

한국 고유의 품종을 이용한 제초제 저항성 유채 개발

김효진 · 이혜진 · 고영삼 · 노경희 · 이영화 · 장영석 · 서미정

Development of herbicide-tolerant Korean rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars

Hyojin Kim · HyeJin Lee · Young Sam Go · Kyung Hee Roh · Young-Hwa Lee · Young-Seok Jang · Mi Chung Suh

Received: 31 August 2010 / Accepted: 3 September 2010
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract An interest in the production of seed-oil based fuel and raw materials, which comes from renewable plant sources, has been intrigued by the phenomenon of global warming and shortage of fossil fuels. Rapeseed (*Brassica napus*) is the most important oilseed crop, which produces seeds with 40% oil. It is desirable to develop genetically modified rapeseed producing oils, which can be easily converted to biodiesel. As an initial step for development of genetically modified rapeseed for the production of biofuels or bio-based materials, Korean rapeseed cultivars, Naehan, Youngsan, Tammi and Halla, were analyzed. Four Korean rapeseed cultivars produce 32 to 40% oil of seed dry weight, which is rich in oleic acid (more than 60 mole%). The cotyledonary petioles

of rapeseed cultivar, Halla, were transformed using *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101, carrying the *uidA* gene encoding β -glucuronidase (*GUS*) as a reporter gene and the *phosphinothricin acetyltransferase* (*PAT*) gene as a selectable marker. The stable integration of *PAT* gene in the genome of transgenic rapeseeds was confirmed by PCR analysis. Expression of *uidA* gene in various rapeseed organs was determined by fluorometric assay and histochemical staining. Transformation efficiency of a Korean rapeseed Halla cultivar was 10.4%. Genetic inheritance of transgenes was confirmed in T₂ generation.

서론

식물 종자 오일은 인류와 동물의 식량 자원으로서 중요할 뿐만 아니라 페인트, 플라스틱, 고급윤활제 등 산업 원료로 다양하게 이용된다 (Ohlrogge 1994). 고등식물에서 지방산의 생합성은 fatty acid synthase complex에 의해 plastid에서 이루어진다. Malonyl-ACP를 전구체로 이용하여 2개의 탄소 unit가 acyl carrier protein (ACP)에 에스테르화된 acyl chain이 더해져 16:0-ACP나 18:0-ACP로 합성되고, 18:0-ACP는 stearoyl-ACP desaturase에 의해 18:1^{Δ9}-ACP로 전환된다. 이렇게 생합성된 지방산 (16:0, 18:0과 18:1^{Δ9})의 일부는 acyl-ACP thioesterase에 의해 가수분해되어 세포질로 내보내진다. 이들 지방산은 소포체 막에 존재하고 있는 fatty acid desaturase에 의해 더욱 불포화되어 발달하는 종자에서는 글리세롤에 에스테르 반응 (esterification)을 통해 triacylglycerol (TAG) 형태로 저장된다 (Somerville et al. 2000). 종자에 저장된 TAG를 추출하여 deesterification

H. J. Kim · H. J. Lee · M. C. Suh (✉)
전남대학교 바이오에너지공학과
(Department of Bioenergy Science & Technology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea)
e-mail: mcsuh@chonnam.ac.kr

Y. S. Go
전남대학교 식물생명공학부
(Department of Plant Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea)

K. H. Roh
농촌진흥청 국립농업과학원
(National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea)

Y.-H. Lee · Y.-S. Jang
농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물센터
(Bioenergy Crop Research Center and National Institute of Crop Science, Rural Development Administration, Muan 534-833, Korea)

반응을 수행하면, 글리세롤과 지방산 메틸에스터 (fatty acid methylester, FAME)가 생성되며, 지방산 메틸에스터는 바이오디젤의 원료로 사용될 수 있다 (Durrett et al., 2008).

유채 (*Brassica napus* L.)는 배추과 (*Brassica*)에 속하는 십자화과 초본식물이고, 대두와 팥에 버금가는 유지작물로 분류된다. 유채 종자는 약 40%의 기름을 보유하고 있는데, 그 착유율은 35~38% 이상으로 매우 높은 편이다. 그러므로 고전 육종 방법을 이용하여 개발된 다양한 유채 품종으로부터 얻어진 종자 오일은 식용과 공업용으로 다양하게 활용되고 있다 (Scarth et al. 1988; Rücker and Röbbelen 1996). 그러나, 육종은 이용 가능한 게놈이 제한되어 있고, 유채에 존재하지 않는 새로운 형질을 도입하는데 비교적 시간이 많이 걸리는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하고자 *Agrobacterium*의 Ti-plasmid를 이용하거나 (Moloney et al. 1989), 벡터를 함유하지 않은 DNA를 소포자에서 유래된 배에 미세주입시키거나 (Neuhaus et al. 1987), 전기천공법으로 플라스미드 DNA를 원형질체에 도입시키는 (Chapel and Glimelius 1990) 방법 등을 이용하여 유채 식물체의 형질전환 연구가 시도되어 왔다. 그러나 현재는 실험의 용이성과 유채 식물체의 재분화능에 기반을 둔 *A. tumefaciens*의 Ti-plasmid를 이용한 형질전환 방법이 일반적으로 이용되고 있다. 또한 Ti-plasmid는 종양 형성에 관여하는 유전자를 제거하고, 선발마커로 항생제에 내성을 갖게 하는 유전자들과 형질전환 여부를 쉽게 확인할 수 있는 리포터 유전자들을 도입한 disarmed Ti-binary vector system이 개발되면서 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 연구가 가속화되었다 (Horsch et al. 1985; Klee and Rogers 1989).

