향을 받는 것으로 보여지며, 0~5.0 mg/l NAA가 첨가된 MS 배지에서 부분적으로 발생한 것을 관찰할 수가 있었다.

반면에 신초는 호르몬이 첨가되지 않은 대조구에서는 발생하지 않았고 NAA와 BAP가 혼합처리된 배지에서보다 BAP 단독 처리구에서 더 활발하게 일어났으며, BAP 0.1 mg/l의 낮은 농도에서부터 5.0 mg/l의 고농도에서까지 유도되는 것을 확인할 수가 있었다. 신초유도의 최적의 조건을 확립하기 위하여 BAP를 처리한 배지에서 추가로 실험을 수행한 결과 2.0 mg/l BAP가 처리된 조건에서의



신초 분화율이 가장 높게 나타난 것을 확인할 수가 있었다 (데이터 미제시).

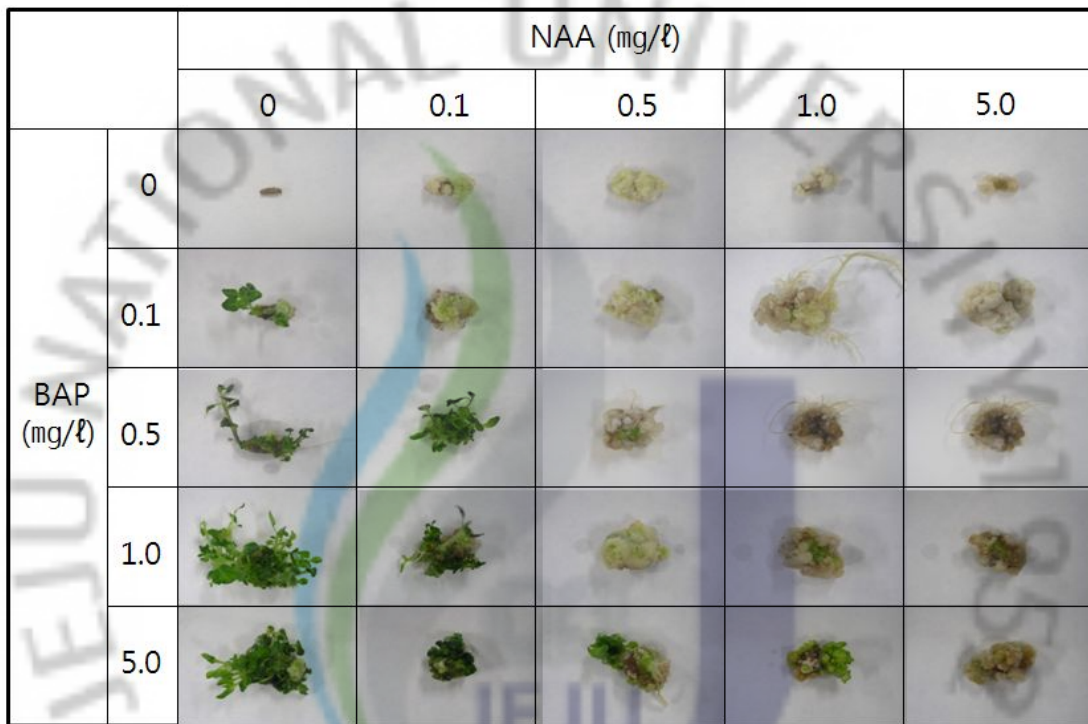


Figure 3. The culture of stem segments of *Solanum nigrum* L. for 4 weeks on the MS media with combination of NAA (0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mg/ℓ) and BAP (0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mg/ℓ).

Fig 3.에서 줄기를 이용한 기관분화 조건을 관찰하였지만 같은 종이라 하더라도 줄기와 잎 절편의 분화 정도의 차이가 있을 수 있으므로 더 효율적인 재분화 방법을 선택하기 위하여 까마중 유식물체의 잎 절편을 0.5 x 0.5 cm 정도로 잘라 NAA와 BAP가 단독 및 혼합 처리된 MS배지에서 배양하였다.

그 결과, 전체적인 분화 양상은 Fig. 3의 결과와 유사하여 켈러스와 뿌리의 유도는 NAA에 영향을 받는 것으로 나타났으며 신초유도는 BAP에 의해 영향을 받는 것으로 나타났다 (Fig. 4). 켈러스도 0.5 mg/ℓ NAA가 첨가된 배지에서 유백색의 부서지기 쉬운 형태로 형성되었다. 그러나 실험에 적합한 켈러스 유도속도는 잎 절편보다 줄기가 효율이 더 높았으며, 다른 조건에서 생성되는 켈러스도 같은 조건에서 줄기를 이용하여 형성된 켈러스보다 단단하며 녹색을 좀 더 많이 띠는 경향을 보였다. 뿌리는 마찬가지로 NAA 0~1.0 mg/ℓ의 농도에서 부분적 영향을 받는 것으로는 보였으며 특히 0.1 mg/ℓ NAA가 첨가된 배지에서 분화가 활발하게 나타났다. 신초는 줄기와 마찬가지로 0.1 mg/ℓ BAP가 첨가된 처리구에서부터 유도가 되었다. 또한 BAP를 처리한 배지에서 추가로 실험을 수행한 결과 2.0 mg/ℓ BAP가 첨가된 처리구에서 신초 분화율이 가장 높게 나타났다.

이러한 결과로 보아 줄기와 잎 절편을 이용하였을 때에는 분화속도와 정도는 차이가 있었지만, 대체적으로 켈러스와 신초유도는 각각 0.5 mg/ℓ NAA와 2.0 mg/ℓ BAP가 첨가된 배지에서가 최적의 것으로 보인다. 이는 같은 가지과에 속하는 토마토에서는 낮은 농도의 옥신류나 사이토키닌류의 단독처리에서도 켈러스 유기가 가능하다는 보고와 유사하였으며 (Lim, 1994), 또한 cytokinin 계통인 TDZ의 농도가 높고 auxin 계통인 NAA의 농도가 낮아짐에 따라 shoot의 분화는 증가하였다는 경우와도 유사한 결과를 나타내는 것을 확인할 수가 있었다 (Yu, 1993). 이것으로 보아 본 실험에서는 옥신류에서는 NAA, 시토키닌류에서는 BAP를 택하여 25개의 조건으로 기본적인 분화정도를 관찰하였지만, 경우에 따라서는 다른 호르몬을 이용하여 효율적인 기관분화 조건을 확립하는 연구도 추가적으로 수행이 되어야 할 것으로 보인다.

|            |     | NAA (mg/ℓ) |     |     |     |     |
|------------|-----|------------|-----|-----|-----|-----|
|            |     | 0          | 0.1 | 0.5 | 1.0 | 5.0 |
| BAP (mg/ℓ) | 0   |            |     |     |     |     |
|            | 0.1 |            |     |     |     |     |
|            | 0.5 |            |     |     |     |     |
|            | 1.0 |            |     |     |     |     |
|            | 5.0 |            |     |     |     |     |

Figure 4. The culture of leaf segments of *Solanum nigrum* L. for 4 weeks on the MS media with combination of NAA (0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mg/ℓ ) and BAP (0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mg/ℓ ).

