

## 유채 조직배양 및 형질전환 연구동향

이상일 · 김윤희 · 이동희 · 이유미 · 박서준 · 김종보

# Current status of tissue culture and genetic transformation systems in oilseed rape plants (*Brassica napus* L.)

Sang-Il Lee · Yun-Hye Kim · Dong-Hee Lee · Yu-Mi Lee · Seo-Jun Park · Jong-Bo Kim

Received: 4 October 2010 / Accepted: 10 November 2010  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Oilseed rape (*Brassica napus* L.) is an important crop due to its high oil content in the seed. Recently, the demand for the improvement of crop for biodiesel energy source is increased as oil prices in the world has increased dramatically. Until now, oilseed rape breeding was carried out by cross-hybridization between different varieties and related germplasms. However, like as many other crops, the application of tissue culture and gene transformation systems has been introduced into oilseed rape breeding program including the development of transgenic canola plants.

In this study, we reviewed a history of tissue culture and genetic transformation research in oilseed rape plants and indicated some important aspects for the production of transgenic oilseed rape plants.

**Keywords** *Agrobacterium*, Bio-diesel, Oilseed rape, Particle bombardment, Transformation

S.-I. Lee, Y. -H. Kim and D.-H. Lee should be considered as co-first authors.

S. I. Lee · Y. H. Kim · Y. M. Lee · J. B. Kim (✉)  
건국대학교 자연과학대학 생명자원환경과학부  
(Faculty of Life Resources and Environmental Science, Konkuk University, Choong-Ju, 380-701, Korea)  
e-mail: jbhee1011@kku.ac.kr

D. H. Lee  
제노마인(주) 첨단생명공학연구소  
(Genomine Advanced Biotechnology Research Institute, Genomine Inc., Po-hang 790-834, Korea)

S. J. Park  
국립원예특작과학원 과수과  
(Fruit Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea)

## 서론

무분별한 화석연료의 사용에 따른 지구온난화와 이로 인해 발생하는 이상기후, 환경문제, 국제유가의 불안정 등으로 최근 대체에너지에 대한 관심이 급증하고 있다 (Chung et al. 2008). 유엔기후협약과 온실가스 감축을 위한 교토의정서가 발효됨에 따라 선진 각국은 온실가스 감축의무를 준수하고 지속가능한 경제 발전을 위해 바이오에너지 개발 및 보급 목표를 정해 중점 투자하고 있다 (Chung et al. 2008; Kim and Lee 2006). 화석연료 의존도 감소와 이산화탄소 배출을 줄이기 위해 대체에너지 개발에 박차를 가하고 있으며 세계에너지기구에서는 2005년 대체에너지 개발에 투자된 비용은 전 세계적으로 약 380억 달러에 이른다고 보고하였다 (<http://www.iea.org>). 수송용 원료를 100% 수입에 의존하고 이산화탄소 배출 세계 10위인 우리나라에서도 이산화탄소 감축과 고유가에 대비하여 대체에너지 개발이 진행 중에 있다 (배정환 2006; 원두환 2008). 각국에서 개발 중인 대체에너지에는 원자력, 수력, 풍력, 지열, 태양열, 바이오연료 등이 있으며 최근 수송용 연료를 대체할 수 있는 바이오연료에 대한 관심이 증가하고 있다 (Hill et al. 2006; Chung et al. 2008). 바이오연료로는 바이오 에탄올과 바이오디젤이 있으며 최근 유럽, 미국, 브라질, 중국 등 각국에서는 보급 활성화를 위해 연구와 개발에 박차를 가하고 있다 (Chung et al. 2008; 배정환 2006). 바이오연료 중 바이오디젤은 식물성 및 동물성 지방, 폐식용유 등 재생 가능한 자원을 이용하여 경유를 대체하는 연료를 말하며 경유와 혼합하거나 대체하여 사용가능하다 (Kim and Lee 2006). 바이오디젤은 바

이오매스를 이용하여 생산하므로 에너지 자원의 고갈 문제가 없으며 수송용 연료로 이용시 발생하는 CO<sub>2</sub>는 작물 성장과정에서 회수되므로 CO<sub>2</sub> 배출량이 대단히 적다. 또한 황이 포함되어있지 않아 산성비의 원인인 유황산화물(Sox)의 배출이 거의 없으며 높은 산소 함유량(10~12%)으로 보다 완전한 연소가 이루어져 발암물질인 미세물질의 배출량이 70%가량 줄어드는 등 여러 환경적 이점이 있다 (Kim and Lee 2006; Lee and Kim 2002). 국내에서는 바이오연료 중 바이오디젤을 중심으로 보급이 진행 중이며 2006년 경유에 바이오디젤을 5% 첨가한 BD5를 보급하기 시작하여 현재 BD10연료를 보급하고 있다. 국내 바이오 디젤 산업은 시범 보급 단계를 거쳐 상용화 단계에 있으나 생산량이 충분치 않은 실정이며 원료작물을 거의 전량 수입에 의존하고 있어 낮은 원료 자립도와 국제 곡물가격 상승은 국내 바이오디젤의 개발 보급에 부담이 되고 있다 (원두환 2008). 국내 바이오디젤 생산원료는 주로 대두유를 이용하고 있으나 2007년부터 유희농지 및 겨울철 이모작 지역을 이용하여 국내 농업환경에 적합한 유채를 시범재배하고 있다 (배정환 2006).

본 논문에서는 형질전환 유채의 개발을 위해 국내외에서 보고된 유채 조직배양과 형질전환 연구의 결과와 특성을 살펴보고자 한다.

