

항생제와 제초제 이중 선발 마커를 이용한 들깨 형질전환

김경환^{1*}, 이정은¹, 하선화¹, 한범수¹, 박종석¹, 이명희², 정찬식², 김용환¹
¹농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부, ²농촌진흥청 국립식량과학원 기능성작물부

Perilla transformation using selection markers containing antibiotics and basta

Kyung-Hwan Kim^{1*}, Jung-Eun Lee¹, Sun-Hwa Ha¹, Bum-Soo Hahn¹, Jong-Sug Park¹, Myung-Hee Lee²,
Chan-Sik Jung², and Yong-Hwan Kim¹

¹Department of Agricultural Bio-resources, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration,
Suwon 441-707, Korea

²Department of Functional Crop Science, National Institute of Crop Science, Rural Development Administration,
Milyang 627-803, Korea

ABSTRACT A modified method of *Agrobacterium*-mediated *perilla* transformation was developed using two selection markers of an antibiotics (either *hpt* or *nptII*) and an herbicidal (*bar*) gene. *Perilla* hypocotyl explants were cocultured with *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 strain harboring plasmid vector (either pMOG6-Bar or pCK-Bar) for three days, respectively. Primary shoots were selected with antibiotics of hygromycin (15 mg/L) or kanamycin (125 mg/L) and regenerated shoots were further selected with herbicide phosphinothricin (ppt, 1.2 mg/L) to obtain authentic transformants. Roots were induced for the regenerated shoots on the MS medium without hormone and 80 putative transgenic plants were obtained. Transgene integration into *perilla* genome was confirmed by Southern blot and their expression was analyzed by Northern blot. T1 perilla seeds derived from T0 plants were tested 0.3% basta spray for identification of stable gene delivery to next generation.

서 론

들깨는 고대로부터 우리나라에서 재배되어 온 유지작물로서 종실과 잎 모두 식용으로 널리 이용되고 있으며 기름 51.7%, 단백질 17.4%, 탄수화물 20% 정도로 기름이 많고 식이섬유가 풍부하다 (Longvah and Deosthale 1991). 기름은 리놀렌산 (linolenic acid, 18:3) 63%, 리놀레산 (linoleic acid, 18:2) 14.8%, 올레산 (oleic acid, 18:1) 14.3%로 인체에 꼭 필요한 필수지방산인 리놀레산과 리놀렌산이 주성분이며

(Shin and Kim 1994), 필수지방산이 부족하게 되면 성장 저해, 불임, 피부질환 등이 나타날 수 있다. 특히 리놀렌산은 EPA나 DHA와 같은 오메가 3 지방산으로 혈청지질의 변화, 암세포 증식 억제, 알러지 체질의 개선 등의 생리조절 기능에 영향을 주며 시신경 발달과 학습능력을 증진시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 들깨는 우리식단에서 들깨잎을 이용한 채소류, 참깨 다음으로 많이 먹는 단순한 유지류로 기능에 비하여 그 중요성이 많이 알려져 있지 않은 편이다. 현재에는 오메가 3 지방산의 효능이 알려지면서 *perilla* oil이라는 건강보조식품으로 판매되고 있으나 아직 국내에서 상품으로 판매되는 것은 미미한 실정으로 최근 웰빙 바람과 건

*Corresponding author Tel 031-299-1983 Fax 031-299-2408
E-mail: kimhwan@rda.go.kr

강에 대한 중요성이 인식되면서 건강기능성 상품으로서의 성장가능성이 밝다고 생각된다.

들깨의 품종개량연구는 순계분리에 의한 지방재래종의 순계선발, 교잡육종 및 돌연변이 육종에(Lee et al. 1994) 의하여 종실용과 잎채소용으로 이용이 가능한 품종을 육성하는 방향으로 진행되어 왔다. 그러나 이러한 전통적인 육종은 도입하려고 하는 형질이 다양하지 않고 교배가 가능한 작물에서만 형질도입이 가능하므로 품종 개발에 어느 정도 한계가 있다 (Lee et al. 1998). *Agrobacterium*을 이용하여 식물에 관한 형질전환 방법이 확립 (Davey et al. 1980) 된 이후에 제초제저항성이나 해충저항성, 품질 개량 등과 같은 기존 작물에서 볼 수 없었던 형질을 도입해서 새로운 품종의 GMO 작물이 상업용으로 재배되거나 판매되고 있는 상황이다. 이러한 형질전환 방법을 이용하여 들깨에 존재하지 않는 지방산 생산, 병저항성, 산패방지 등의 여러 가지의 좋은 형질을 들깨에 도입하기 위하여 먼저 들깨의 재분화 체계와 형질전환 방법이 확립되어야 한다. 들깨 조직배양에 대한 연구 (Kim et al. 1993; Lee et al. 1994)와 형질전환에 대한 여러 가지 조건을 비교한 결과가 (Kim et al. 2004) 최근에 보고되었다.