## 1.2. 효과적인 뿌리유도 조건 확립

Fig. 3과 4에서 뿌리의 형성은 전체적으로 NAA에 영향을 받지만 호르몬 농도에 비례적이거나 관계적이지 않고 유도가 산발적으로 나타나며 발달정도도 크게 차이를 보였다. 때문에 앞에서 신초유도에 탁월했던 잎 절편을 이용하여 2.0 mg/ℓ BAP가 첨가된 배지에서 다수의 신초를 얻어 동일한 길이와 상태의 개체만을 이용하여 추가실험을 수행하였다. 유사한 상태의 개체들은 IBA (0~5.0 mg/ℓ)와 NAA (0~5.0 mg/ℓ)를 단독으로 처리한 MS 배지에 삼목을 하여 뿌리 분화 정도를 파악하였다 (Fig. 5, Table 1).

그 결과, 저농도인 0.05~0.1 mg/ℓ NAA가 첨가된 배지에서는 다수의 짧은 형태의 곁뿌리가 유도되어 뿌리의 수는 Table 1에서 보듯이 IBA를 같은 농도로 처리한 조건에 비해 높게 나타났다. 그러나 주근 형태가 아닌 짧은 형태를 가지고 있었기 때문에 식물의 생장에 적합하지 않은 것으로 보였다. 그리고 0.5 mg/ℓ 이상의 NAA가 첨가된 처리구에서는 Fig. 3과 4에서 관찰된 것처럼 뿌리가 발생하지 않고 유백색의 켈러스 형태를 이루어 앞선 실험에서와 같은 결과를 관찰할 수가 있었다.

반면 IBA가 첨가된 배지에서는 0.05 mg/ℓ IBA가 첨가된 처리구에서부터 2.0 mg/ℓ IBA가 처리된 고농도의 조건에서도 뿌리가 발달했다. 0.05~0.1 mg/ℓ IBA가 처리된 조건에서는 NAA를 첨가한 배지에서처럼 다수의 뿌리가 발생하지는 않았지만 Table 1에서 보듯이 2~3개의 주근이 발달하고 곁뿌리의 발달이 활발하게 분화되어 이상적인 형태의 뿌리형태를 나타내었다. 그리고 Table 1에서 보면 0.5~1.0 mg/ℓ IBA가 처리된 조건에서가 뿌리의 수는 가장 많지만 0.05~0.1 mg/ℓ IBA가 처리된 조건에서의 뿌리에 비해 길이가 짧은 형태로 나타났다. 특히 0.1 mg/ℓ IBA가 첨가된 배지에서가 가장 빠르고 뿌리의 유도도 가장 활발하게 나타나는 것을 관찰할 수가 있었다.

그리고 NAA와 IBA 모두 옥신류의 호르몬이지만 NAA에 비해 IBA가 첨가된 배지에서의 발근속도가 더 빠르게 나타났으며, 유도된 뿌리는 식물체가 성장하기에 더 적합한 형태로 발달하는 것으로 나타나 까마중의 발근유도는 IBA 호르몬을 이용하는 것이 더 높은 효율을 나타냈다. 또한 Table 1에서 식물체의 길이는 NAA를 처리한 조건보다 IBA를 처리한 조건에서 더 높게 나타났으며 특히 발근

에 가장 효과적이었던 0.1 mg/l IBA를 처리한 조건에서가 길이의 생장도 가장 높게 나타나는 것을 관찰할 수가 있었다.

그러나 Fig. 5와 Table 1에서 볼 수 있듯이 호르몬이 첨가되지 않은 대조구에서도 활발하지는 않지만 곁뿌리 형태가 아닌 주근 형태의 긴 뿌리가 유도되는 것을 관찰할 수가 있었다. 이는 감자를 이용한 연구에서 호르몬이 처리된 배지에서 발근이 되지 않았던 개체들도 호르몬을 첨가하지 않은 배지에 옮기면 대부분 발근이 유도되는 결과와 유사한 것을 나타내었다 (Lee, 2003).
















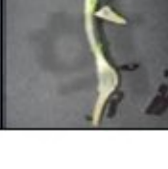
|      | IBA<br>(mg/l)   | NAA<br>(mg/l)  |
|------|---|--|
| 0    |    |    |
| 0.05 |    |    |
| 0.1  |    |    |
| 0.5  |   |   |
| 1.0  |  |  |
| 2.0  |  |  |
| 5.0  |  |  |

Figure 5. Root formation from adventitious shoot cultured for 4 weeks on MS medium with IBA (0 mg/l ~5.0 mg/l) or NAA (0 mg/l ~5.0 mg/l).

Table 1. Growth of roots from adventitious shoot on MS medium with IBA (0~5.0 mg / l ) and NAA (0~5.0mg / l ) after 4 weeks of culture.

| Hormone(mg/ml) |      | Rooting rate(%) | No. of root/plantlet | Root lenght(mm) | Plant length (mm) |
|----------------|------|-----------------|----------------------|-----------------|-------------------|
| Control        | 0    | 83              | 1±1                  | 40±18           | 54±10             |
|                | 0.05 | 100             | 3±2                  | 9±8             | 32±4              |
| NAA            | 0.1  | 100             | 4±2                  | 18±13           | 34±7              |
|                | 0.5  | 0               | 0                    | 0               | 36±10             |
|                | 1    | 0               | 0                    | 0               | 29±3              |
|                | 2    | 0               | 0                    | 0               | 27±5              |
|                | 5    | 0               | 0                    | 0               | 26±4              |
|                | 0.05 | 67              | 1±1                  | 20±18           | 65±5              |
|                | 0.1  | 100             | 3±2                  | 29±6            | 70±11             |
| IBA            | 0.5  | 100             | 6±3                  | 12±2            | 56±16             |
|                | 1    | 100             | 6±3                  | 4±2             | 45±18             |
|                | 2    | 33              | 3±4                  | 1±1             | 21±18             |
|                | 5    | 0               | 0                    | 0               | 18±17             |

## 2. 캘러스 유도를 통한 식물체 재분화

최근에 조직배양 기술이 식물의 영양체 번식, 각종 내성 식물체 선발, 유전자 이식을 하는데 널리 이용되고 있다. 그러나 조직배양기술이 실제로 이용되는데 중요한 점은 캘러스 상태에서부터 완전한 식물체를 분화시키는 체계가 선행되어야 한다는 것이다.