식물의 형질전환 선발마커로는 다양한 항생제 저항성 유전자, kanamycin에 저항성을 갖게 하는 *neomycin phosphotransferase II* (NPTII)와 hygromycin에 저항성을 갖게 하는 *hygromycin phosphotransferase* (HPT) 등과 제초제 저항성 유전자, *phosphinothricin acetyltransferase gene* (PAT) 등이 널리 사용되어 왔다. 특히 국내에서는 제초제 내성을 갖는 들잔디를 개발하여 잡초를 제거하는데 있어 기존 여러 종류의 제초제를 사용하였던 번거로움을 개선할 수 있게 되었고 (Vanjildorj et al. 2008), 국외에서는 대두, 면화, 옥수수, 벼, 유채 등이 개발되었다 (Kita et al. 2009; Kim et al. 2005; Khan and Liu 2009; Zhang et al. 2005).

본 연구에서는 국내에서 바이오에너지의 원료 생산을 위한 유채 형질전환 식물체를 개발하기 위한 기초연구로서 Prem과 Mohan (2008)의 방법을 기초로 하여 한국 고유 유채 품종 한라의 자엽 절편체를 사용하여 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 실험을 수행하였다. 그 결과 제초제에 내성을 가진 한라 유채 품종을 확보하였고, 더불어 바이오디젤 원료 작물로 사용될 형질전환 유채 품종 개발의 응용가능성을 제시하였다.

재료 및 방법

식물재료

유채 (*Brassica napus*)는 내한, 영산, 탐미, 한라 품종을 농촌진흥청 바이오에너지작물센터 (<http://www.nics.go.kr>)로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. 유채 종자는 3일간 4°C에서 저온 처리한 다음, 표면 살균을 위하여 70% ethanol에서 5분간 침지한 후 20% sodium hypochlorite에 20분 동안 처리하였으며, 멸균수로 5~6회 세척하였다. 살균된 종자를 1% sucrose와 0.4% phytagel이 첨가된 1/2 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)에 파종하여 23 ± 1°C 암 조건에서 4일간 배양하였다. 형질전환에 사용된 절편체는 발아한 유채 자엽을 날카로운 칼로 잘라 사용하였다.

형질전환에 사용된 운반체

유채의 형질전환에 사용된 식물 발현용 벡터는 형질전환이 된 박테리아 선별을 위한 *neomycin phosphotransferase* (NPT II) gene, 형질전환이 된 식물체 선별을 위한 제초제 저항성 *phosphinothricin acetyltransferase* (PAT) 유전자 그리고 리포터 (reporter) 유전자로 β -glucuronidase (GUS) 유전자를 함유하는 pCAMBIA3301 벡터 (Fig. 1)를 freeze-thaw 방법을 이용하여 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101에 형질전환하였다 (An 1987). 50 µg/mL rifampicin 과 25 µg/mL kanamycin이 포함된 YEP 고체배지에서 형성된 single colony를 취하여 YEP 액체배지에 접종하고, 28°C 180 rpm의 조건에서 배양하여 *A. tumefaciens*의 농도를 O.D600 = 0.5로 조절하여 형질전환에 사용하였다.

형질전환 및 재분화

유채 형질전환 방법은 Prem과 Mohan (2008)의 방법을 기초로 하여 실험을 수행하였다. 날카로운 칼을 이용하여 유채 1~2 mm의 엽병을 남긴 자엽 절편체를 자른 다음, 준비된 *A. tumefaciens* 용액에 약 30초간 접종시킨 후, 멸균된 여과지에서 과다한 용액을 제거하고, 5 mg/L AgNO₃, 0.75 mg/L BAP, 0.2 mg/L NAA, 0.01 mg/L GA₃가 첨가된 MS배지에서 23 ± 1°C 암 조건에서 2일간 공동 배양하였다. 공동배양을 마친 유채 자엽 절편체는 생장조절제의 조성이 동일하고 500 mg/L carbenicillin 이 첨가된 MS 배지에 옮겨 장일 조건 (16h day/8h dark)에서 캘러스 분화를 유도하였다. 유도된 캘러스는 5 mg/L AgNO₃, 3 mg/L BAP, 0.2 mg/L NAA, 0.01 mg/L GA₃, 500 mg/L carbenicillin, 4 mg/L phosphinothricin 이 첨가된 shoot를 유도하는 배지에 옮겨서 형질전환이 된 캘러스로부터 shoot가 유도되도록 하였다. 2주 정도마다 새로운 shoot 유도배지로 계대배양하

면서 형질전환이 된 shoot만을 절단하여 phosphinothricin 농도가 8 mg/L인 선발배지에서 선발한 후에 1/2 MS 배지에 1mg/L IBA, 500mg/L carbenicillin 가 포함된 뿌리 유도 배지에서 뿌리의 형성을 유도하였다. 뿌리가 발달된 개체는 토양으로 옮겨 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 장일 조건 (16hr day/8hr dark)에서 순화시켰다.