본 실험에서는 hygromycin과 kanamycin을 1차 형질전환 선발 마커로 사용하고 2차 선발마커로는 basta제초제를 이용하여 들깨형질전환을 실시하고 유전자의 삽입과 발현을 확인하고 형질전환체의 특성을 확인하였다

재료 및 방법

식물재료

온실에서 재배한 엽실들깨 (*Perilla frutescens* var japonica H. var Yeupsil)를 형질전환의 재료로 사용하였다. 들깨 (엽실) 종자를 70% 에탄올에 1분간 침지하고 멸균수로 3회 세척한 후 50% 락스에 20분간 침지한 다음에 멸균수로 3-4회 세척하였다. 종자를 멸균된 filter paper를 이용하여 건조시킨 후 1/2 MS 배지에 파종하고 6-8일 동안 배양한 후 배축을 0.5 - 1 cm 정도의 크기로 절단한 것을 explant로 사용하였다.

형질전환에 사용한 운반체

선발 마커로 hygromycin 저항성 유전자 *hpt*와 제초제저항성 유전자인 *bar*를 가진 pMOG6-Bar 운반체와 kanamycin 저항성 유전자 *npt II*와 제초제저항성 *bar* 유전자를 가진 pCK-Bar 운반체를 이용하였다. pMOG6-Bar 운반체는 연구소에서 사용하던 것을 이용하였으며 (Lee et al. 2000) pCK-Bar 운반체는 pMOG6-Bar 운반체의 *bar* 유전자를 *HindIII*로 절단 한 후 pCambia 2300에 클로닝하여 kanamycin 저항성 *npt II*와 제초제 저항성 *bar* 유전자를 가진 pCK-Bar 운반체를 만들었다 (Figure 1). 작성된 형질전환용 운반체DNA는 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105에 삽입하여 들깨 형질전환용으로 사용하였다.

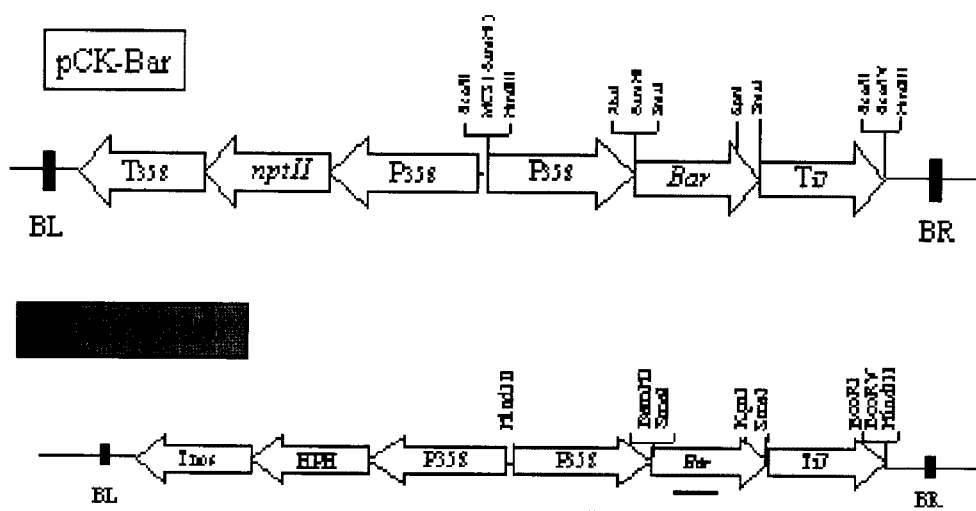


Figure 1. Schematic representation of the binary vectors constructed for *perilla* transformation. The T-DNA region of the pMOG6-Bar and pCK-Bar binary vectors showing the assembly of hygromycin expression cassette (P35S:HPH:T35S), bar expression cassette (P35S:Bar:Ti7) and kanamycin expression cassette (P35S:nptII:T35S).