가지과 식물인 감자의 형질전환에서도 캘러스를 유도하여 형질전환을 수행하였다 (Lee *et al.*, 2003). 이에 따라 까마중 유식물체의 줄기와 잎 절편을 0.5 mg/ℓ NAA가 첨가된 배지에서 배양하여 유백색의 캘러스를 얻었다 (Fig. 6B, Fig. 7B). 그리고 유도된 캘러스를 2.0 mg/ℓ BAP가 첨가된 배지에서 배양하여 신초를 얻었다 (Fig. 6D, Fig. 7D). 이 때 캘러스의 유도는 Fig. 3과 4에서 보는 바와 같이 잎과 줄기 모두 0.5 mg/ℓ NAA가 첨가된 배지에서 캘러스 유도가 일어나지만 유도 속도는 줄기가 보다 효과적이었다. 그리고 잎과 줄기에서 유도된 캘러스를 2.0 mg/ℓ BAP가 첨가된 배지에서 배양하여 신초를 유도할 때는 유백색의 캘러스가 완전히 갈변되어 겉으로 보았을 때는 피사가 된 것으로 보였다 (Fig. 6C, Fig. 7C). 이는 줄기와 잎 절편을 이용하여 2.0 mg/ℓ BAP가 첨가된 처리구에서 직접신초를 유도하였을 때는 관찰되지 않았던 것으로 미분화된 세포덩어리인 캘러스가 고농도의 호르몬 처리 배지에서 생장저해물질인 2차 대사 산물을 발생시켰기 때문인 것으로 보인다 (Kwon *et al.*, 1995). 때문에 생장저해물질에 의해 생장에 저해가 되어 잎과 줄기를 이용하여 직접 신초를 유도한 것에 비해 약 2배의 시간이 더 소요가 되어 약 8주 정도가 지나 갈변화 되었던 캘러스가 서서히 부분적으로 녹색을 띠기 시작하며 신초가 유도가 되기 시작했다 (Fig. 6D, Fig. 7D). 그 결과 캘러스를 거치지 않고 직접 신초를 유도한 경우에는 잎은 가장자리로부터 연한 녹색의 작은 캘러스가 형성되면서 신초가 발생하고 줄기는 양 끝부분으로부터 신초가 유도가 된 것과 비교하였을 때 캘러스에서 신초를 유도하는 것은 큰 차이를 보였다. 유도된 신초는 절단하여 0.1 mg/ℓ IBA 가 첨가된 MS배지에서 발근을 하고 4주 정도 배양을 하여 뿌리의 발달이 활발히 일어나면 (Fig. 6E, Fig. 7E) 기내에서 꺼내어 원예상토가 들어있는 포트에서 순화작업을 거쳐 재분화된 개체를 얻을 수가 있었다 (데이터미제시).



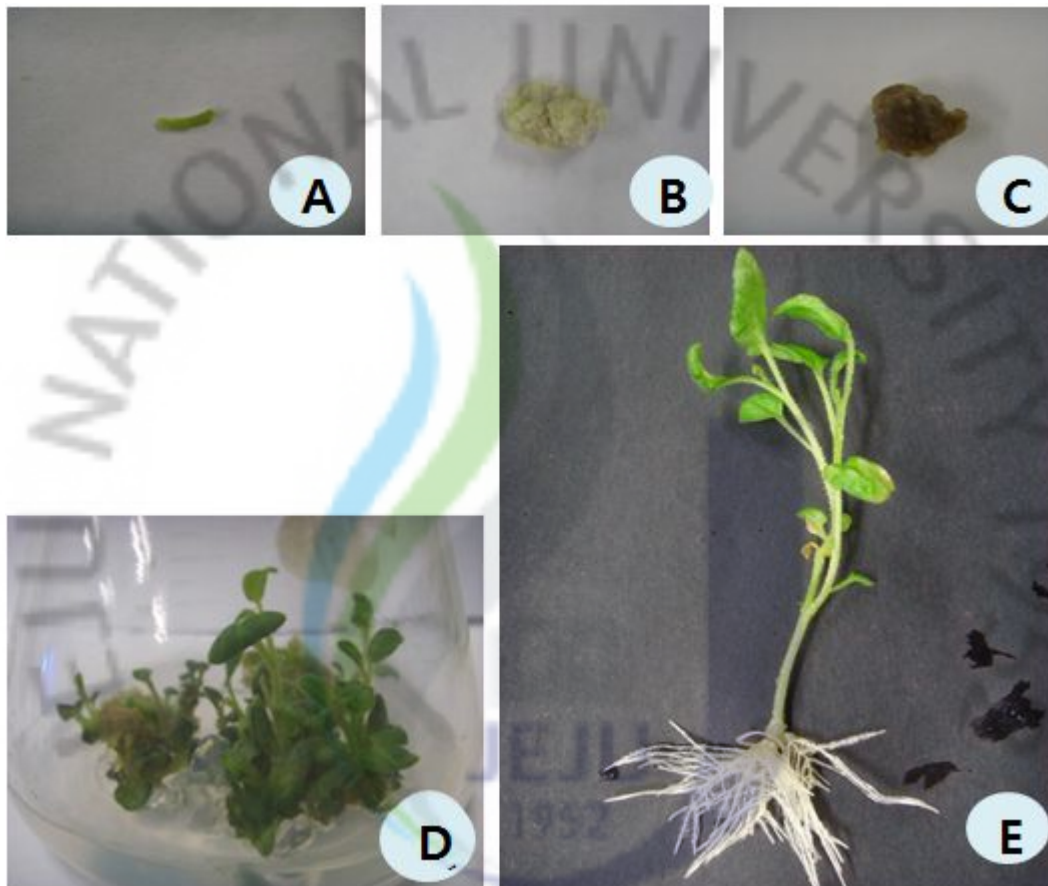


Figure 6. Plant regeneration from callus induced from stem segments of *Solanum nigrum* L. A, Callus induced on MS medium with 0.5 mg/l NAA; B-D, Multifid shoots formed on MS medium with 2.0 mg/l BAP; E, Root formed on MS medium with 0.1 mg/l IBA.