#### 바이오디젤 원료작물로서의 유채와 국내재배 현황

바이오디젤 원료용 작물 중 유채는 다른 작물에 비해 바이오디젤 생산량과 밀접한 관계가 있는 올레인산의 함량이 높으며 기름을 추출하고 남은 산물인 유채박은 양질의 동물사료나 유기질 비료로 사용이 가능한 특징이 있다 (Table 1). 일반적으로 종실에 35~45%의 유지를 함유하고 있으며 종실 수량은 1 ha당 약 1~4 톤이다 (Kim and Lee 2006). 바이오디젤 주요 생산국인 독일에서는 유채재

배를 통해 바이오디젤을 생산하고 있으며 국내에서는 이모작이 가능하고 새로운 농가수입 창출과 석유수입 대체를 목적으로 제주도를 비롯하여 남부지역에서 시범 재배되고 있다. 국내에서는 주로 ‘한라’ 품종을 재배하지만 생산성이 ha당 1톤에 불과한 단점이 있어 다수성 품종 개발 연구가 이뤄지고 있으며 농촌진흥청 ‘친환경·바이오 에너지연구사업단’에서는 10 a당 450 kg으로 생산성이 증가된 품종 (청풍, 선망, 청랍)과 바이오디젤 품질을 결정짓는 올레인산 함량이 60~65%까지 증대된 고 올레인산 품종 (용당, 한라, 영산, 내한, 탐라, 탐미 등)을 개발하였다 (Kim and Lee 2006; [http://www.rda.go.kr/board/board.do?mode=view&prgId=day\\_ctbtcolumnEntry&dataNo=100000439910](http://www.rda.go.kr/board/board.do?mode=view&prgId=day_ctbtcolumnEntry&dataNo=100000439910)). 세계 각국에서는 생산량 향상을 위해 유지함량과 생산성이 증대된 품종개발에 박차를 가하고 있으나 전통 육종을 이용한 방법은 유전자의 직접 도입이 불가능하고 원하는 형질을 도입하는데 많은 시간이 걸리는 단점이 있어 최근 식물생명공학기술을 이용한 식물형질전환 연구가 시도되고 있다.

#### 조직배양기술의 연구현황

형질전환 기술을 이용한 신품종 유채를 개발하기 위해서는 우선적으로 효율적인 조직배양체계가 확립되어 있어야 한다. 식물조직배양기술은 유용물질 생산, 유용유전자 도입을 통한 새로운 기능을 갖춘 신품종 개발 및 우량종묘 생산 등의 목적을 위해 이용되고 있다. 조직배양 기술에 의한 식물체의 재분화의 효율은 식물의 종에 따라 큰 차이를 보이고 동일한 종에서도 품종, 배양조직, 식물생장조절물질의 종류와 농도, 배양 배지에 첨가되는 물질에 따라서 달라진다. *Brassica* 속의 조직배양에 관한 연구는 cotyledons (Sharma et al. 1990; Hachey et al. 1991; Ono et al. 1994), hypocotyls (Yang et al. 1991), peduncle (Eapen and George 1997), leaves (Radke et al. 1988), roots (Xu et al. 1982) 그리고 protoplasts (Glimelius 1984; Spangenberg et al.

**Table 1** Characteristic of cultivars of oilseed rape plants (*Brassica napus* L.)

Cultivars	Breeding Year	Height (cm)	Output (kg/10a)	Oil (%)	Oleic acid (%)	Erucic acid (%)	Glucosinolate (%)
Yodal	1969	148	242	45.0	10	56	11.12
Neahan	1980	146	275	43.0	59	0	1.03
Youngsan	1980	143	289	43.9	69	0	0.42
Chungpoong	1983	183	412	44.5	65	0	1.79
Halla	1985	157	279	45.0	65	0	1.51
Tamla	1991	156	300	45.6	56	0	2.69
Tammi	1996	125	287	45.2	62	0	2.30

1986; Hu et al. 1999) 등의 다양한 조직을 통해서 식물체 재분화에 관한 연구가 보고된 바 있다. 그 결과를 살펴보면 ‘*Brassica. oleracea subsp. italica*’에서 재분화율이 96.7%로 나타났으며 (Ravanfar et al. 2009), ‘*Brassica. campestris* cv. M81’에서 재분화율이 16%로 보고된 바 있다 (Miyasaka and Fujii 1999). *Brassica. juncea*에서는 7.1%의 재분화율을 보였다 (Bano et al. 2010). 그러나 Miyasaka and Fujii (1999)에 의하면 *Brassica. campestris*에서 재분화 빈도가 70~100%로 보고된 바 있는데 ‘*Brassica. campestris* cv. M81’과 ‘CR shinrei’를 이용하여 연구하여 본 결과 그것은 재분화 초기 상태의 유묘 상태를 말하는 것으로 추측된다고 보고하였다. 그러므로 shoot 재분화 뿐만 아니라 증식체계를 위한 방법의 개발이 필요하다 (Hachev et al. 1991; Takasaki et al. 1996).