들깨 형질전환

운반체 pMOG6-Bar와 pCKBar 유전자가 들어있는 *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105를 rifampicin (50 µg/ml)과 kanamycin (50 µg/ml)과 이 포함된 YEP 배지에서 seed culture한 후 1% 배양액을 접종하여 20시간 정도 배양하였다. 배양된 *Agrobacterium*을 (OD₆₀₀=1) 5,000 rpm에서 5분 정도 원심 분리하여 배양액을 제거한 후 호르몬이 없는 액체배지로 약 20배 희석한 후 6-8 일 배양한 들깨 배축과 아그로박테리움을 1시간 감염시켰다. 세균을 감염 후 멸균된 filter paper에 배축을 놓고 건조 후 공동 배양 배지 (MS 기본배지, 3% sucrose, 3 mg/L BAP, 0.4% gelrite)에서 25°C, 3일간 *Agrobacterium*과 식물체를 공동 배양하였다. 공동 배양한 explant에서 표면에 있는 *Agrobacterium*을 제거하기 위하여 cefotaxime 250 mg/l가 첨가된 MS 배지 (Murashige et al. 1962)에서 세척한 후 멸균된 종이에 올려 외부의 수분을 제거한 뒤 shoot를 유도하는 선발배지 (MS 기본배지, 3% sucrose, 3 mg/L BAP, 0.01 mg/L NAA, 0.4% gelrite, 125 mg/L kanamycin 또는 15 mg/L hygromycin, 500 mg/L carbenicillin, pH 5.6)에 옮겨서 형질전환된 배축에만 shoot가 유도되도록 하였다. 선발배지는 2주 또는 3주마다 새로운 배지로 계대배양을 하면서 형질 전환된 shoot 부분만을 절단하여 2차 선발배지 (MS 기본배지, 3% sucrose, 3 mg/L BAP, 0.4% gelrite, 1.2 mg/L PPT, 500 mg/L carbenicillin, pH 5.6)에서 선발한 후에 뿌리 유도배지 (1/2 MS 기본배지, pH 5.8)에서 뿌리의 형성을 유도하였다. 위와 같은 방법들을 이용하여 선발한 재분화개체들 중 뿌리가 발달된 개체들은 배양병에서 꺼내서 뿌리를 물로 잘 수세하여 플라스틱의 순화용기

에서 멸균된 질석 (vermiculite)에 이식하여 순화하고 온실에서 재배하였다

형질전환체의 검정

재분화개체의 형질전환여부를 확인하기 위하여 Southern blot을 수행하였으며 (Southern 1975) 들깨의 genomic DNA는 mCTAB 방법 (Hwang and Kim 2000)에 따라 분리하였다. 분리된 DNA를 HindIII 제한효소로 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동 하고 전기영동이 끝난 gel은 capillary transfer 방법으로 nylon membrane에 전이시켰다. Membrane을 65°C에서 hybridization 용액 (0.5 M Na₂PO₄ pH 7.2, 1% BSA, 7% SDS, 100 µg/ml salmon-sperm DNA)에 3시간 동안 prehybridization한 후, radioactive probe (P³²)를 이용하여 하루 동안 hybridization 하였다. Probe는 specific primer를 이용하여 *hpt*, *nptII*와 *bar* 유전자를 PCR로 증폭한 후 elution 하여 사용하였다. Hybridization이 끝난 membrane은 2 x SSC / 0.1% SDS (65°C)용액에서 10분, 1 x SSC / 0.1% SDS용액 (65°C)에서 20분 세척 한 후 Bio-imaging analyzer (BAS-2000; Fuji Photo Film, Tokyo, Japan)로 분석하였다.

유전자의 발현 정도를 확인하기 위하여 Northern blot을 수행하였으며 형질전환된 들깨 잎으로부터 total RNA의 분리는 Smith 등 (1986)의 방법에 따라 수행하였으며 probe로는 *bar* 유전자를 사용하였다. 분리된 total RNA 10 µg을 1% formaldehyde agarose gel에 전기영동 한 다음 capillary transfer 방법으로 nylon membrane에 전이시켰다. Hybridization 반응과 membrane의 세척은 Southern 분석과 같은 방법으로 실시하였다.