Figure 7. Plant regeneration from callus induced from leaf segments of *Solanum nigrum* L. A, Callus induced on MS medium with 0.5 mg/l NAA; B-D, Multifid shoots formed on MS medium with 2.0 mg/l BAP; E, Root formed on MS medium with 0.1 mg/l IBA.

### 3. 형질전환 양상

까마중의 형질전환은 cytochrome P450 유전자라고 추측되는 *Arabidopsis* CY P78A6 유전자가 삽입된 *Agrobacterium*을 잎 절편에 접종하여 수행하였다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 캘러스 유도는 줄기가 잎 절편보다 더 효율적이었으나 줄기를 *Agrobacterium*으로 접종을 하였을 때는 괴사로 인해 생장이 불가능했고 (데이터 미제시), 또한 캘러스를 거쳐서 신초를 유도할 때에는 시간이 많이 소요가 되었다. 반면에 잎 절편에서 직접 신초를 유도하는 방법은 4주 정도의 시간이 소요가 되고 신초의 형성도 가장 효율적이었기 때문에 형질전환을 위한 방법에는 잎 절편을 이용하였다.

#### 3.1. 항생제 적정 농도 규명

*A. tumefaciens* GV3101에 함유되어 있는 vector에는 kanamycin 저항성 유전자가 삽입되어 있기 때문에 *A. tumefaciens* GV3101을 접종을 한 후 항생제가 첨가된 배지에서 배양하였을 때 저항성을 나타내어 성장하여 선발된 개체들은 일단 vector에 있는 유전자에 의해 형질전환이 된 것으로 간주할 수가 있다 (Son *et al.*, 2005). 그래서 *Agrobacterium* 접종에 앞서 kanamycin을 각각 0, 50, 100, 200, 300 mg/l 으로 첨가한 MS배지에 잎 절편을 배양하였다 (Fig. 8).

항생제를 첨가하지 않은 대조구에서는 잎 절편이 괴사하지 않고 잎 절편 가장자리 부분으로 약간의 캘러스들이 형성되는 것을 관찰 할 수가 있었다 (Fig. 8A). 그러나 kanamycin을 처리하였을 때에는 50 mg/l 의 수준에서부터 잎 절편의 색이 연해지기 시작하고 부분적으로 완전히 하얗게 변했으며 (Fig. 8B), 100 mg/l 의 농도에서는 50 mg/l 정도와 비슷하게 색이 연해지며 하얗게 고사해버리는 경우가 크게 증가했다 (Fig. 8C). 또한 100 mg/l 의 이상의 농도에서는 거의 모든 잎 절편에서 괴사가 일어나고, 농도가 높아질수록 고사가 심하게 나타났다 (Fig. 8C-E). 따라서 형질전환체 선발을 위한 kanamycin의 적정 농도는 100 mg/l 으로 판단되었다. 이는 같은과 식물인 토마토의 형질전환에서도 100 mg/l kanamycin을 적정 농도로 이용하였고 (Cho, 2003), 고추도 100 mg/l 을 이용한 것으로 나타나 (Yang, 1997), 가지과 식물에 속하는 식물종들은 kanamycin 100

mg/l 가 형질전환체 선발농도로 적당한 것으로 보인다.

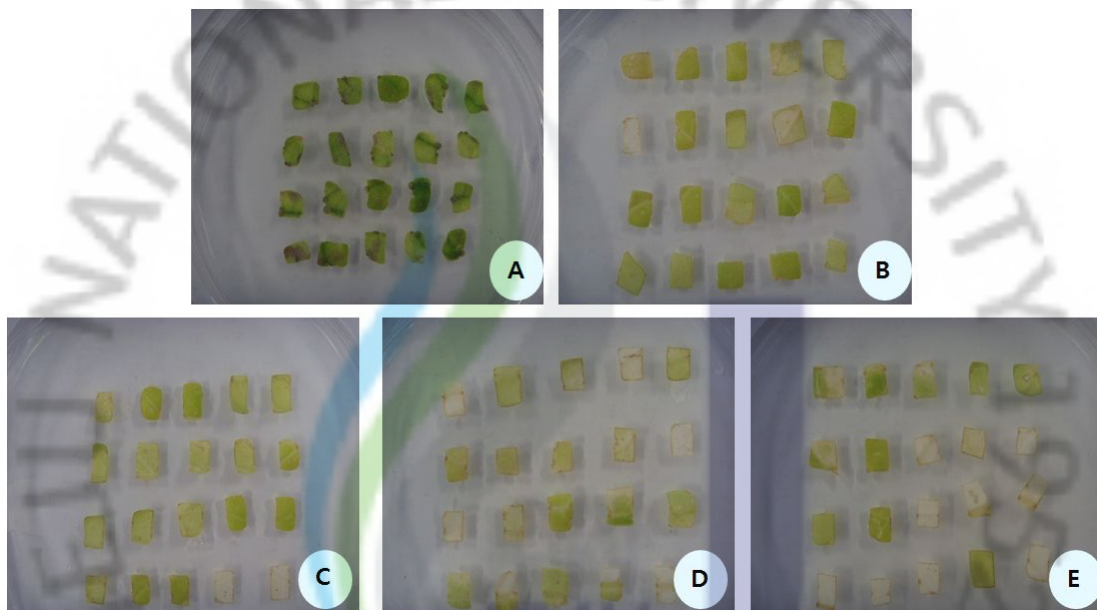


Figure 8. Response of leaf segments of *Solanum nigrum* L. after 4 weeks exposed to kanamycin supplemented in MS medium. A, 0 mg/l kanamycin; B, 50 mg/l kanamycin; C, 100 mg/l kanamycin; D, 200 mg/l kanamycin; E, 300 mg/l kanamycin.

### 3.2. 신초 재분화

*A. tumefaciens*와 공동배양 후 계단배양을 거친 잎 절편을 2.0 mg/ℓ BAP, 100 mg/ℓ kanamycin와 100 mg/ℓ carbenicillin이 첨가된 MS 선발배지에서 배양하였다 (Fig. 9).