DNA 분리 및 PCR 검증

식물체내의 외래 gene 도입여부를 확인하기 위해 선발 배지에서 재분화된 개체로부터 DNA extraction buffer (Weigel and Glazebrook 2002)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였고, PCR은 premix kit (Intron Co., Korea)를 사용하였다. PAT 유전자에 대한 PCR primer로서 5'-ATGAGCCCAGAACGACGCC-3'는 forward strand용, 5'-TCACATCTCGGTGACGGC-3'는 reverse strand용으로 준비하여 550 bp 크기의 DNA가 증폭되도록 하였다. PCR 반응은 94°C 에서 4분간 최초 변성 후에 94°C 에서 30초, 58°C 에서 30초, 72°C 에서 50초로 총 30회 반응시키고, 마지막 72°C 에서 7분 최종 1회 연장시키는 조건으로 수행하였다. 이렇게 증폭된 PCR 산물은 1% (w/v) agarose 젤에서 전기영동하여 확인하였다.

β -glucuronidase (GUS) 발현 분석

형질전환 식물체에서 GUS 활성을 분석하기 위하여 histochemical staining assay와 fluorometric assay 방법 (Jefferson et al. 1987)을 이용하였다. 선발된 개체에서 잎, 꽃, 종자를 잘라 GUS staining buffer [50 mM NaH_2PO_4 (pH7.0), 10 mM Na_2EDTA , 0.5 mM potassium ferrocyanide, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.1% (v/v) Triton X-100 and 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide (Gold Bio Technology, Inc)]에서 37°C , 16~24 시간 동안 반응시켰다. 염색이 끝난 조직은 에탄올을 이용하여 순차적으로 염록체를 완전히 제거한 다음, 현미경 (DFC 280, LEICA, Germany)으로 관찰하였다. Fluorometric assay 방법은 막자사발을 이용하여 선발된 개체의 잎을 잘게 부순 후, GUS extraction buffer [50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.0), 10 mM Na_4EDTA , 0.1% SDS, 0.1% Triton X-100, 10 mM β -mercaptoethanol]를 첨가하여 균질화시키고 원심분리 (13,000 rpm, 10분, 4°C)에 의하여 상등액을 모아 분석에 이용하였다. 상등액의 단백질을 10 μg 으로 정량한 후, GUS assay buffer (10 mM 4-methylumbelliferyl-D-glucuronide in extraction buffer)와 GUS extraction buffer를 넣고 37°C , 30분 동안 반응시켰으며 이어서 stop buffer (0.2 M Na_2CO_3)를 첨가하여 반응을 종로시켰다. Fluorescence의 측정을 위하여 FLX800 Fluorescence Microplate Reader (BioTek Instruments Inc., USA)를 사용하였다. 전체 단백질

함량은 Bio-Rad protein assay dye 용액 (BIO-RAD, USA)을 이용하여 결정하였다.

형질전환 유체의 후대검정

자가수정에 의해 얻어진 유체 형질전환 식물체의 T₁ 종자와 대조군의 종자를 토양 (필라이트:질석:상토 1:2:3, v/v/v)에 파종하여 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 장일 조건 (16h day / 8h dark)에서 배양하였다. 발아 후, 약 10일 정도 배양한 식물체에 0.3% 바스타 액제 (Bayer cropscience, Korea)를 살포하였으며, 형질전환 식물체의 생존 여부에 따라서 제초제에 대한 저항성 여부를 판별하였다.

Gas chromatography를 이용한 종자 지방산 성분 및 함량 측정

완전히 말린 각 품종의 종자는 1 ml의 2.5% 황산이 들어있는 메탄올에 넣고 10 μl 의 내부 표준 물질, C17:0 TAG (50 μg)를 첨가한 후 95°C 에서 1시간 30분간 반응시킨다. 반응이 끝난 다음, 1.5 ml의 0.9%의 NaCl 넣고 각 2 ml의 헥산 (hexane)을 이용하여 세 번 추출하여 상등액을 모았다. 모아진 헥산 용액은 질소가스를 이용하여 농축시켜 지방산 methyl esters를 확보하였다. GC 분석은 DB-23 column (30 m X 0.25 mm, 0.25 μm film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA, USA)이 장착된 GC-2010 (Shimadzu, Japan)을 이용해서 수행하였다. 운반 기체는 헬륨 (1 ml/min)을 사용하였고, split은 1/30 되도록 하였다. 각각의 지방산은 표준 시료의 체류 시간과 peak의 면적을 비교하여 분석하였다.