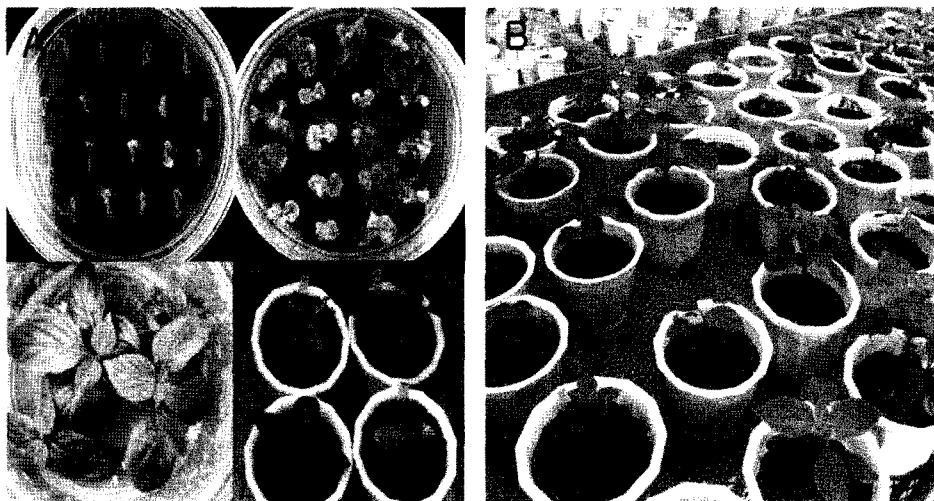


Figure 2. Regeneration and genetic transformation of *perilla* using *A.tumefaciens*. A Regeneration step of putative transgenic *perilla* using *Agrobacterium*-infected hypocotyls B Transgenic *perilla* plants to resistant to basta cultivated in greenhouse for 4 months.

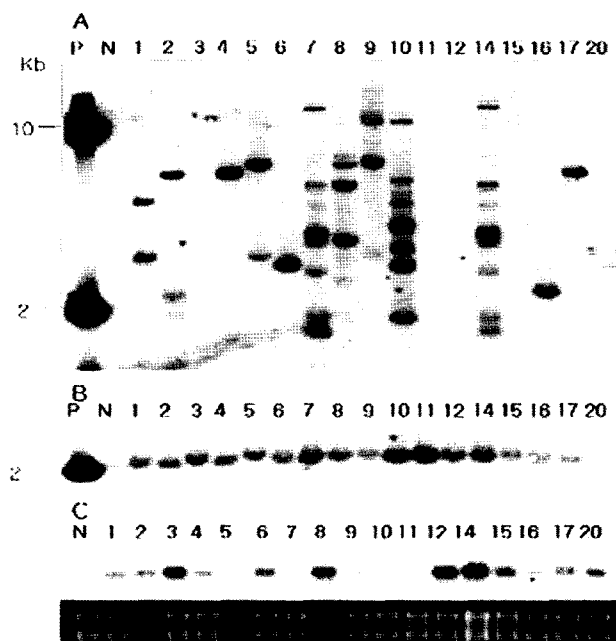


Figure 3. Molecular analysis of the hygromycin and basta genes in *perilla* transgenic plants. A Southern blot analysis of the *Hind*III-digested genomic DNA (10ug)) isolated from 17 different T1 lines and hybridized with hygromycin gene probe. N, non-transformed control plant, 1-20 resistant plants analyzed B. Southern blot analysis to detect the presence of *bar* transgene in *Hind*III-digested genomic DNA (A) deprobing membrane. C. Northern blot analysis on the total RNA isolated from leaf collected from 17 To lines and probed with *bar* gene probe. The rRNAs stained by ethidium bromide indicate the amount of total RNA loaded in each lane.

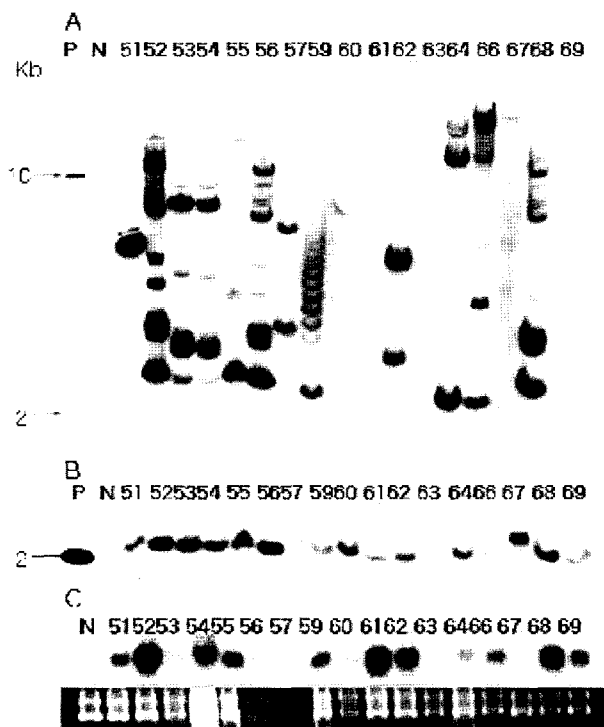


Figure 4. Molecular analysis of the hygromycin and basta gene in *perilla* transgenic plants. A Southern blot analysis of the *Hind*III-digested genomic DNA (10ug) isolated from 17 different T1 lines and hybridized with kanamycin gene probe. N, non-transformed control plant, 51-69 resistant plants analyzed B. Southern blot analysis to detect the presence of *bar* transgene in *Hind*III-digested genomic DNA (A) deprobing membrane C. Northern blot analysis on the total RNA isolated from leaf collected from 17 To lines and probed with *bar* gens probe. The rRNAs stained by ethidium bromide indicate the amount of total RNA loaded in each lane.