*Agrobacterium*을 처리하지 않은 대조군에서는 배양 1 주일 정도 후부터 잎 절편 가장자리에 작은 녹색 켈러스가 발생되면서 신초가 유도되어 Fig. 9B와 같이 4주 정도 후에는 모든 잎 절편에서 신초가 유도되었다.

반면에 *Arabidopsis* CYP78A6 유전자가 삽입된 *Agrobacterium* 현탁액을 이용하여 형질전환된 잎 절편은 4주가 경과하여도 신초유도가 이루어지지 않고 몇 개의 절편은 완전히 갈변되거나 잎 표면색이 연해지는 것을 관찰할 수가 있었다 (Fig. 9B'). 그리고 신초유도에 약 8주 정도가 걸렸으며, 대조군은 100 %의 신초 재분화율을 보였지만 *Agrobacterium*을 접종하였을 때에는 표면에 오염이 생기거나 잎 표면색이 연해지면서 괴사되었는데, 이는 항생제 저항성유전자인 NPTII gene이 삽입이 되지 않아 100 mg/ℓ kanamycin이 첨가된 선발배지에서 저항성을 나타내지 않고 괴사한 것으로 보인다. 또한 이렇게 괴사된 절편은 비형질전환체로 분류가 되었다. 그리고 정상적으로 신초가 유도되는 경우는 NPTII gene의 삽입으로 인해 항생제가 첨가된 선발배지에서 항생제 내성을 보이는 것으로 보여졌다. 그러나 이 경우에도 잎의 절편의 색은 연해지면서 잎의 가장자리에 켈러스 형태로 덩어리가 형성되었다. 그리고 형성된 덩어리는 대조군에 비해 훨씬 단단하고 크기가 큰 켈러스로 분화가 되었다. *Agrobacterium tumefaciens*가 함유하고 있는 tumor inducing plasmid (Ti Plasmid) 때문에 식물에 형성되는 crown gall에는 Ti plasmid가 존재하여 이 Ti plasmid 일부가 식물세포의 핵 genome에 삽입되어 형질변화가 일어나는데 (Joo, 1987), 본 실험에서도 켈러스가 Ti-plasmid의 영향을 받아 단단한 혹 형태의 덩어리로 분화가 된 것으로 사료된다. 그리고 켈러스의 형태는 녹색으로 굉장히 단단했으며 약 8주 후에 표면에서 다수의 신초가 유도가 되었다 (Fig. 9C').

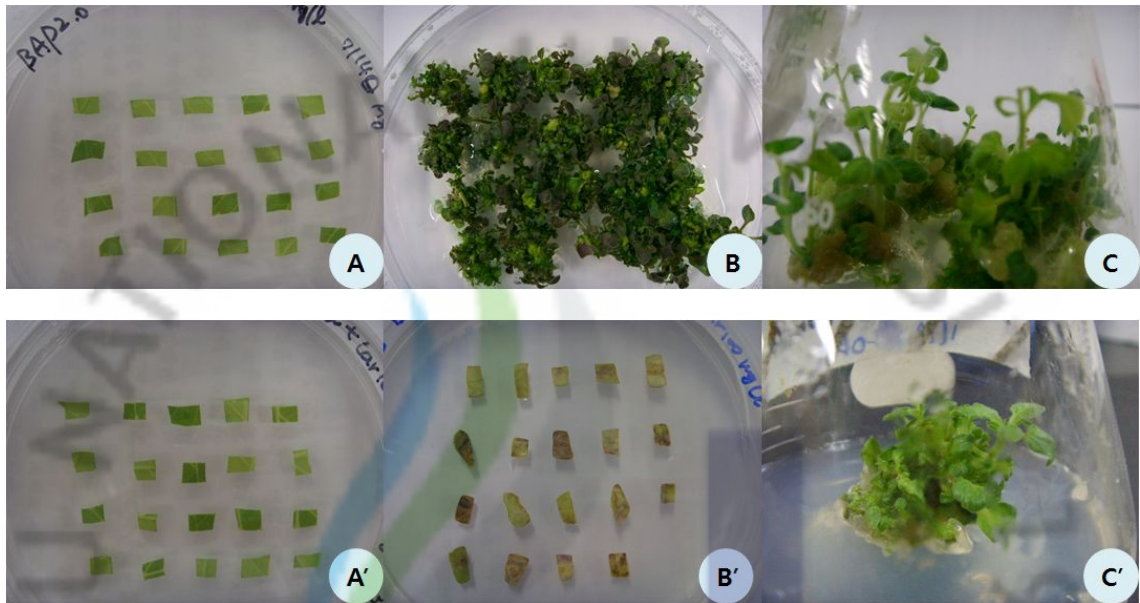


Figure 9. Genetic transformation of *Solanum nigrum* L. with *Arabidopsis* CYP78A6 gene. A-C, Shoot development from leaf segments on MS medium including 2.0 mg/l BAP without kanamycin and carbenicillin; A'-C', Shoot development from co-cultured leaf segments on MS medium including 2.0 mg/l BAP with 100 mg/l kanamycin and 100 mg/l carbenicillin.

### 3.3. 발근 및 순화

Fig. 9C'에서 보는 바와 같이 유도된 신초를 잘라내어 0.1 mg/ℓ IBA, 100 mg/ℓ kanamycin과 100 mg/ℓ carbenicillin이 첨가된 발근 유도배지에 이식을 하였다. 그러나 잘라낸 신초에서 삽입되지 않은 *Agrobacterium*에 의해 오염이 발생했다. 때문에 멸균수로 세균을 하여 다시 선발배지에 배양을 하였지만 식물체 표면에 오염이 계속 발생해 유도된 신초도 피사의 우려가 나타났다. 그러나 까마중은 기내에서 유도된 신초를 잘라내어 발근과정을 거치지 않고 직접 포트에 꺾꽂이를 하여 순화작업을 거쳐도 활발한 성장을 하는 것으로 나타났기에 (데이터 미제시) 유도된 신초를 직접 원예용상토가 들어 있는 포트에 꺾꽂이를 하며 발근 유도 및 순화를 실시하였다.