결과 및 고찰

유체 종자의 지방산 분석 및 형질전환용 유체 품종 선별

바이오디젤의 원료물질을 생산하는 식물의 종자오일 성분 중 올레인산의 함량이 중요하기 때문에 본 실험을 수행하기에 앞서 분양 받은 내한, 영산, 탐미, 한라의 4가지 유체 품종의 지방산 함량 및 조성에 대한 분석을 수행하였다. 유체 종자의 지방산 함량은 300-400 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 정도 이고 (Fig. 1A), 전체적인 지방산 조성에는 품종간에 큰 차이를 보이지 않았으며, 그 중 주된 지방산은 올레인산이며, 올레인산 함량은 4가지 유체 품종에서 모두 60 mol% 이상을 차지하고 있음을 확인하였다 (Fig. 1B). 특히 영산, 탐미 그리고 한라 품종이 내한 품종에 비해 올레인산의 함량이 약 4 mol% 높은 것을 알 수 있었다 (Fig. 1C). 또한 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 적합한 품종을 찾고자 4개의 품종에 대하여 유체의 자엽절편체를 이용하

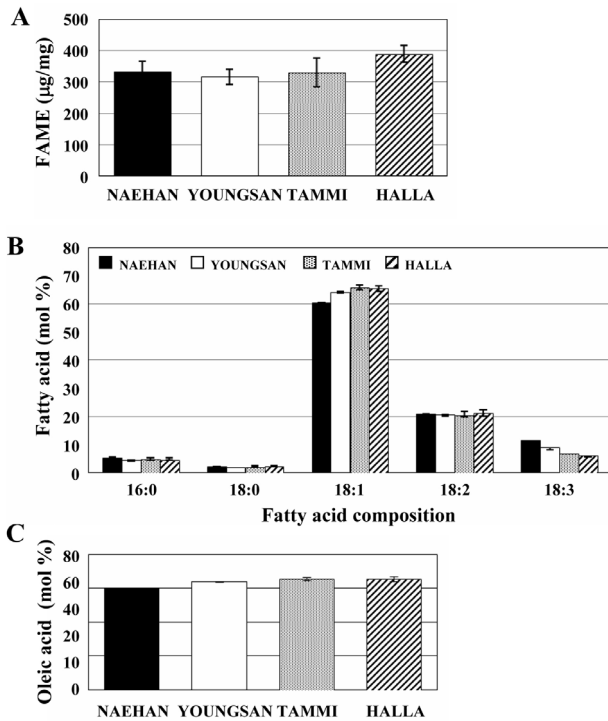


Fig. 1 Fatty acid amounts (A), composition (B) and oleic acid content (C) of Korean rapeseed cultivars. Fatty acids were extracted from dry seeds of four Korean rapeseed cultivars and determined by GC analysis. Each value is the mean \pm SE of three independent measurements

여 pCAMBIA3301 벡터 (Fig. 2A)가 도입된 *A. tumefaciens* GV3101를 접종한 후, 캘러스 유도 효율을 조사하였다. 본 연구에 사용된 배지에서 한 품종 당 100개 이상의 종자를 사용하여 자엽 절편체로부터 캘러스를 유도하였고, 제조제 phosphinothricin (4 mg/L)에 대한 저항성을 갖는 캘러스의 갯수를 확인하여 그 효율을 알아본 결과, 유채 품종에 따라 40-70%의 다양한 형질전환이 된 캘러스 유도 효율을 나타내었다. 특히 한라 품종의 경우에는 형질전환이 된 캘러스 유도 효율이 약 69%에 이르렀고, 탐미 품종이 약 62%로 확인되었다 (Table 1). 이는 한라 품종이 올레인산 함량뿐만 아니라, 형질전환이 된 캘러스 유도 효율이 높게 나타남으로써 4가지 품종 중에는 형질전환에 사용될 수 있는 최적의 조건을 갖춘 품종으로 선별되었다.

형질전환 및 형질전환이 된 유채 식물체 개발

제조제 저항성을 갖는 한라 유채 형질전환 식물체를 개발하기 위하여, 형질전환 식물체 선별을 위한 마커로 *PAT* 제조제 저항성 유전자 및 리포터 유전자로 *GUS*를 함유하는 pCAMBIA3301 벡터를 사용하였다 (Fig. 2A). 유채 식물체 형질전환 과정을 살펴보면, 유채 종자를 살균

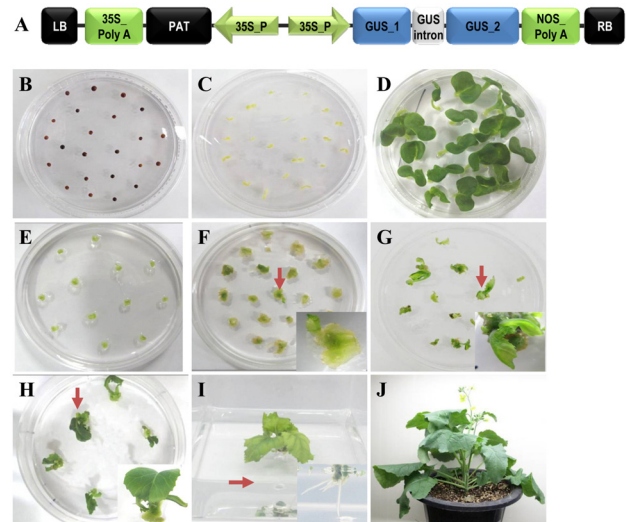


Fig. 2 Plant transformation vector, pCAMBIA3301 (A) and regeneration of transformed rapeseeds (B to J). (A) LB: left border, 35S_P and 35S_PolyA; CaMV35S promoter and terminator, *PAT*; *phosphinothricin acetyltransferase* gene, *GUS_1*, *GUS* intron and *GUS_2*; *uidA* gene region of encoding β -glucuronidase (*GUS*) including intron; *NOS_PolyA*; Nopaline synthase terminator; RB; Right border. (B) Seed germination (C) Co-cultivation (D) Callus induction (E and F) Shoot initiation (G) Regeneration of transgenic shoots (H) Selection of transgenic shoots (I) Root initiation (J) A transgenic plant in the soil