후대 검정

유전자도입과 발현이 확인된 들깨 형질전환체의 T1 종자를 100개체씩 온실에 파종하여 잎이 4-6엽 정도 되었을 때 0.3%의 바스타 제초제를 살포하였으며 형질전환체의 생존 여부에 따라서 제초제에 대한 저항성개체와 감수성개체로 판별하였으며 분리비는 χ^2 검정에 준하여 추정하였다.

결과 및 고찰

형질전환 운반체 작성 및 항생제 선발 농도

형질전환체 선발을 위한 운반체로 *hpt*와 *bar* 유전자가 포함된 pMOG6-*bar*와 *nptII*와 *bar* 유전자가 포함된 pCK-*Bar* 운반체를 이용하였다. 운반체는 *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105에 삽입하여 항생제 선발 농도 및 들깨 형질전환에 사용하였다. 기존에 알려진 들깨의 재분화 조건을 기초로 하여 항생제의 선발농도를 규명하였으며 pMOG6-*Bar*와 pCK-*Bar* 운반체를 이용하여 각각 hygromycin과 kanamycin 선발농도를 결정하였으며 적정 항생제 선발 농도는 hygromycin은 15 mg/L 와 kanamycin은 125 mg/L 였다.

들깨 형질전환체 육성

파종 후 6-7일된 들깨의 배축을 이용하여 아그로박테리움과 공동배양으로 형질전환을 실시하였으며 pMOG6-*Bar*를 가진 균주는 hygromycin 15mg/L의 항생제를 이용하여 shoot를 선발하였으며 pCK-*Bar*를 가진 균주는 kanamycin 125mg/L로 형질전환 shoot를 1차로 선발하였다. 두 운반체를 가진 *Agrobacterium*을 배축과 공동배양 한 후 선발배지에 치상하였으며 치상한 배축은 2-3주 간격으로 새로운 배지로 옮겨주었으며 1개월이 경과하면 shoot가 형성되었으며 일부에서는 callus도 형성되었다. 배축의 끝 부분에서 직접적으로 shoot가 형성되는 경우는 2-3개월 정도 후에 정상적인 식물체의 모양을 형성하였다. 그러나 callus가 형성되는 배축은 shoot를 형성하기 위하여 4-5개월 정도를 계속해서 계대배양하여야 하고 GUS 염색 시 callus 부위에서 escape가 많이 발생하였으며 shoot의 형성율도 상당히 떨어졌다. 이렇게 1차적으로 kanamycin과 hygromycin에서 형성된 shoot를 phosphinothricin이 포함된 배지에 이식하여 2차로 선발한 결과 재분화체 중 형질전환 식물체의 비율을 높일 수 있었다. 재분화 개체의 뿌리

형성을 위하여 재분화 개체에 NAA shock를 준 후에 MSO배지에서 뿌리를 유도하거나, 항생제와 carbenicillin의 농도를 선발배지에서 1/2로 줄였으나 뿌리 유도에는 효과적이지 못하였다. 최종적으로는 선발배지에서 1-2 cm 정도로 성장한 싹을 생장조절제와 항생제가 포함되지 않는 1/2MS 배지에 이식해서 뿌리 형성을 유도하였다. 이 조건에서는 1주일 후부터 뿌리가 유도되기 시작하였으며 때로는 완전히 사멸되지 않는 *Agrobacterium*이 성장하여 식물체를 괴사시키는 경우도 있었으나 뿌리의 유도율은 90% 이상으로 높았다. 2주간 뿌리 형성을 유도한 후에 살균된 질석에 식물체를 이식하여 순화하였으며 이 과정에서 입자가 적은 질석은 수분함량의 과다 및 통기 불량 때문에 식물체가 고사하는 비율이 높았으며 입자가 약간 큰 질석이 물 빠짐 및 통기가 좋아서 식물체의 생존율이 높았다.

들깨의 재분화는 잎, 자엽, 배축 등 어느 부위를 사용해도 잘 되었으나 kanamycin, hygromycin, carbenicillin 등의 항생제나 PPT를 첨가한 배지에서는 재분화가 잘 되지 않았다. 자엽을 이용하여 형질전환한 경우가 형질전환체의 형성이 양호하여서 자엽을 이용하여 pMOG6-*Bar* 운반체를 이용하여 PPT 선발로 200여 개체의 재분화 식물체를 획득하였다. 재분화 식물체의 형질전환여부를 확인하기 위하여 0.3%의 바스타 제초제를 살포시 모든 개체가 고사하여 형질전환체를 확인할 수 없었다 (data not shown). 자엽을 이용하여 형질전환하는 경우는 때로 성장점 부위가 포함되거나 이미 분화된 세포를 이용하여 형질전환이 되기 때문에, 다른 식물 부위보다 재분화율은 높았으나 형질전환체를 획득하지는 못하였다. 이외에 잎을 이용하여 형질전환을 실시한 경우는 거의 재분화체를 획득하기가 용이하지 않았기 때문에 파종 후 6-8일된 배축 부위를 이용하여 형질전환을 수행하였으며 형질전환효율은 1.2-1.6% 정도였다.