그러나 순화작업을 하는 과정에서도 개체의 생장은 대조군에 비해 더디게 나타났다. 토양 순화 후 약 1달이 경과하면서 성장한 개체들은 “난쟁이형”과 “키다리형”의 2가지 표현형을 나타내었다 (Fig. 10). 이 중 “난쟁이형”은 일반 대조군이나 “키다리형” 형질전환개체에 비해 길이가 짧았으며 성장속도는 대조군과 “키다리형”과 비교하였을 때 가장 느리게 나타났지만 진한 녹색을 띄며 건실한 잎과 줄기 상태를 보였다. 반면에 “키다리형”은 “난쟁이형”에 비해 성장속도는 빨랐지만, 줄기와 잎자루가 대조군에 비해 비정상적으로 길게 신장하며 힘이 없이 늘어지는 경향이 있었다. 그리고 표현형이 대조군과 차이가 있어 형질전환체라고 추측되어지는 이들 “난쟁이형”과 “키다리형” 모두 잎색이 진한 녹색을 띄며 잎 가장자리가 안쪽으로 말리는 것을 관찰할 수가 있었다 (Fig. 11).

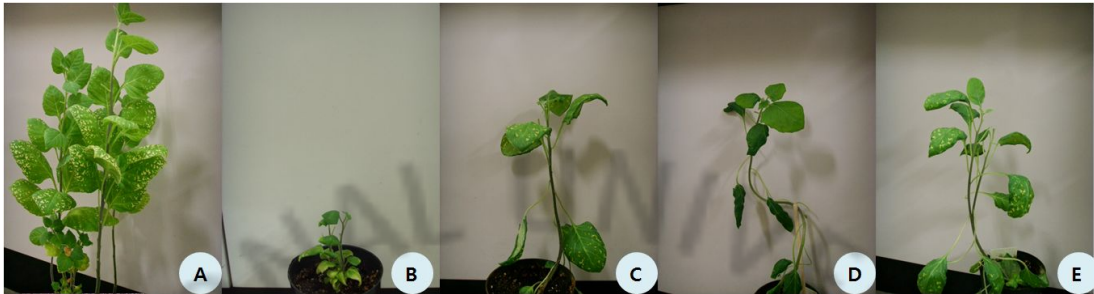


Figure 10. Morphological characteristics of *Solanum nigrum* L. transformed with *Arabidopsis* CYP78A6 gene. A, Plants regenerated from leaf segment without transformation procedures; B-E, Plants transformed with *Arabidopsis* CYP78A6 gene.

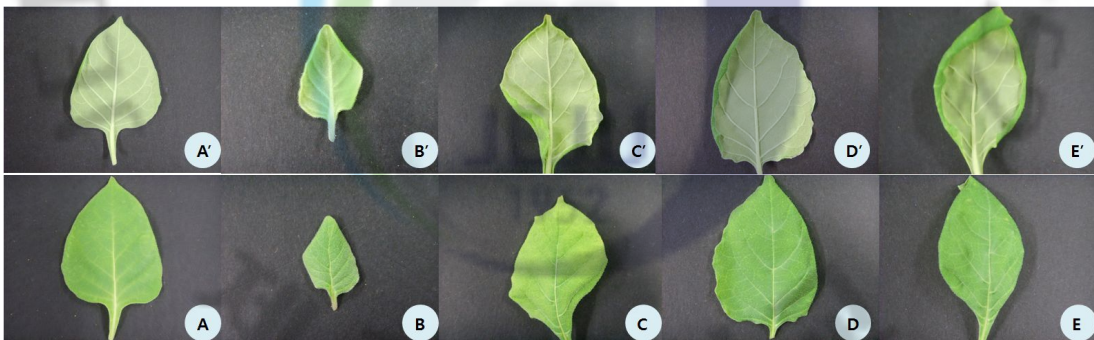


Figure 11. Leaf forms of *Solanum nigrum* L. transformed with *Arabidopsis* CYP78A6 gene. (A~E: Adaxial surface , A'~E':Abaxial surface of the leaf). A-A', Leaf of control plants; B-B', Leaf of transformed plants with dwarf-type; C-E~C'-E', Leaf of transformed plants with tall-type.



#### 4. 형질전환체의 확인

Fig. 9에서 보는 바와 같이 항생제가 첨가된 재분화 선발배지 (MS, sucrose 3%, 100 mg/ℓ kanamycin, 100 mg/ℓ carbenicillin, 2.0 mg/ℓ BAP )에서 정상적으로 신초가 유도되는 개체는 유전자가 도입된 형질전환체로 선발을 할 수 있었다. 그러나 형질전환 식물체에서 예측 가능하고 안정적인 외래유전자의 발현은 분자유종에서 중요한 이슈이지만 동일한 조건 및 형질전환 벡터를 이용하여도 생산된 형질전환체들 사이에는 도입 유전자의 발현 수준의 차이가 크게 나타나기 때문에 (Jung *et al.*, 2007) 유전자 도입 및 발현을 명확히 확인하기 위하여 PCR 분석을 수행하였다.

PCR을 위해 선발된 개체는 carbenicillin에 의해 *Agrobacterium*이 완전히 제거되지 않았을 수 있다는 점을 염두해 두고, 완전히 순화되어 생육이 진행 중인 유식물체의 상엽을 채취하여 DNA를 추출하여 증폭하고 분석을 하였다. 그 결과 700bp의 항생제 저항성 유전자인 NPTII 유전자는 “난쟁이형” 1개체와 “키다리형” 3개체 모두에서 밴드가 나타나, 정상적으로 삽입된 것을 확인할 수가 있었다 (Fig. 12A). 그러나 목적유전자인 627bp의 애기장대 유래의 CYP78A6 유전자는 “난쟁이형” 1개체와 “키다리형” 2개체에서만 확인이 되었다 (Fig. 12B). 이에 따라 Fig. 10B인 “난쟁이형”의 표현형을 보이는 형질전환 개체는 2가지의 유전자가 정상적으로 삽입이 되었으며 또한 정상적인 발현이 일어났기 때문에 *Arabidopsis* CYP78A6 gene의 특성에 따라 왜성화 되는 경향을 나타낸 것으로 보인다. 그러나 Fig. 10C-D의 “키다리형”의 2 개체는 NPTII gene과 CYP78A6 gene이 삽입은 되었지만 CYP78A6 gene이 삽입조차 되지 않은 Fig. 10E의 “키다리형” 개체와 같은 표현형을 나타내므로 CYP78A6 gene이 정상적으로 발현이 일어나지 않은 것으로 보였다. 그리고 “키다리형”의 표현형을 띄는 3개체는 길이가 비정상적으로 신장하며 줄기가 늘어지는 현상을 나타냈는데 이는 삽입이 된 NPTII 유전자의 발현 때문인 것으로 보여 졌고, 추가적으로 “난쟁이형”과 “키다리형” 모두 대조군과 다르게 잎의 가장자리가 안으로 말리고 잎색이 진한 녹색을 띄고 있는데 이는 삽입된 NPTII 유전자의 정상적인 발현에 의해 나타난 것으로 보였다.