최근 보고된 유채의 조직배양 연구 결과는 Table 2에 간략히 정리하였다. 절편체로는 주로 배축 (hypocotyl)과 자엽 (cotyledon), 소포자 (microspore)에서 유도한 배를 이용하며 캘러스생성을 거치거나 직접 신초를 유도하는 방법을 이용한다. 유채의 성공적인 조직배양체계를 확립하기 위해서는 먼저 품종별 그리고 적합한 절편체의 선택이 중요하다. 현재까지는 주로 자엽과 배축을 이용하여 캘러스발생과 재분화율에 관한 연구가 진행되었으며 canola의 ‘Sarigol’, ‘Quantum’, ‘Option 500’의 재분화 효율 비교 실험 결과 각 품종의 자엽을 이용하는 것이 배축을 이용하는 것보다 재분화 효율이 높았고, ‘Quantum’에서의 경우 배축을 이용할 경우 재분화율이 31.3% 였지만 자엽을 이용할 경우 68.8% 로서 배축을 이용한 경우보다 높게 나타났다 (Kamal et al. 2007). 그리고 Khan et al. (2010)은 ‘Star’, ‘Westar’, ‘Cyclone’ 품종에서도 자엽을 이용하는 것이 캘러스 발생에 더욱 효과적이라고 보고하였으며 Uliiaie et al. (2008)도 겨울 유채품종인 ‘PF’, ‘Orient’, ‘SLM’, ‘Cobra’, ‘Okpi’의 자엽을 이용하여 재분화 효율이 ‘PF’에서 최고 79% 까지 나타났다고 보고하였다. 그러나 Burbulis et al. (2008)은 봄 품종인 ‘NL-611’, ‘NL-685’의 조직배양시 캘러스 형성률은 배축에서 최고 100%, 자엽의 경우 84.4%를 보여 배축이 자엽보다 캘러스 형성률이 좋았지만 발생한 캘러스의 타입에는 차이가 없었으며 재분화율은 자엽에서 37.5%로 배축 (25.7%)보다 높은 효율을 보였다고 보고하였다.

이외에도 유채의 재분화율을 높이기 위해 품종과 절편체에 적합한 호르몬의 사용에 관한 연구들이 진행되었으며 주로 옥신류 (auxin)와 사이토키닌 (cytokinin)의 혼용처리를 이용하였다. Khan et al. (2002)은 카놀라 품종의 배축에 NAA와 BA, GA3을 혼용 처리하여 96%의 높은 재분화율을 보고하였다. 또한 BA가 재분화에 미치는 영향을 확인하기 위해 ‘Tori-7’, ‘Sampad’, ‘Kallyania’, ‘BARI Sarisha-7’, ‘BARI Sarisha-8’, ‘MM 20-3’의 배발생캘러스를 유도

**Table 2** A wide range of regeneration efficiency in *Brassica napus* L.

Explants	Cultivar	R.E.*(%)	References
Hypocotyl	Canola	96.0	Khan et al. (2002)
Hypocotyl	SLM 460	32.8	Jonoubi et al. (2004)
Hypocotyl, cotyledon	Cyclone	78.0	Ali et al. (2007)
	Star	82.0	
	Westar	67.0	
Hypocotyl, cotyledon, root	Sarigol	51.6	Kamal et al. (2007)
	Quantum	68.8	
	Option 500	62.5	
Hypocotyl, cotyledon	NL-611	21.2	Burbulis et al. (2008)
	NL-662	25.6	
	NL-685	13.1	
Thin cell layer (derived hypocotyl and cotyledon)	Jumbo	46.7	Ghnaya et al. (2008)
	Drakkar	32.2	
	Pactol	11.0	
Microspore	Cossair	6.0	Haddadi et al. (2008)
	PF704	68.0	
Hypocotyls	Dunkeld	41.7	Munir et al. (2008)
	Oscar	70.8	
	Rainbow	45.8	
Cotyledon	PF	79.0	Uliiaie et al. (2008)
	Cobra	18.0	
	Okpi	7.0	
Stem	Siska	87.3	Burbulis et al. (2009)
	Insider	86.7	
	Casina	28.0	
Hypocotyls	JW celsius	24.0	Khan et al. (2010)
	Liprima	40.7	
	Cyclone	5.0	
Cotyledons	Star	29.0	Khan et al. (2010)
	Westar	8.7	
	Cyclone	20.0	
	Star	15.5	
	Westar	3.2	

\*Regeneration efficiency (%)

한 후 BA 농도별 재분화 효율을 비교한 결과 ‘Tori-7’이 91.4%로 가장 높은 캘러스 형성율을 나타냈고 발생한 캘러스들은 BA 농도가 증가함에 따라 재분화효율도 증가하는 모습을 보여 BA 처리가 캘러스와 신초형성에 영향을 미친다고 보고하였다 (Khan et al. 2009a). 이외에도 TDZ (thidiazuron)와 BA의 혼용처리의 효과를 확인하기 위해 ‘SLM 640’ 품종의 배축을 이용하여 실험을 진행한 결과 32.8%의 재분화 효율을 보였다고 보고하였다 (Jonoubi et al. 2004). 재분화 효율을 높이기 위해 ABA 처리에 관한 연구도 진행되었으며 Kamal et al. (2007)은 ‘Quantum’ 품종의 자엽을 이용한 재분화시 ABA를 첨가하였을 경우 재분화율이 68.8%에서 100%로 향상되었다고 보고하였다. 이전 연구결과에서도 확인할 수 있듯이 유체의 조직 배양은 품종에 따른 절편체와 호르몬 조성 등의 최적화된 조직배양 체계가 필요하다고 판단된다.

### 형질전환방법

형질전환법은 주로 particle bombardment를 이용한 유전자를 직접적으로 도입하는 방법이나 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환법등을 토대로 하여 형질전환의 효율을 극대화시키는 방법을 개발하는 방향으로 이루어져 왔다 (Table 3). 그 중 *Agrobacterium*을 매개로 한 형질전환방법이 많이 이용되며, 절편체의 종류에 따라서 다양하게 연구가 진행되었다. 하배축을 이용한 형질전환에서 ‘*Brassica napus* cv. westar’를 사용하여 두 가지의 *GFP* 유전자와 *npt II*를 도입한 형질전환체를 제작하여 *GFP* 유전자에서 각각 17%, 25%의 형질전환효율을 보였으며 (Cardoza and Stewart 2003), 또 다른 연구결과에서는 ‘*Brassica napus* cv. PF7045/91’을 사용하여 GUS 유전자와 *npt II*를 도입한 형질전환체를 생산하고 11.8%의 형질전환 효율을 보고하