Table 1 Efficiency of callus formation from Korean rapeseed cultivars

Cultivars	No. of calli	No. of calli with PPT-resistance	Ratio (%)*
Naehan	560	234	41.79
Youngsan	592	341	57.60
Tammi	719	446	62.03
Halla	224	154	68.75

* Transformed calli per total calli

하여 발아시킨 다음 (Fig. 2B), 날카로운 칼을 이용해 잘라낸 1~2 mm 엽병을 포함한 자엽절편체를 pCAMBIA3301 벡터로 형질전환이 된 *A. tumefaciens* GV3101과 암 조건에서 공동배양하였다 (Fig. 2C). 공동배양을 마친 유채 자엽절편체를 광 조건에서 캘러스 유도배지에서 배양한 결과, 절편체 엽병의 상처난 부위에서 캘러스가 형성되었다 (Fig. 2D). 유도된 캘러스를 자엽 절편체로부터 분리하여 shoot 유도배지에서 2주 간격으로 3-4번 정도 계대배양하면서 성장하는 캘러스 (Fig. 2F)와 캘러스로부터 형성되는 shoot (Fig. 2G)를 얻었다. 형성된 shoot는 항생제 phosphinothricin을 이용하여 형질전환이 된 shoot를 1차로 선별하였다. 형질전환이 이루어지지 않은 캘러스는 제조제 저항성 없어 갈변되다가 고사하였지만, 형질전환이 된 캘러스는 녹색을 유지하며 계속적으로 자라면서 shoot를

Table 2 Efficiency of transformation from explants of a Korean rapeseed cultivar, Halla

No. of co-cultivated explants	No. of calli	No. of regenerated shoots	No. of shoots resistant to herbicide ¹	No. of plants containing <i>PAT</i> gene ²	No. of plants containing GUS activity	Ratio (%) ³
580	358	87	51	43	38	10.4

¹ Shoots were survived in shoot induction medium containing PPT 8 mg/L

² Confirmed by PCR analysis

³ Transformed shoots per total co-cultivated explants

형성하였다 (Fig. 2H). 재분화된 개체들을 발근 배지로 옮겨 정상적인 형태의 형질전환체로 성장시킨 후 (Fig. 2I) 토양으로 옮겨 순화를 실시한 결과, 모든 개체에서 잎의 전개 및 신엽의 발생, 그리고 뿌리가 정상적으로 발달되었다 (Fig. 2J).

분자생물학적 분석 및 GUS 활성 분석을 이용한 형질전환 유체의 검정

형질전환이 된 유체 식물체를 토양으로 옮긴 후 순화하여 시키기 전에 형질전환 되지 않은 한라 유체와 제초제에 내성을 갖는 총 51 개체의 유체 식물체로부터 genomic DNA를 추출하여 *PAT* 유전자 도입에 관한 PCR 분석을 수행한 결과, 총 43 개체에서 예상한 크기인 550 bp의 DNA band가 확인되어 *PAT* 유전자가 안전하게 도입되었음을 확인하였다 (Table 2). 그 중 7 형질전환 개체에 대한 genomic DNA PCR 결과를 Fig. 3A에서 보여주고 있다. *PAT* 유전자가 도입된 유체의 형질전환체를 대상으로 CaMV35S 프로모터에 의한 *uidA* gene의 발현을 확인하기 위하여 fluorometric assay 방법 (Jefferson et al. 1987; Terada and Ko, 1990)에 근거하여 GUS 효소 활성을 측정 한 결과, 총 43 개체에서 38 개체가 GUS 활성을 갖는 것으로 확인되었다 (Table 2). 그 중 그림 2A에서 보여준 형질전환이 된 7 개체와 형질전환이 되지 않은 유체를 대조구로 사용하여 비교하였을 때 형질전환이 된 유체 한라의 2번의 경우에는 GUS 효소의 활성이 상대적으로 형질전환이 된 다른 개체에 비해 매우 낮은 반면에, 다른 6 개체에서는 GUS 활성도가 상대적으로 높은 것으로 확인하였다 (Fig. 3B). 이렇게 선별된 형질전환체 3번의 잎, 꽃, 그리고 발달하는 종자에서 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide를 이용하여 GUS 효소에 대한 histochemical staining을 실시하였을 경우, 형질전환되지 않은 식물체의 경우에는 기질에 의해 전혀 염색이 되지 않았고 (Fig. 3C), 반면에 형질전환이 된 유체 식물체의 잎, 꽃, 그리고 발달하는 종자에서 GUS 효소가 안정적으로 발현되는 것을 확인하였다 (Fig. 3D-F). 이렇게 획득된 형질전환 유체 식물체에 대한 제초제 내성 및 GUS 효소의 발현에 근거하여 한국 고유의 유체 품종 한라의 형질전환효율을 조사한 결과,