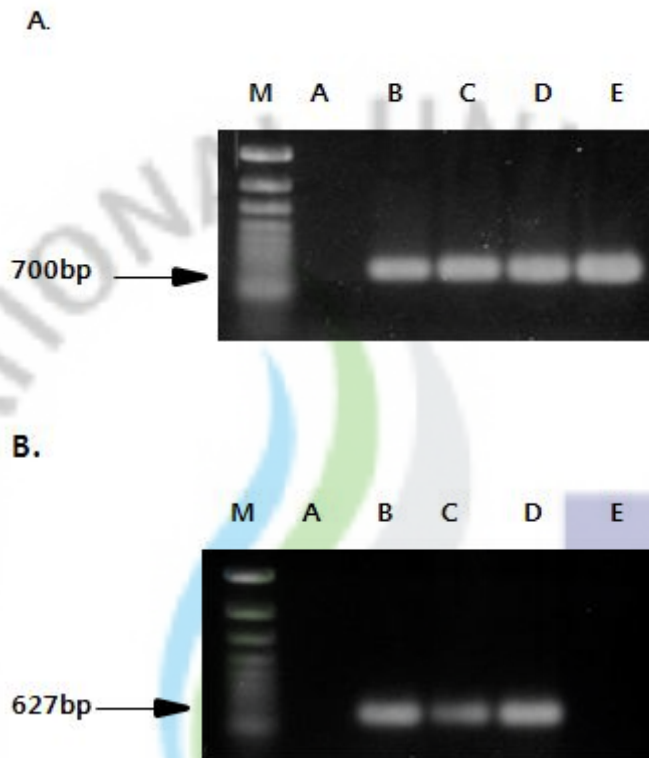


Figure 12. PCR analysis of NPTII gene (A) and *Arabidopsis* CYP78A6 gene (B) from transformed plants. M, molecular marker, 1kb ladder; A, Non-transformant (control); B, "the dwarf type" of transformants; C-E, "the tall type" of transformants.

## 요약

본 연구는 까마중(*Solanum nigrum* L.)을 cytochrome P450 유전자라고 추측되는 *Arabidopsis* CYP78A6 유전자로 형질전환하고, 생산된 형질전환체의 약용적 가치 및 환경이나 병해에 대한 반응, 제초제 저항성 및 유용물질의 생산 등에 관한 연구의 기초자료를 제공하고자 수행하였다.

까마중의 기관분화 조건은 잎과 줄기가 유사하여 캘러스는 0.5 mg/l NAA, 신초유도는 2.0 mg/l BAP, 발근은 0.1 mg/l IBA가 첨가된 MS 배지에서가 효율이 높았다. 그리고 이러한 조건을 통해서 줄기, 잎, 캘러스 각각을 이용하여 발근 개체를 얻을 수가 있었고 얻어진 발근개체들은 원예용상토가 들어있는 포트에서 순화시켜서 재분화 개체를 얻을 수가 있었다.

형질전환은 P450 유전자가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 균주를 잎 절편에 접종한 후, 2.0 mg/l BAP, 100 mg/l kanamycin, 100 mg/l carbenicillin이 처리된 MS 선발배지에서 신초분화를 유도하였다. 유도된 신초는 원예용상토가 들어있는 포트에서 순화시켰다. *Agrobacterium*을 접종하여 선발된 개체들은 “난쟁이형”과 “키다리형”의 2가지 표현형으로 나타났으며, 2가지 유형 모두 대조군에 비해 분화나 초기 성장이 2배 정도 느리게 나타났다.

유전자 삽입여부 확인을 위해 PCR 분석을 수행한 결과 NPTII 유전자는 모든 형질전환체에 삽입이 되었지만, *Arabidopsis* CYP78A6 유전자는 “키다리형” 1개체에는 삽입이 되지 않았다. 그러나 “키다리형” 개체들의 표현형이 서로 유사한 것으로 보아 *Arabidopsis* CYP78A6 유전자가 삽입된 2개의 “키다리형” 개체는 정상적인 발현은 이루어지지 않은 것으로 사료되고, “난쟁이형” 1개체는 *Arabidopsis* CYP78A6 유전자의 삽입과 발현이 모두 이루어진 것으로 사료되어진다.

앞으로 형질전환 개체를 좀 더 성장시킨 후에 RT-PCR 또는 RNA gel blotting 등의 방법을 통해 목적 유전자가 정상적으로 발현이 되고 있는지를 확인하고, 그 효용성에 대하여 연구를 수행하고자 한다.

## 참고문헌

- Ahn, H.M., H.J. Oh and K.J. Song. 2004. Regeneration and genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens* in *Brassica napus*. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 22 : 685-694.
- Bardley, V., D.J. Collins, P.G. Crabbe, F.W. Eastwood, M.C. Irvine, J.M. Swan and D.E. Symon. 1978. A study of Australian *Solanum* plants for potentially useful source of solasodine. *Aust. J. Bot.* 26 : 723-754.
- Cho, M.A., H.B. Jeong, N.J. Kang and Y.G. Shon. 2003. Transformation of tomato with  $\beta$ -1,3-glucanase encoding gene using *Agrobacterium tumefaciens*. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 21 : 173-180.
- Cho, D.Y., W.Y. Soh and W.I. Chung. 2001. Effect of medium component on plant regeneration via adventitious bud formation from leaf explant cultures of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). Kor. J. Plant Tissue Culture 28(3) : 173~178.
- Choi, K.H., Y.H. Kim, H.M. Chung, Y.I. Choi, E.W. Noh, H.S. Kim and J.H. Jeon. 2008. Selection of transgenic *Solanum nigrum* L. used environmental remediation expressing organomercurial lyase. J. Plant Biotechnol. 35(4) : 291-298.
- Donaldson, R.P and D.G. Luster. 1991. Multiple forms of plant cytochrome P450. J. Plant Physiol. 96 : 669-674.
- Doo, H.S. 2007. Trans-resveratrol content of peanut seeds depends on varieties and processing method. Kor. J. Plant Res. 20 : 553-557.
- Henderson R.J.F. 1974. *Solanum nigrum* L. (Solanaceae) and related in Australia. Contribution to the Queensland herbarium. 16 : 1-78.