였다 (Jonoubi et al. 2005). ‘*Brassica napus* cv. Sarow-4’, ‘Semu-249’에 GUS 유전자와 *npt II*가 도입된 형질전환체 제작이 이루어졌으며 이 두 가지 품종에서 각각 31%, 27%의 형질전환효율을 보였다 (Moghaieb et al. 2006). Wang et al. (2005)의 연구에서는 엽육조직에서 원형질체를 분리하여 ‘*Brassica napus* cv. maplus’ 품종에서 *npt II*와 *KCS* 유전자를 도입하였고, 3개의 independent 형질전환 계통을 확인하였다. 식물의 형질전환 선발마커로 다양한 항생제 저항성 유전자를 이용하는데 위의 논문 결과들을 분석해보면 kanamycin에 저항성을 갖게 하는 neomycin phosphotransferase II (*npt II*)를 주로 사용하였다. 그 외에도 다른 절편체를 이용한 형질전환효율을 증대시키기 위한 여러 연구그룹에서 보고가 있었으나, 형질전환 방법의 기본조건은 비슷하였다. 그러나, 세부적으로는 유체의 품종이나 selection marker, 배양조건 및 배지조성 등에서 차이가 있었다 (Damgaard et al. 1997; Haddad et al. 2002; Khan et al. 2009b; Kong et al. 2009).

현재까지 보고된 유체의 hypocotyls을 이용하여 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 과정을 간단히 살펴보면, 소독된 성숙 종자로부터 호르몬을 첨가한 callus 유도 배지에서 전처리 기간을 통해 callus를 유도한다. 그리고 일정한 전처리 기간이 진행된 후에 *Agrobacterium* 용액에 접종하여 공동배양 시킨다. 이후 항생제가 함유된 배지에서 배양하여 재분화를 유도한다. 유도된 shoot는 발근배지로 옮겨 생육시킨다 (Cardoza and Stewart 2003; Jonoubi et al. 2005; Khan et al. 2009a). 상기 내용들을 토대로 형질전환 과정에서 중요하다고 여겨지는 과정들을 보면, 첫 번째로 캘러스를 유도하기 위한 호르몬 처리방식에 따른 배지조성의 비율이다. 다른 논문에서 배지조성을 보면 2,4-D의 단독처리 (Cardoza and Stewart 2003), 2,4-D와 BA의 혼용처리 (Moghaieb et al. 2006) 등을 이용하고 있으며

**Table 3** Genetic transformation of oilseed rape plants (*Brassica napus* L.)

Explants	Transgenes	Method	T.E.*(%)	References
Hypocotyl	gfp	<i>Agrobacterium</i>	25.0	Cardoza and Stewart(2003)
Hypocotyl	<i>npt II</i> , <i>gusA</i>	<i>Agrobacterium</i>	11.8	Jonoubi et al.(2005)
Protoplast	<i>npt II</i> , <i>KCS</i>	<i>Agrobacterium</i>	3.9	Wang et al.(2005)
Hypocotyl	<i>npt II</i> , <i>gusA</i>	<i>Agrobacterium</i>	31.0	Moghaieb et al.(2006)
Microspore	<i>bar</i> , <i>gusA</i>	<i>Agrobacterium</i>	4.5	Cegielska-Taras et al.(2008)
Petiole	<i>npt II</i> , <i>gusA</i>	<i>Agrobacterium</i>	1.7	Khan et al. (2009a)
Seed	<i>npt II</i> , <i>gusA</i> , ChIFN- $\alpha$	<i>Agrobacterium</i>	16.0	Li et al.(2009)
Embryogenesis	<i>bar</i> , <i>gusA</i>	Biolistics	-	Abdollahi et al.(2009a)
Microspore	<i>bar</i> , <i>gusA</i>	Biolistics	15.5	Abdollahi et al.(2010)
Cotyledon	<i>aadA</i> , TrnI-TrnA	Biolistics	23.0	Cheng et al.(2010)
Embryogenesis	<i>gusA</i>	<i>Agrobacterium</i> , Biolistics	-	Abdollahi et al.(2009b)

\*Transformation efficiency

각각 다른 호르몬 구성에 의해 유도된 캘러스와 재분화율은 조직배양에서 품종에 따라서 효율이 달라지는 것으로 보고되어 그 품종에 맞게 사용해야 할 것으로 여겨진다 (Ali et al. 2007). 두 번째로 *Agrobacterium* 접종 전의 전처

리 단계와 접종 후 공동배양 단계가 형질전환에 중요한 영향을 미치는 것으로 여겨진다. Cardoza and Stewart (2003) 은 전처리 기간과 공동배양의 기간에 따라서 형질전환 효율이 달라졌음이 보고하였다. 마지막으로 공동배