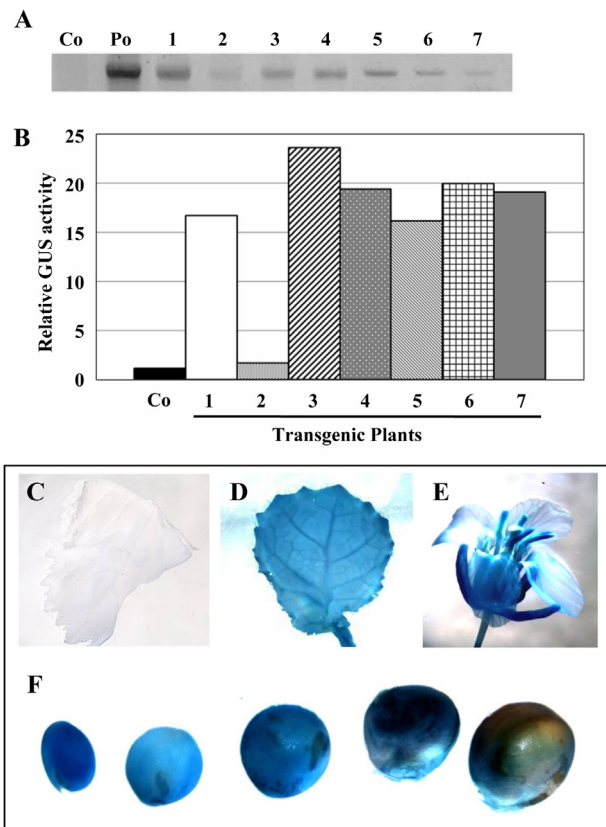


Fig. 3 Genomic DNA PCR analysis for *PAT* gene, and fluorometric assay and histochemical staining for GUS gene in transgenic rapeseed plants.

(A) Genomic DNA was isolated from 10-day-old seedlings of non-transgenic (c) and transgenic plants (1 to 7) and subsequently used for PCR analysis. PCR products were electrophoresed on 1% agarose gels containing Ethidium bromide (0.5 µg/ml). p; pCAMBIA3301 plasmid DNA. (B) β-glucuronidase (GUS) activity was determined in non-transgenic (control) and transgenic plants (1 to 7) using 4-methylumbelliferyl β-D-glucuronide (4-MUG) as a substrate. Each value is the mean ± SE of three independent measurements. (C to F) GUS expression under the control of CaMV35S promoter was detected in non-transgenic (control) and transgenic plant (#3) using 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide. C and D; leaves, E; Flower, F; Developing seeds

한라 유체의 형질전환 효율은 약 10.4%로 나타나는 것을 확인하였다 (Table 2).

기준에 보고된 유체 자엽을 이용한 형질전환 사례에서는 explant 당 shooting된 형질전환 효율이 17.5%임이 확인

Table 3 Segregation ratio for herbicide resistance of T₂ seedlings derived from independent T₁ transgenic lines

Independent plant lines	Segregation of PPT resistance		χ^2 value (p=0.05)	χ^2 value (p=0.05)
	PPT ^R	PPT ^S	3:1	15:1
Control	0	138	-	-
Transgenic plant #1	123	13	-	1.90
Transgenic plant #2	110	45	1.23	-
Transgenic plant #3	129	11	-	0.47
Transgenic plant #4	121	15	-	4.28*
Transgenic plant #5	118	18	-	5.83*
Transgenic plant #6	114	13	-	3.33
Transgenic plant #7	105	5	-	0.61

PPT^R and PPT^S are PPT-resistant and PPT-sensitive, respectively

* $p=0.01$

되었다 (Kim et al. 1997). 그러므로 형질전환 효율에서 근소한 차이를 보이는 데, 이는 기존 보고에서는 내한 품종이 본 연구에서는 한라 품종이 사용되었으므로 서로 다른 유채 품종에 대한 형질전환 효율의 차이일 가능성이 있다. 또한 기존의 보고에서는 항생제를 kanamycin을 사용한 반면, 본 연구에서는 제초제 저항성 유전자를 사용하였기 때문에 형질전환체 선별 마커의 상이성에 의해서도 형질전환 효율에 영향을 끼칠 수도 있을 것이다. 그리고 본 연구에서는 제초제에 대해 저항성을 갖는 형질전환이 된 유채 식물체 중에서 PAT 유전도입에 대한 PCR 분석을 하였을 때, 증폭된 DNA band를 확인할 수 있었으나 GUS 발색반응이 나타나지 않는 경우를 관찰 하였는데, 이러한 유채 형질전환 식물체는 배제하여 형질전환 효율에는 적용하지 않았다. 이러한 현상은 T-DNA 도입 초기에 식물체 내로 gene의 일부만 삽입되었거나 혹은 온전히 삽입되었더라도 재분화가 일어나는 과정에서 gene 일부가 소실된 것으로 생각된다.

