

아그로박테리움 형질전환법을 이용한 수량증대 유채 식물체 개발

김종보

Agrobacterium-mediated transformation produces transgenic oilseed rape with a high-yield trait

Jong Bo Kim

Received: 22 April 2023 / Revised: 24 April 2023 / Accepted: 24 April 2023 / Published: 28 April 2023
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This study includes the transformation of genes such as *ORE7*, the increase of gene expression, and the use of the *bar* gene as a selectable marker that shows herbicide resistance with *Agrobacterium tumefaciens* using hypocotyls from the oilseed rape “Youngsan” cultivar. To establish an *Agrobacterium* transformation system for the production of oilseed rape with a high-yield trait, infection time and co-cultivation period with *Agrobacterium* were tested. Therefore, when hypocotyls from the oilseed rape “Youngsan” cultivar were infected with *Agrobacterium* for 20 min and co-cultivated for 3 days, approximately 32-36 putatively transformed hypocotyls with shoots including roots survived from 100 inoculated hypocotyls after 4 weeks of transformation on a selection medium containing 20 mg/L of phosphinothricin (PPT) as a selectable agent. Additionally, a PCR assay was performed to confirm the insertion of target genes and showed the presence of the *ORE7* gene as a high-yielding trait and the *bar* gene as a selectable marker. Treatment with 0.5% (v/v) Basta solution as a selectable agent for 6 days with leaves from transformed oilseed rape expressed the *bar* gene. Therefore, this study can contribute to the development of special oilseed rapes containing agriculturally useful traits such as herbicide resistance, drought tolerance, high yielding traits, and high oleic acid content.

Keywords *Agrobacterium*, high-yield, Oilseed rape, Selection, Transformation

서론

유채(*Brassica napus* L., $2n=38$)는 높이 80~130 cm까지 자라는 십자화과 초본식물로 세계 각지에서 널리 재배될 뿐 아니라 매년 4천만 톤(ton) 이상 수확되고, 50여 개국 이상에서 상업적으로 이용되는 작물이다(Kahrizi et al. 2007). 콩, 팜 오일과 더불어 세계 3대 유지 작물중 하나로 전체 식물성 기름 생산에서 세 번째로 생산량이 많은 작물이며, 국내에서는 1962년부터 유류작물로써 본격적으로 재배되고 있다(Burbulis et al. 2008). 또한 세계에서 가장 중요한 식물성 오일 그리고 단백질 공급원 중의 하나이다(Jonoubi et al. 2005). 최근 에너지 문제와 환경 문제가 부각됨에 따라 바이오 에너지에 대한 관심이 급증하고 있는데, 다른 바이오 디젤 원료 작물에 비해 높은 올레인산과 유지함량, 부산물의 사료적 이용 등 여러 이점으로 최근 유채에 대한 관심이 증가하고 있다. 바이오 디젤 원료용 작물로는 주로 콩, 유채, 해바라기 등이 사용되며 이 중 콩은 유지 작물 중 생산량이 가장 많을 뿐 아니라 가장 상업화된 작물이지만 식용으로 활용성이 높고, 가축의 사료로 사용되므로 애그플레이션(agflation) 위험 등의 단점이 있다(Kim and Lee 2006). 그러나 유채는 대두에 비해 2배 이상 높은 38~45%의 유지를 함유하고 있고, 착유율은 35~38% 이상으로 매우 높은 편이며 유채유는 식용유, 샐러드유의 원료로 사용 가능하고 유지 추출 후 부산물과 줄기, 어린 잎 등은 단백질원 사료와 비료로 다양하게 사용이 가능하다. 이는 장점을 가지고 있어 독일의 경우 유채를 바이오디젤 원료작물로 재배하고 있다(Kim and Lee 2006; Kim et al. 2010). 이러한 장점으로 인해 유지함량 및 생산성 등의 품질이 향상

J. B. Kim (✉)
건국대학교 글로벌캠퍼스 의료생명대학 생명공학과
(Department of Biotechnology, College of Biomedical & Health Sciences, Global Campus, Konkuk University, Choong-Ju, 27478, Korea)
e-mail: jbhee1011@kku.ac.kr