항생제 (hygromycin, kanamycin)와 PPT로 이중 선발 후 생존 개체를 순화하여 온실에 재배하였으며 재분화 개체수는 pMOG6-*Bar*와 pCK-*Bar* 운반체가 각각 40개체였다. pMOG6-*Bar* 운반체를 이용한 형질전환율은 1.2%로 낮았으나 40개체 재분화체는 0.3% 제초제와 0.6%제초제 처리시 모든 개체가 생존하여 형질전환체임을 확인하였다. pCK-*Bar* 운반체를 이용한 형질전환율은 1.6%로 약간 더 높았으나 제초제저항성을 확인한 결과는 40개체 중에서 0.3% 제초제에서 4개체가 고사하고 0.6%제초제 살포시 8개체가 더 고사하여 최종적으로는 28개체만 생존하였다.

형질전환체의 분자생물학적 분석

재분화된 식물체의 유전자 도입여부를 확인하기 위하여 0.3% 바스타 제초제 처리시 생존개체를 대상으로 genomic DNA를 추출하여 Southern blot을 실시하였다. 분리한 genomic DNA를 *HindIII*로 절단한 후에 유전자의 copy 수를 확인하기 위하여 항생제 유전자 (hygromycin, kanamycin)를 probe로 사용하여 1차로 hybridization을 실시하였으며 같은 membrane을 deprobing한 후 *bar* 유전자를 probe로 2차 hybridization을 실시하였다.

pMOG6-Bar 운반체를 이용한 형질전환체의 Southern blot의 결과 hygromycin 유전자가 single copy로 삽입이 확인된 개체가 4개체이고 여러 copy의 유전자 삽입이 확인된 8개체와 유전자의 삽입을 확인할 수 없는 개체가 5개체 (3,11,12,14,17번)였다. 이와 같이 *Agrobacterium*을 매개로 한 형질전환시 one copy가 들어간 것이 일반적이거나 실제 실험에서는 여러 copy가 들어간 경우도 다수 발견되는 것으로 보고 되고 있다 (Agrawal et al. 2005). 같은 계통을 *bar* 유전자를 이용한 Southern blot 결과는 형질전환체와 positive control 모두에서 예상과 같은 약 2kb 정도 크기의 band를 확인할 수 있었으며 *bar* 유전자가 정상적으로 삽입됨을 확인하였다. Hygromycin 유전자는 삽입되지 않고 *bar* 유전자가 삽입된 5개체는 1차로 hygromycin선발 후 2차 선발시에 hygromycin을 사용하지 않았기 때문에 선발과정에서 유전자가 제거 된 것으로 생각되었다.

형질전환체의 유전자 발현을 확인하기 위하여 형질전환체에서 total RNA를 분리하고 *bar* 유전자를 이용하여 Northern blot을 실시한 결과 발현양이 상대적으로 많은 개체와 (3, 12, 14번) 발현양이 적은 개체(5, 10, 11번)를 볼 수 있었으며 발현양에 상관없이 모두가 0.3% 바스타 제초제 살포 시에 생존하였다. 이런 발현양의 차이는 도입유전자의 수, 삽입위치, genome 내의 도입유전자의 재배열 등 많은 요인이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있으며 (Cooley et al. 1995, Sarria et al. 2000) 형질전환체의 형태적 차이는 보이지 않았다.

pCK-Bar 운반체를 이용한 형질전환체의 경우 kanamycin 유전자가 single copy로 삽입된 것이 확인된 개체는 1개체였으며, 2 copy이상의 multicopy로 삽입된 12개체와 유전자 삽입이 확인되지 않는 개체가 4개체였다. 그 중에서 53번과 54번, 64번과 66번 개체는 서로 같은 밴드 패턴을 지니고 있어서 형질전환시에 같은 shoot에서 유래할 수도 있음을 알 수

있다. 그러나 보다 정확한 정보를 얻기 위해서는 후대에서 도입유전자의 확인이 필요할 것으로 생각된다.