현재 국내에서는 유채 형질전환에 다양한 절편체를 사용한 보고가 없지만, 국외에서는 여러 조직의 절편체를 이용한 유채 형질전환이 보고가 되었다. 유채의 하배축을 이용한 경우 Australian *Brassica napus* cv. BLN1239 품종으로 형질전환체 효율이 0.9%, *Brassica napus* Westar 품종으로 0.4~2.5%를 보였고 (Pandian et al. 2006; Radke et al. 1988), 자엽을 이용한 경우 *Brassica napus* winter rape 품종으로 형질전환체 효율이 0.01%를 나타내었다 (Longdou et al. 2005). 최근 종자를 이용한 형질전환방법도 소개되었는데, 그 효율은 *Bassica napus* Youyan10 품종에서 4~16% 효율을 보였다 (Li et al. 2009). 국내 유채 품종의 형질전환 효율이 국외 품종에 비해 비교적 높은 것을 확인하였고, 이것은 본 연구에 사용한 형질전환 방법이 국내 유채 품종의 형질전환에 매우 적합하다는 사실을 의미한다.

형질전환 유채의 후대검정

토양으로 순화되어 성장과 발달 과정을 거친 38개 형질전환 식물체 중에서 위의 그림 3에서 제시된 7개체의 T₁ 종자를 파종하고 제초제를 살포하여 분리비와 도입된 유전자의 후대 식물체로의 유전을 확인하였다. 각 계통마다 약 150개체의 종자를 파종하였으며 발아된 개체를 대상으로 파종 후 2주가 지난 뒤 잎이 4-6엽 정도 되었을 때 0.3%의 바스타 액제를 살포하여 제초제에 민감성과 저항성을 보이는 개체의 분리비를 조사하였다 (Table 3). 형질전환 식물체 2번의 경우에는 single copy로 삽입되었을 확률이 높게 나타났으며, 형질전환 식물체 1, 3, 그리고 7번의 경우에는 double copy가 삽입되었을 확률이 높다. 이러한 연구 결과는 도입된 PAT 유전자의 발현이 후대 식물체로 정상적으로 유전되었음을 의미하며, 그 결과는 멘델의 유전 분리비와 매우 유사함을 확인하였다 (Kim et al. 2008; Schröder-Pontoppidan et al. 2000). 각 계통마다 약 150 개체씩 파종했으나, 발아하지 않은 종자를 확인하였는데 이는 단기간 내에 후대 종자를 획득하기 위하여, 영양 생식기간을 충분하지 않아서 초래된 문제일 수도 있다.

본 연구에서 제초제 저항성 유전자 및 *uidA* 유전자를 포함하는 벡터를 도입한 *Agrobacterium*을 이용하여 유채의 형질전환을 수행한 결과, 형질전환 유채를 개발하기 위한 적합한 조건을 확립하였으며, 이를 통해 제초제 저항성 유전자가 도입되어 발현하는 형질전환이 된 한라 유채를 개발하였고, 분자생물학적 방법 및 GUS 발색반응을 이용하여 형질전환 식물체를 검정하였다. 제초제 저항성 유전자가 도입, 발현된 형질전환 유채 식물체는 후대에서 형질전환 여부 판별이 용이하므로 교배를 통하여 비교적 제초제를 많이 사용하여 재배하여야 하는 춘파형 유채 품종으로 제초제 저항성을 부여할 수 있을 것

으로 생각된다. 그러므로 본 연구 결과는 국내 고유의 한라 유채 식물체가 제초제 저항성을 갖는 품종으로의 개발뿐만 아니라 바이오 디젤 원료로 사용되기 적합한 지방산 조성이 변화된 유채 형질전환 식물체 개발에도 널리 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

화석에너지의 고갈과 지구 온난화 현상으로 인해 재생 가능한 식물자원으로부터 바이오에너지를 얻고자 하는 관심이 높아지고 있다. 이에 바이오디젤의 원료로 사용되기 적합한 형질전환이 된 유채를 개발하기 위한 첫 단계로 한국 고유 유채 품종을 이용한 형질전환 체계를 구축하였다. 내한, 영산, 탐미, 한라 유채의 종자를 분양 받아 지방산 분석을 실시한 결과, 종자의 약 32-40% 식물성 오일이 포함되어 있었고, 그 중 올레인산의 함량은 60 mole% 이상 존재하는 것으로 확인되었다. 그 중 오일 함량 및 올레인산 함량이 높고, 형질전환 효율이 비교적 높은 한라 유채품종이 그리고 β -glucuronidase (*GUS*)와 *phosphinothricin acetyltransferase* (*PAT*) 유전자가 포함된 pCAM-BIA3301 벡터가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 균주가 형질전환에 사용되었다. 형질전환이 된 유채 식물체는 제초제에 대한 내성, PCR을 이용한 *PAT* 유전자의 도입 여부 및 *GUS* 활성 분석을 통하여 선별하였다. 그 결과 한라 유채의 경우, 10.4% 형질전환 효율을 보였고, 제초제 저항성이 다음 세대 (T_1 식물체)로 안정되게 유전됨을 확인하였다. 이러한 연구는 바이오디젤 원료로 사용될 다양한 유채 품종에 교배를 통해 제초제 저항성 유전자를 쉽게 도입할 수 있는 가능성을 제시하였다.