**Table 4** Comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions for rapeseed plant

Cultivar	Bade et al. (2001)	Konkuk univeristy	Kim et al. (2010)
	Westar	Yung-san	Nae-han, Young-san, Tam-mi, Halla
Basal medium	MS (inculding B5), pH 5.8 +3% sucrose +0.05% MES	MS (inculding B5), pH 5.8 +3% sucrose +0.05% MES	MS +2% sucrose
Germination Medium(GEM)	MS (inculding B5), pH 5.8 +2% sucrose +0.05% MES +0.8% Agar	MS (inculding B5), pH 5.8 +2% sucrose +0.05% MES +0.8% Agar	
Callus induction medium(CIM)	MS (inculding B5), pH 5.8 +3% sucrose +0.05% MES +1 mg/L 2,4-D +1 mg/L kinetin + 0.8% Agar	MS (inculding B5), pH 5.8 +3% sucrose +0.05% MES +1 mg/L 2,4-D +0.2 mg/L BAP + 0.8% Agar	MS +2% sucrose +0.4% Phytigel +0.75 mg/L BAP +5 mg/L AgNO <sup>3</sup> +0.2 mg/L NAA +0.01 mg/L GA <sub>3</sub>
pre-culture medium	Same as CIM	Same as CIM	-
<i>Agrobacterium</i> infection	BM	BM +100μM AS	MS +2% sucrose
co-cultivation	CIM	CIM +100μM AS	CIM
Washing medium	MS (inculding B5), pH 5.8 +3% sucrose +0.05% MES +500 mg/L cb	MS (inculding B5), pH 5.8 +3% sucrose +0.5 mg/L BAP +250, 500 mg/L cef	-
Selection and shoot induction medium SIM	MS (inculding B5), pH 5.8 +3% sucrose +0.05% MES +0.8% Agar +2 mg/L BAP +5 mg/L AgNO <sup>3</sup> +0.5 mg/L ZR +0.01 mg/L GA <sub>3</sub> +500 mg/L cb	MS (inculding B5), pH 5.8 +3% sucrose +0.05% MES +0.8% Agar +2 mg/L BAP +5 mg/L AgNO <sup>3</sup> +0.5 mg/L ZR +0.01 mg/L GA <sub>3</sub> +500 mg cef	MS +2% sucrose +0.4% Phytigel +3 mg/L BAP +5 mg/L AgNO <sup>3</sup> +0.2 mg/L NAA +0.01 mg/L GA <sub>3</sub> +500 mg cb
Shoot elongation medium SEM	1/2 MS (inculding B5), pH 5.8 +3% sucrose +0.05% MES +0.8% Agar +100 mg cef +50 mg vancomycin	1/2 MS (inculding B5), pH 5.8 +3% sucrose +0.05% MES +0.05 mg/L NAA +0.8% Agar +100 mg cef	-
Rooting medium	1/2 MS (inculding B5), pH 5.8 +3% sucrose +0.05% MES +0.01 mg/L IBA +0.8% Agar	Same as SEM	1/2 MS +2% sucrose +1 mg/L IBA +0.4% Phytigel

MES: 2-(n-morpholino) ethaneslfonic acid; IBA: Indole-3-butyric acid; AgNO<sup>3</sup>: Silver nitrate, BAP: 6-benzylaminopurine, 2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, GA<sub>3</sub>: Gilberellic acid, Cb: Carbenicillin, Cef: Cefotaxime, NAA: α-Naphthaleneacetic acid, ZR: Zeatin

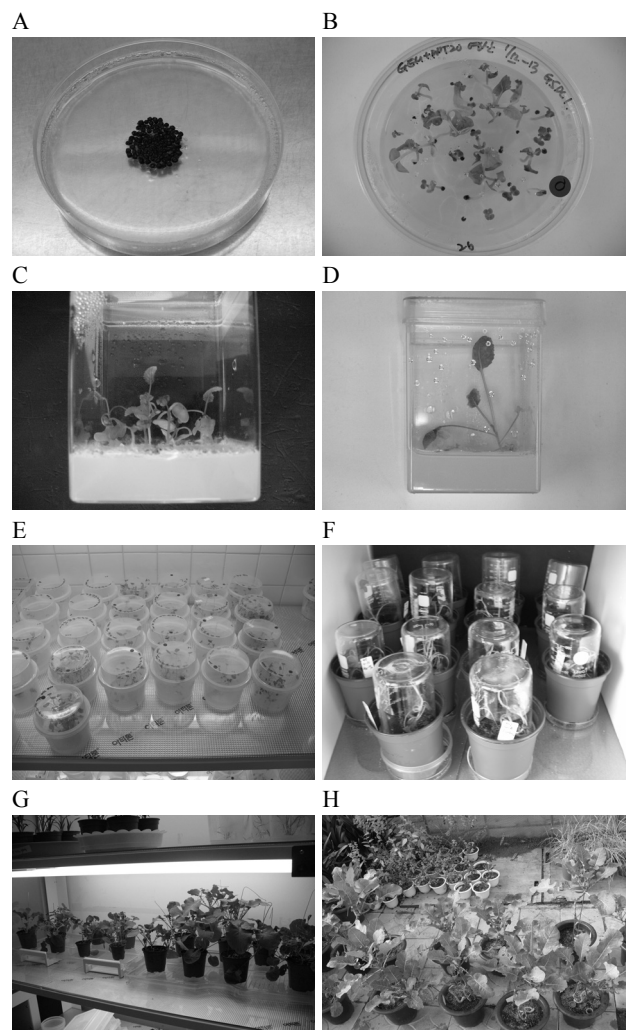
양 후 유전자가 도입된 캘러스를 선별하는 과정에 중요한 것으로 파악되었다. 이 과정은 형질전환된 캘러스에서 저항성유전자가 들어간 shoot의 재분화를 유도하기 위해서 제초제나 항생제가 포함된 배지에서 선별하는 것으로 여러 항생제 농도를 사용하였을 때 형질전환체 효율이 달라지는 결과를 보였다. 따라서 이러한 조건들이 각각의 품종에 맞게 최적화되면 유체의 형질전환의 효율이 증가할 것으로 여겨진다. 이렇게 형질전환방법의 확립이 이루어지면서 다양한 유용한 유전자들이 도입된 유체 형질전환체가 *Agrobacterium* 형질전환법을 이용하여 개발되었다 (Wang et al. 2005). 개발된 형질전환 시스템 식물체의 형질전환법의 확립과 형질전환체 생산을 위한 시간의 단축 이렇게 두 가지 기능의 향상을 목적으로 두고 실험되었다. 그렇기 때문에 형질전환체 제작을 위한 기간 또한 중요하게 봐야할 필요가 있다. Jonoubi et al. (2005)의 연구에서는 형질전환체를 얻어내기까지 절편체를 기점으로 하여 온실로 보내기까지 약 3개월이 소요되었으며, Moghaieb et al. (2006)는 절편체를 기점으로 하여 shoot가 재분화가 발생할때까지 약 1.5 개월의 기간이 필요하였다. Wang et al. (2005)의 연구에서는 약 3.5개월 걸려 형질전환체가 생산되었다. 앞의 연구를 토대로 유체의 형질전환체를 제작하기 위한 기간으로 대략 shoot의 재분화까지는 1.5개월 그리고 온실까지는 3개월 정도 걸리는 것으로 판단된다.