형질전환체의 total RNA를 이용한 Northern blot결과, *bar* 유전자의 발현량은 52, 61, 62, 68 네 개체에서 높았으며 상대적으로 발현량이 적은 53, 56, 63, 67번 개체도 제초제 선발 권장 농도인 0.3% 바스타에서 생존하였다.

형질전환체의 후대 유전분석

0.3% 제초제를 살포하여 형질전환체로 확인된 76개체 중에서 pMOG6-Bar 17개체와 pCK-Bar 17개체를 대상으로 T1 종자 파종하여 분리비와 유전자의 후대 유전여부를 확인하였다. 각 계통마다 100개체의 종자를 파종하였으며 발아된 개체를 대상으로 잎이 4-6엽 정도 되었을 때 0.3%의 바스타 제초제를 살포하여 분리비를 검정한 결과는 Table 9와 같다. 이 중에서 3:1로 분리되는 개체는 20계통으로 single copy로 유전자가 삽입되었다고 생각되어지며, 15:1로 분리되는 10계통은 two copy가 삽입된 것으로 생각되었다. 분리비는 3:1로 예상되나 P value가 신뢰범위를 넘어서 판별이 불가능한 개체도 4계통이 존재하였다. 정상적으로 생존한 개체를 이용하여 *bar* 유전자의 후대 유전여부 및 분리비를 검정한 결과는 멘델의 유전분리비를 따라서 정상적으로 유전하는 것을 확인하였다. 일부 발아하지 않은 개체는 겨울에 온실에서 단일조건에 종자를 수확하였기 때문에 종자의 성숙 정도에서 문제가 있었기 때문으로 생각된다.

Genomic Southern의 결과 예측한 copy 수와 분리비에서 예상된 삽입유전자의 copy 수를 분석한 결과 single copy로 예상된 6번과 51번이 이론치와 일치하였다. 그러나 16번과 17번의 경우 Southern blot의 결과는 single copy였으나 예상 분리비에서 15:1로 분리되어 2 copy의 유전자가 삽입된 것으로 판단된 경우와, 12, 62번같이 Southern blot의 결과는 2 copy로 예상되었으나 분리비는 3:1로 나타난 경우 등 Southern blot과 분리비는 일치하지 않는 경우가 더 많았다. 이와 같은 결과는 형질전환 작물이 도입유전자를 지니고 있으나 발현하지 않기 때문에 나타나는 현상으로 유전자가 복수로 삽입된 개체에서 많이 관찰되었다 (James et al. 2002).

항생제와 제초제저항성 유전자를 가지고 형질전환한 경우는 항생제를 이용한 들깨 형질전환시 선발농도나 형질전환 방법에 유용하게 사용될 수 있다. 또한 제초제저항성이 도입된 들깨를 이용시 형질전환 여부의 판별 용이하고 농작

Table 1 Segregation ratios of self-pollinated *perilla* (T1 generation) with the inserted *bar* gene

To plant number	Observed ratio (Herb ^R :Herb ^S)	Expected Ratio	P-value
T-1	72:8	15:1	1.92
T-2	72:11	3:1	6.10
T-3	53:26	3:1	2.63
T-4	75:5	15:1	0.00
T-5	60:20	3:1	0.00
T-6	63:15	3:1	1.38
T-7	68:11	3:1	5.17
T-8	83:3	15:1	1.12
T-9	54:29	3:1	4.37
T-10	38:43	3:1	34.08
T-11	60:20	3:1	0.00
T-12	63:16	3:1	0.95
T-14	65:16	3:1	1.19
T-15	64:17	3:1	0.70
T-16	77:4	15:1	0.24
T-17	74:7	15:1	0.79
T-20	81:21	3:1	0.04
T-51	61:20	3:1	0.00
T-52	58:14	3:1	1.19
T-53	77:18	3:1	1.86
T-54	65:19	3:1	0.25
T-55	62:18	3:1	0.27
T-56	77:4	15:1	0.24
T-57	78:5	15:1	0.00
T-59	63:18	3:1	0.33
T-60	57:23	3:1	0.60
T-61	77:5	15:1	0.00
T-62	59:22	3:1	0.20
T-63	61:19	3:1	0.07
T-64	62:25	3:1	0.65
T-66	56:23	3:1	0.71
T-67	57:24	3:1	0.93
T-68	60:5	15:1	0.23
T-69	78:4	15:1	0.26

Herb^R : herbicide resistant
Herb^S : herbicide susceptible

물을 재배와 관리할 때에 제초제살포에 의한 잡초 제거가 용이하여 비닐 멀칭 설치가 불필요하다. 이로 인해 노동력 절감, 환경오염방지, 생산량 증대의 효과가 기대되며 육종소재로 사용할 경우 교배후대에서 유전자의 도입 및 발현에

대한 검정이 편리하여 신품종의 육종소요기간 단축과 선발의 효율성을 높일 수 있다. 또한 *Agrobacterium*을 이용한 들깨 형질전환 방법은 병저항성과 지방산 생합성 유전자 등을 들깨에 형질전환 함으로 병저항성 품종과 지방산 조성이 변화된 들깨의 품종 육성이 가능하고, 앞으로 다른 유용 형질의 도입이 가능해져서 들깨 신품종육성에 기여할 것으로 생각된다.