- Hoshino, T., T. Yamaura, H. Imaishi, M. Chida, Y. Yoshizawa, K. Higashi, H. Ohkawa and J. Mizutani. 1995. 5-epi-Aristolochene 3-hydroxylase from green pepper. *Phytochemistry* 38 : 609-613.
- Joo, C.N., H.B. Lee and Y.M. Kim. 1987. Recombination of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *J. Nat. Sci. Res. Ins.* 19 : 87-110.
- Jung, S.H., S.R. Min, S.Y. Lee, J.Y. Park, S.J. Davarpanah, H.J. Chung, J.H. Jeon, J.R. Liu and W.J. Jeong. 2007. Gene silencing induced by cytosine methylation in transgenic tomato. *J. Plant Biotechnol.* 34(4) : 323-329.
- Kang, W.H., J.D. Lim, C.H. Li and C.Y. Yu, 2001. Pathogene resistance of cotton GST cDNA in transgenic *Scrophularia buergeriana* Misrule. *Kor. J. Plant Tissue Culture* 28(6) : 297~304.
- Kartha, K.K., S. Champous, O.L. Gamborg and K. Phal. 1977. *In vitro* propagation of tomato by shoot apical meristem culture. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 102 : 346-349.
- Kim, J.H., I.G. Mok, J.E. Cha, J.G. Woo, K.H. Shin and S.K. Sung. 2003. Transformation of micro tomato for selection system establishment of useful gene. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 21 : 83.
- Kim, J.K., J.K. Bang, M.H. Kang, C.B. Park, B.H. Lee and M.N. Chung. 1999. Status and prospect on developmen of genetically modified organism. *Kor. J. Intl. Agri.* 11(3) : 234-242.
- Ko, K.S., I.O. Heo, K.P. Yang, W.J. Lee, C.M. Kim and P.H. Jo. 1991. Transformation and hairy root culture in *Solanum nigrum* by *Agrobacterium rhizogenes*. *Kor. J. Pharmcogn.* 22(1): 26-32.
- Kwon, S.T and P. Hasegawa. 2008. Enzyme activity and gene expression of cytochrome P450 involved in capsidiol biosynthesis in Solanaceae

- plants. Kor. J. Plant. Res. 21(2) : 139-143.
- Lee, S.W., J.H. Choi and C.H. Lee. 2003. Effect of phyto-hormonal composition on the callus induction of korean potato cultivars and multiplication of regenerated plants. J. Agric. Tech. Res. Inst (Jinju Nat. Univ.) 16 : 65-71.
- Lim, H.T., K.S. Lee, Y.R. Yeoung, Y.N. Song and J.H. Kim. 1994. Plant regeneration from hypocotyl explants of several species of *Lycopersicon*. Kor. J. Plant Tissue Culture 21(3) : 137-143.
- Lim, H.T. 1991. Somaclonal variation in leaf-callus regenerated plants of *Lycopersicon esculentum* L. var Rutgers. J. Sci. Tech. (KNU) 30 : 380-388.
- Mann, J.D. 1978. Production of solasodine for the pharmaceutical industry. *Advances in Agronomy*. 30 : 207-243.
- Murashige, T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Oh, M.K., Y.M. Lee and M.S. Park. 1997. Plant regeneration from leaf segments of *Lycopersicon esculentum* L. *Agri. Sci. Tech.* 32 : 28-35.
- Oh, M.J., J.M. Park, T.K. Hwan, J.R. Liu and W. Kim. 2007. Plant regeneration from leaf and root cultures of *Lycoris chejuensis* via bulblet formation. *J. Plant Biotechnol.* 34(3) : 223-227.
- Park, Y.Y., M.S. Cho and J.B. Chung. 2007. Effect of salt strenght, sucrose concentration and  $\text{NH}_4/\text{NO}_3$  ratio of medium on the shoot growth of *Wasabia japonica in Vitro* Culture. *J. Plant Biotechnol.* 34(3) : 263-269.
- Pyon, J.Y. 2000. Detoxification and selectivity of herbicides by plant cytochrome P450. *Kor. J. Weed Sci.* 20(1): 89-98.

- Pyon, J.Y and N.E. Balke. 1997. The enhancement of cytochrome P450 mediated arylhydroxylation of bentazon in rice microsomes. *Kor. J. Weed Sci.* 17 : 59-65.
- Rhim, S.L. 1998. Molecular breeding of transgenic tomato plants expressing the  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Agricultural Chemistry and Biotechnology.* 41(2). pp.137-140.
- Saijo, R., K. Murakami, T. Nohara A. Tomimatsa, A. Saito, and K. Matsuoka. 1982. Studies on the constituents of *Solanum* plants II. Constituents of the immature fruits of *Solanum nigrum*. *Yakugaku Zasshi* 102 (3): 300-305.
- Kwon, T.O., T.S. Kim and S.Y. Lee. 1995. Anther culture of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. *Kor. J. Med. Crop Sci.* 3(3) : 233-239.
- White, F.F. 1993. Vectors for gene transfer in higher plants. In: *Transgenic plants Vol. 1.* Kung S. (ed.). Academic Press, New York pp. 15-48.
- Wislocki, P.G., G.T. Miwa and A.Y.H. Lu. 1980. Enzymatic basis of detoxification. Vol. 1. Jakoby, W.B. (ed.). Academic Press, New York. pp. 135-182.
- Yang, D.C., K.Y. Lee, Y.S. Yoo, K.H. Choi and H.T. Lim. 1997. Plant regeneration and expression of mouse adenosine deaminase gene in transgenic hot pepper (*Capsocum annuum* L.) plants. *Kor. J. Plant Tissue Culture* 24(1) : 37-41.
- Yu, JM., H.J. Jeong, K.M. Kim and S.S. Kwak. 1998. Superoxide dismutase and peroxidase activity of transformed callus in tomato. *Kor. J. Plant Tissue Culture* 25(3) : 177-181.
- 배기환. 2000. 한국의 약용식물(The Medicinal Plants of Korea). 교학사, 서울 pp. 456.