#### 국내 제초제 저항성 유체 연구 현황

대두와 팥에 버금가는 유지작물인 유채는 종자에 약 40%의 기름을 함유하고 착유율은 35~38% 이상으로 매우 높은 편으로 바이오디젤 원료용 작물로 국내에서 그 관심이 증가하고 있다. 국내 유채 형질전환 연구현황은 Kim et al. (2010)이 제초제 저항성을 가지는 유채를 개발한 것을 처음 보고하였으며 그 내용을 간략히 보면 먼저 바이오에너지 작물로 적합한 품종을 선정하기 위하여 내한, 영산, 탐미, 한라의 4가지 품종별 종자의 올레인산 함량을 측정하고 한라 품종에서 가장 높은 함유율을 보였다. 형질전환을 위해 종자에서 발아한 자엽을 이용하여 *Phosphinothricin acetyltransferase* (PAT) 유전자를 포함하는 pCambia3301 벡터가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 균주를 이용하였다. *A.tumefaciens* 접종 후 *Phosphinothricin* (PPT)을 첨가하지 않고 500 mg/L carbenicillin만 첨가한 배지에서 캘러스를 유도한 후 4 mg/L PPT가 첨가된 배지에서 shoot를 유도하였다. 발생한 shoot만을 절단하여 8 mg/L PPT가 첨가된 배지에서 뿌리를 유도한 후 발근한 개체는 순화를 실시하였다. 실험결과 품종별 전체 발생한 캘러스 중 PPT 저항성을 가지는 캘러스 형성률은 한라 품종에서 68.8%로 가장 높았으며 PPT 저항

성과 GUS 발현을 통하여 확인된 한라품종의 형질전환 효율은 약 10.4%로 나타났다. 국내에서 보고된 이전 연구에서는 유체의 자엽을 이용한 형질전환 실험 시 절편체당 shoot 발생효율이 17.5%이며 (Kim et al. 1997) 이전연구와 서로 다른 형질전환 효율이 나타난 이유는 사용한 품종 (내한, 한라)과 선발마커 (NPT II, PAT)의 차이에서 비롯된 것이라고 보고하였다.

본 연구진은 particle bombardment와 *Agrobacterium* 매개 형질전환법을 이용하여 생산성증대 유체 식물체를 획득하였다. Particle bombardment를 이용한 형질전환법은 Fig. 1과 같으며 절편체를 직경 2cm의 원으로 치상한 후 수량



**Fig. 1** Process of transgenic plants in ‘Young-san’ seeds using PDS-1000/He

- A. Preparation of explants for bombardment (diameter 2cm),
- B. Survived plants on PPT 20mg/L after 4 weeks,
- C. Survived plants on selection medium after 6 weeks,
- D. Putative transgenic plants growth on PPT 5mg/L medium,
- E. Rooting of transgenic plants,
- F. Acclimatization of transgenic plants,
- G. Growth of transgenic plants after acclimatization,
- H. Growth of transgenic plants in the green house

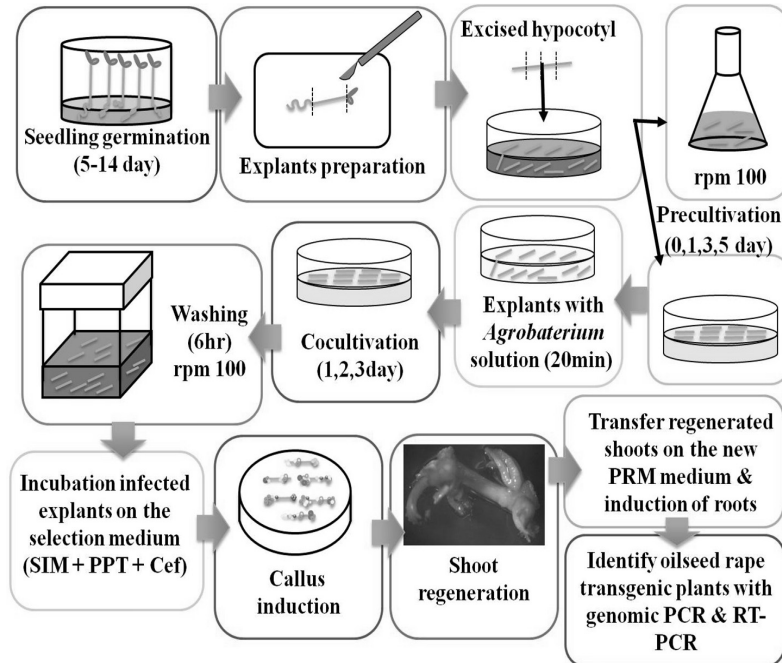


Fig. 2 General process of *Agrobacterium*-mediated transformation system for oilseed rape plants (*Brassica napus* L. “Young-san”)