적 요

선발마커로 두종류의 항생제 (*hpt*와 *nptII*)와 제초제(*bar*) 유전자를 사용하여 아그로박테리움을 이용한 수정된 들깨 형질전환방법을 개발하였다. 들깨 배축 절편을 pMOG6-Bar 운반체 혹은 pCK-Bar 운반체를 가진 아그로박테리움 EHA 105와 각각 3일간 공동배양 하였다. 1차로 형성된 신품종은 하이그로마이신(15 mg/L)이나 카나마이신(125 mg/L)을 사용하여 선발하였고 재분화된 신품종들은 확실한 형질전환체를 얻기 위해서 포스포노트리신(1.2 mg/L)에서 한번 더 선발하였다. 뿌리는 호르몬이 없는 MS배지에서 재분화 신품종으로 부터 유도하였으며 80개의 재분화개체를 획득하였다. 들깨 지놈으로 형질전환유전자의 삽입은 서던 블럿으로 확인하였고 유전자의 발현은 노던 블럿으로 분석하였다. To 식물체로부터 유도된 T1들끼리 종자들은 후대로의 안정된 유전자 전이를 확인하기 위하여 0.3% 바스타 제초제 살포로 확인하였다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 경상연구비에 의해 지원되었습니다.

인용문헌

Agrawal PK, Kohli A, Twyman RM, Christou P (2005) Transformation of plants with multiple cassettes generates simple transgene integration patterns and high expression levels. *Mol Breed* 16: 247-260

Cooley J, Ford T, Cristou P (1995) Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plants produced by electric discharge particle acceleration. *Theor Appl Genet* 90: 97-104

Davey MR, Cocking EC, Freeman J, Pearce N, Tudor I (1980) Transformation of *Petunia* protoplasts by isolated *Agrobacterium* plasmids. *Plant Sci Lett* 18: 307-313

Hwang SK, Kim YM (2000) A simple and reliable method for preparation of cross-contamination free plant genomic

- DNA for PCR-based detection of transgenes. J Biochem Mol Biol 33: 537-546
- James VA, Avart C, Worland B, Snape JW, Vain P (2002) The relationship between homozygous and hemizygous transgene expression levels over generations in populations of transgenic rice plants. Theor Appl Genet 104: 533-561
- Kim JA, Choi HJ, Park SK, Kim DU (1993) Callus induction and plant regeneration from leaf segments and cotyledonary explants of *Perilla frutescens*. Korean J Plant Tissue Cult 20: 47-50
- Kim KH, Lee YH, Kim D, Park YH, Lee JY, Hwang YS, Kim YH (2004) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. Plant Cell Rep 23: 386-390
- Lee BH, Lee ST, Kim YS (1998) Reference review for the scientific researches on *Perilla*. RDA J Indus Crop Sci 40(1): 80-112
- Lee HS, Lee JI, Ryu SN, Hur HS (1994) Effect of low temperature and plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in anther culture of *perilla*. Korean J Breed 26: 345-352
- Lee YH, Lee SB, Suh SC, Byun MO, Kim HO (2000) Herbicide resistant cabbage (*Brassica oleracea ssp. capitata*) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. J Plant Biotechnol 2: 35-41
- Lee YI, Shin IC, Kim JA (1994) Characteristics of induced mutant lines from gamma irradiated *perilla*. Korean J Breed 26(1): 13-18
- Longvah T, Deosthale YG (1991) Chemical and nutritional studies on hanshi (*Perilla frutescens*) a traditional oilseed from northeast India. J Am Oil Chem Soc 68(10): 781-784
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Sarria R, Torres E, Angle F, Chavarriaga P, Roca WM (2000) Transgenic plants of cassava (*Manihot esculenta*) with resistance to Basta obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Cell Rep 19: 339-344
- Shin HS, Kim SW (1994) Lipid composition of *perilla* seed. J Am Oil Chem Soc 71(6): 619-622
- Smith CJ, Watson CF, Ray J, Bird CR, Morris PC, Schuch W, Grierson D (1986) Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. Plant Mol Biol 14: 369-379
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments. J Mol Biol 98: 503-517

(접수일자 2008년 11월 11일, 수리일자 2008년 11월 25일)