사 사

본 연구에 사용된 유채 품종은 농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지 작물센터로부터 분양 받아 사용하였다. 또한 본 연구는 농촌진흥청 2010 국가농업 R&D 사업 (PJ007441201008), 바이오그린21 사업 (PJ0067152010) 그리고 한국연구재단 WCU 프로그램 (R31-2009-000-20025-0)에 의해 지원되어 수행되었다.

인용문헌

Chapel M, Glimelius K (1990) Temporary inhibition of cell wall synthesis improves the transient expression of the *GUS* gene in *Brassica napus* mesophyll protoplasts. *Plant Cell Rep* 9: 105-108

- Durrett TP, Benning C, Ohlrogge JB (2008) Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. *Plant J* 54: 593-607
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) *GUS* fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901-3907
- Khan EU, Liu JH (2009) Plant biotechnological approaches for the production and commercialization of transgenic crops. *Biotechnol & Biotechnol Eq* pp 23
- Kim JH, Song HS, Jee SM, Ryu TH, Kim DH, Kim HY (2005) Qualitative PCR Detection of GM rices (Milyang 204 and Iksan 483) developed in Korea. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48:335-338
- Kim KH, Lee JE, Ha SH, Hahn BS, Park JS, Lee MH, Jung CS, Kim YH (2008) *Perilla* transformation using selection markers containing antibiotics and basta. *Kor J Plant Biotechnol* 35: 299-306
- Kim KM, Sohn JK, Chung JD (1997) Transformation of *Brassica napus* via *Agrobacterium* vector : plant regeneration and progeny analysis. *Kor Plant Tissue Culture* 24:269-272
- Kita Y, Hanafy MS, Deguchi M, Hasegawa H, Terakawa T, Kitamura K, Ishimoto M (2009) Generation and characterization of herbicide-resistant soybean plants expressing novel phosphinothricin N-acetyltransferase genes. *Breed Sci* 59: 245-251
- Klee HJ, Rogers SG (1989) Plant gene vectors and genetic transformation : plant transformation systems based on the use of *Agrobacterium tumefaciens*. In: Vasil IK, (eds). *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 6, Academic Press, Orlando, Florida, pp 1-23
- Longdou L, Gao WJ, Wang J, Duan H, Li R (2005) Expression of chitinase gene in transgenic rape plants. *Analele Stiintifice ale Universitatii "Al.I. Cuza" Iasi, Genetica si biologie moleculara*, Tom V, pp 167-172
- Li S, Zhao D, Wu Y, Tian X (2009) A simplified seed transformation method for obtaining *Brassica napus* plants. *Agricultural sciences in China* 8:658-663
- Moloney MM, Walker JM, Sharma KK (1989) High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Rep* 8:238-242
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 15: 473-497
- Neuhaus G, Spangenberg G, Scheid OM, Schweiger HG (1987) Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryoids. *Theor Appl Genet* 75:30-36
- Ohlrogge JB (1994) Design of new plant products: engineering of fatty acid metabolism. *Plant Physiol* 104:821-826
- Pandian A, Hurlstone C, Liu Q, Singh S, Salisbury P, Green A (2006) *Agrobacterium*-mediated Transformation protocol to overcome necrosis in elite Australian *Brassica juncea* lines.

- Plant Mol Biol Rep 24:103a-103i
- Prem LB, Mohan BS (2008) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. Nature Protocols 3:181-189
- 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 a reintroduced napin gene. Theor Appl Genet 75:685-694
- Rücker B, Röbbelen G (1996) Impact of low linolenic acid content on seed yield of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant Breeding 115:226-230
- Scarth R, McVetty PBE, Rimmer SR, Stefansson BR (1988) Stellar low linolenic-high linolenic acid summer rape. Can J Plant Sci 68:509-511
- Schröder-Pontoppidan M, Dixelius CH, Glimelius K (2000) Effects of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and tissue culture on storage lipids in *Brassica napus*. Euphytica 115:181-190
- Somerville C, Browse J, Jaworski JG, Ohlrogge JB (2000) Lipids. In: Buchanan RB, Gruissem W, Jones RL, (eds), Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp 456-527
- Terada R, Ko S (1990) Expression of CaMV35S-GUS gene in transgenic rice plants. Mol Gen Genet 220:389-392
- Vanjildorj E, Bae TW, Song IJ, Kim KM, Lim YP, Lee HY (2008) Herbicide-resistant Transgenic Mongolian Bentgrass (*Agrostis mongolica* Roshev.) obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. Korean J Breed Sci 40:128-135
- Weigel D, Glazebrook J (2002) Adapted from Arabidopsis: *A Laboratory Manual*. In: Weigel D, Glazebrook J, (eds), CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Zhang Y, Singh MB, Swoboda I, Bhalla PL (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation and generation of male sterile lines of Australian canola. Aust J Agri Res 56:353-361