중대유전자가 도입된 골드입자를 이용하여 PDS-1000/He (Bio-Rad, Hercules, USA)을 이용하여 형질전환을 실시하였다. 1일간 휴식처리 후 선발배지로 옮겨 선발을 실시하였다. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환은 절편체를 *Agrobacterium* 접종액에 20분간 처리 후 3일간 공동배양을 실시하였다. 이후 cefotaxime을 첨가한 액체 MS배지에 2회 수세 후 선발배지로 옮겨 선발하였다. 선발에서 생존한 개체들은 순화를 실시하였다. 본 연구진에서는 절편체의 종류에 따라 형질전환을 획득하는 기간에서 차이를 보였는데 종자의 경우 순화한 형질전환체를 획득하기까지 약 3개월의 기간이 소요되었다. 그러나 배축을 이용한 실험의 경우 절편체의 준비 (5~14일), 전처리 (5~8일)와 shoot 유도 (4~8주) 및 신장 (4주), 발근 (4주) 등 여러 단계를 거쳐 순화 식물체를 획득하기까지 약 5개월의 기간이 소요되어 종자를 절편체로 이용한 경우보다 오랜 기간이 소요되었다 (Fig. 2). 향후 보다 효율적인 형질전환 체계 확립을 통하여 생산성 및 유지함량 증대 또는 복합환경저항성 등의 유용 형질을 가지는 유채 품종개발이 가까운 미래에 이루어질 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원 농림기술개발사업 (과제번호: 109166-03-2-HD120) 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

배정환 (2006) 바이오연료의 보급전망과 사회적 비용·편익 분석. 에너지경제연구원 수시연구보고서 06-04  
 원두환 (2008) 바이오에너지산업 육성을 통한 FTA 대응 전략 연구-바이오연료의 비시장가치 평가-. 에너지경제연구원 기술연구보고서 08-16  
 Abdollahi MR, Moieni A, Mousavi A, Salmanian AH (2010) High frequency production of rapeseed transgenic plants via combination of microprojectile bombardment and secondary embryogenesis of microspore-derived embryos. Mol Biol Rep 10.1007/s11033-010-0158-3  
 Abdollahi MR, Moieni A, Salmanian AH, Mousavi A (2009a) Secondary embryogenesis and transient expression of the  $\beta$ -glucuronidase gene in hypocotyls of rapeseed microspore-derived embryos. Biologia Plantarum 53(3): 573-577  
 Abdollahi MR, Corral-Martinez P, Mousavi A, Salmanian AH, Moieni A, Segui-Simarro JM (2009b) An efficient methods for transformation of pre-androgenic, isolated *Brassica napus* microspores involving microprojectile bombardment and *Agrobacterium*-mediated transformation. Acta Physiol Plant 31:1313-1317  
 Ali H, Ali Z, Ali H, Mehmood S, Ali W (2007) *In vitro* regeneration of *Brassica napus* L. cultivars (Star, Cyclo-neand Westar) from hypocotyls and cotyledonary leaves. Pak J Bot 39(4):1251-1256  
 Bade JB (2001) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Brassica napus*. Ph. d thesis, Leiden University, The Netherlands

- Bano R, Khan MH, Khan RS, Hamid Rashid, Zahoor A Swati (2010) Development of an efficient regeneration protocol for three genotypes of *Brassica Juncea* L. Pak J Bot 42(2):963-969
- Burbulis N, Kupriene R, Blistrubiene A (2008) Callus induction and plant regeneration from somatic tissue in spring rapeseed (*Brassica napus* L.). Biologia Plantarum 54(4) 258-263
- Burbulis N, Blinstrubiene A, Kupriene R, Jonytiene V, Rugienius R, Staninen G (2009) *In vitro* regeneration of *Brassica napus* L. shoots from hypocotyls and stem segments. Zemdirbyste Agri 96(3):176-185
- Cardoza V, Stewart CN (2003) Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants. Plant Cell Rep 21:599-604
- Cegielska-Taras T, Pniewski T, Szala L (2008) Transformation of microspore-derived embryos of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) by using *Agrobacterium tumefaciens*. J Appl Genet 49(4):343-347
- Cheng L, Li HP, Qu B, Huang T, Tu JX, Fu TD, Liao YC (2010) Chloroplast transformation of rapeseed (*Brassica napus*) by particle bombardment of cotyledons. Plant Cell Rep 29(4):371-381
- Chung JH, Kwon KS, Jang HS (2008) Development of transportation bio-energy and its future. Kor J Microbiol Biotechnol 36(1):1-5
- Damgaard O, Jensen LH, Rasmussen OS (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Brassica napus* winter cultivars. Transgenic Res 6:279-288
- Eapen S and George L (1997) Plant regeneration from peduncle segments of oil seed *Brassica* species: influence of silver nitrate and silver thiosulfate. Plant Cell Tiss Org Cult 51:229-232
- Ghnaya AB, G Charles, M Branchard (2008) Rapid shoot regeneration from thin cell layer explants excised from prtioles and hypocotyls in four cultivars of *Brassica napus* L. Plant Cell Tiss Org Cult 92:25-30
- Glimelius K (1984) High growth rate and regeneration capacity of hypocotyls protoplasts in some *Brassicaceae*. Physiol Plant 61:38-44
- Hachey JE, Sharma KK, Moloney MM (1991) Efficient shoot regeneration of *Brassica campestris* using cotyledon explants cultured *in vitro*. Plant Cell Rep 9:549-554
- Haddad R, Morris K, Wollaston VB (2002) Regeneration and transformation of oilseed (*Brassica napus*) using CaMV35S promoter- $\beta$ -glucuronidase gene. J Agric Sci Technol 4: 151-160
- Haddadi P, A Moieni, G Karimzadeh, MR Abdollahi (2008) Effect of gibberellin, abscisic acid and embryo desiccation on normal plantlet regeneration, secondary embryogenesis and callogenesis in microspore culture of *Brassica napus* L. cv. PF<sub>704</sub>. Intl J of Plant Prod 2:153-162
- Hill, J, Nelson E, Tillman D, Polasky S, Tiffany D (2006) Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. Proc Natl Acad Soc USA 103:11206-11210.
- Hu Q, Anderson SB, Hansen LN (1999) Plant regeneration capacity of mesophyll protoplasts from *Brassica napus* and related species. Plant Cell Tiss Organ Cult 59:189-196
- Jonoubi P, Mousavi A, Majd A, Daneshian J (2004) Improved *Brassica napus* L. regeneration from hypocotyls using thidiazuron and benzyladenine as cytokinin sources. Pak J Bot 36(2):321-329
- Jonoubi P, Mousavi A, Majd A, Salmanian AH, Javaran MJ, Daneshian J (2005) Efficient regeneration of *Brassica napus* L. hypocotyls and genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. Biologia Plantarum 49(2):175-180
- Kamal GB, Llich KG, Asadollah A (2007) Effect of genotype, explant type nutrient medium components on canola (*Brassica napus* L.) shoot *in vitro* organogenesis. Afr J of Biotechnol 6(7):861-867
- Khan MR, Rashid H, Quraishi A (2002) High frequency shoot regeneration from hypocotyl of Canola(*Brassica napus* L.) cv. Dunkled. Plant Tiss Cult 12(2):131-138
- Khan I, Ali W, Takar ZA, Frooqi A, Sikandar, Akhtar W (2010) Increased regeneration efficiency of *Brassica napus* L. cultivars Star, Westar and Cyclone from hypocotyle and cotyledonary explants. Nature Precedings: hdl:10101/npre.2010.4781.1:Posted 17 Aug 2010
- Khan MMA, Hassan L, Ahmad SD, Shah AH, Batool F (2009a) *In vitro* regeneration potentiality of oil seed *Brassica* genotypes with differential BAP concentration. Pak J Bot 41(3):1233-1239
- Khan MA, Arif Hasan Khan Robin ABM, Nazim-Ud-Dowla MAN, Talukder SK, Hassan L (2009b) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of two varieties of *Brassica*: Optimization of protocol. Bangladesh J Agril Res 34(2):287-301
- Kim CS and Lee SH (2006) Economic analysis of a Rape production for Biodiesel. Kor J of Org Agri 14(3):237-249
- Kim HJ, Lee HJ, Go YS, Roh KH, Lee, YH, Jang YS, Suh MC (2010) Development of herbicide-tolerant Korean rapeseed(*Brassica napus* L.) cultivars. J Plant Biotechnol 37:319-326
- Kim KM, Shon JK, Chung JD (1997) Transformation *Brassica napus* via *Agrobacterium* vector : plant regeneration and progeny analysis. Kor Plant Tissue Culture 24:269-272
- Kong F, Li J, Tan X, Zhang L, Zhang Z, Qi C, Ma X (2009) A new time-saving transformation system for *Brassica napus*. Afr. J. Biotechnol. 8(11):2497-2502
- Lee YJ and Kim GC (2002) The state of the art of biodiesel as a clean diesel alternative. KIER
- Li S, Zhao D, Wu YJ, Tian X (2009) A simplified seed transformation methods for obtaining transgenic *Brassica napus* plants. Agri Sci in China 8(6):658-663
- Miyasaka Y, Fujii T (1999) Shoot regeneration from explants of seedstalk developed *in vitro* in Chinese cabbage.



- Plant Biotechnol 16(2):163-166
- Moghaieb REA, El-Awady MA, El Mergawy RG, Youssef SS, El-Sharkawy AM (2006) A reproducible protocol for regeneration and transformation in canola (*Brassica napus* L.). Afr J Biotechnol 5(2):143-148
- Munir M, Rashid H, Rauf M, Chaudhry Z, Bukhari MS (2008) Callus formation and plantlets regeneration from hypocotyl of *Brassica napus* by using different media combinations. Pak J Bot 40(1):309-315
- Ono Y, Takahata Y, Kaizuma N (1994) Effect of genotype on shoot regeneration from cotyledonary explants of rapeseed (*Brassica napus* L.). Plant Cell Rep 14:13-17
- Radke SE, Andrews BM, Moloney MM, Crouch ML, Krid JC, Knauf VC (1988) Transformation of *Brassica napus* L. using *Agrobacterium tumefaciens*: developmentally regulated expression of an introduced nap-1 gene. Theor Appl Genet 75:685-694
- Ravanfar SA, Aziz MA, Kadir MA, Rashid AA, Sirchi MHT (2009) Plant regeneration of *Brassica oleracea* subsp. *italica* (Broccoli) CV Green Marvelas affected by plant growth regulator. Afr J Biotechnol 8(11):2523-2528
- Sharma KK, Bhojwani SS, Thorpe TA (1990) Factors affecting high frequency differentiation of shoots from cotyledon explants of *Brassica juncea* (L.) Czern. Plant Sci 66:247-253
- Spangenberg, Koop GHU, Lichter R, Schweiger HG (1986) Microculture of single protoplasts of *Brassica napus*. Physiol Plant 66:1-8
- Takasaki T, Hatakeyama K, Ojima K, Watanabe M, Toriyama K, Hinata K (1996) Effects of various factors (hormone combinations, genotypes and antibiotics) on shoot regeneration from cotyledon explants in *Brassica rapa* L. Plant Tiss Cult Lett 13:177-180
- Uliaie ED, Farsi M, Ghreyazie B, Imani J (2008) Effect of genotype and AgNO<sub>3</sub> on shoot regeneration in winter cultivars of rapeseed (*Brassica napus*). Pak J Biol Sci 11(16):2040-2043
- Wang YP, Sonntag K, Rudloff E, Han J (2005) Production of fertile transformation *Brassica napus* by *Agrobacterium*-mediated transformation of protoplasts. Plant Breed 124:1-4
- Xu ZH, Davey MR, Cocking EC (1982) Plant regeneration from root protoplasts of *Brassica*. Plant Sci Lett 24:117-121
- Yang MZ, Jia SR, Pua EC (1991) High frequency of plant regeneration from hypocotyl explants of *Brassica carinata* A. Br. Plant Cell Tiss Org Cult 24:79-82