된 유채품종의 개발에 대한 요구도는 증가하고 있는 실정이며 이러한 요구에 맞추어 전통육종방법과 더불어 식물형질 전환 기술을 이용한 신품종개발에 대한 연구가 진행되고 있다. 식물형질전환기술은 유용 유전자의 도입이 비교적 빠르고 외래 유전자를 도입할 수 있는 장점이 있어 이를 이용한 유채의 신품종 개발에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다. 유채 형질전환은 주로 *Agrobacterium tumefaciens* 매개 형질전환 기법과 particle bombardment를 이용하여 유지구성의 변화(Knutzon et al. 1992; Voelker et al. 1992, 1996; Wang et al. 2005)와 제초제 저항성(Cegielska-Taras et al. 2008; Kim et al. 2010), 해충저항성(Wang et al. 2005), 바이러스 저항성(Lehmann et al. 2003) 및 내염성(Wang et al. 2016) 등의 형질발현을 목적으로 하는 연구가 진행되어 왔다. 그 외 phytate 흡수효율을 높이는 형질전환 유채 식물체 개발도 보고되었다(Li et al. 2020). 유채 형질전환 연구에 사용된 절편체로 분류하면 배축(Radke et al. 1988), 자엽병(cotyledonary petioles)(Moloney et al. 1989), 줄기절편(stem segments)(Fry et al. 1987), 소포자(Pechan 1989), 원형질체(protoplast)(Thomzik and Hain 1990) 등을 절편체로 이용하여 수행되었다. 종자에 높은 lauric acid를 포함하는 'Laurate canola' 품종의 개발을(Voelker et al. 1992, 1996) 시작으로 유지구성의 변화(Knutzon et al. 1992), 제초제 저항성(De Block et al. 1989), 해충 저항성(Stewart et al. 1996)에 관한 연구들이 발표되었다. *Agrobacterium*을 이용한 유채의 최초의 형질전환 연구가 Radke 등(1988)에 의해 발표된 이래로 Cardoza와 Stewart(2003)에 의해 'Westar' 품종의 배축을 이용하여 GFP 유전자가 도입된 형질전환체를 개발에 대한 연구가 수행되었으며 전배양 72시간, 공동배양 48시간 처리하였을 경우 가장 높은 GFP 발현(25%)을 보였다. 또한 형질전환과정 중 재분화식물체에서 유리화가 발생하여 배지 고형체의 농도를 높여 사용하였으며 높은 선발농도(kanamycin 200 mg/L)는 유전자의 escape 발생을 예방한 것으로 보이며 전배양처리는 조직의 괴사를 낮추고 형질전환효율을 향상시킨다고 보고하였다. 하지만 지금까지의 선행연구 결과를 보면 유채의 형질전환은 주로 카나마이신 저항성, 제초제 저항성 등의 선발 유전자 도입에 대한 연구가 주로 진행되어 왔으며 바이오 디젤용 유채의 형질에 관여하는 유용 유전자가 도입된 유채 형질전환에 대한 보고는 매우 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 바이오에너지 작물로서 유채의 효율성

을 높이기 위해 생산량 증대 유전자(ORE 7)가 도입된 형질전환유채의 개발에 대한 기초연구로 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 한국 유채 품종이며 올레인산 함량이 65%로 높은 품종인 영산의 종자에서 배축을 이용한 고효율의 적합한 형질전환체계를 확립하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에서는 국립식량과학원(National Crop Science Institute) 산하 바이오에너지연구센터에서 분양 받은 영산품종의 성숙종자에 발아시킨 배축을 절편체로 사용하였다. 종자 소독은 먼저 70% EtOH에 2분간 침지 후 다시 tween-20 1~2방울을 첨가한 2% (v/v) sodium hypochlorite 용액에 20분간 교반하여 표면을 살균하였다. 살균된 종자는 멸균수로 3회 세척 후 멸균된 filter paper에서 건조한 후 사용하였다. 배축(hypocotyl)은 소독된 종자를 GEM배지에 치상하여 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 광 조건 16시간, 암 조건 8시간으로 배양하여 치상 후 7~10 일된 소식물체의 자엽 밑과 뿌리 위를 약 1 cm씩 절단한 배축을 획득하였다. 모든 기내 배양은 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 16시간 광주기에 광도는 약 2,000 lux 조건 하에서 수행하였다. 본 실험에서 사용한 배지의 조성은 Table 1에 정리하였다.

PPT (phosphinothricin) 및 Basta 적정 선발 농도

형질전환 실험에서 효율적인 선발체계를 확립하기 위해 적정 선발농도 실험을 수행하였다. 본 실험에서 선발 약제로 사용한 PPT를 농도별(0, 5, 10, 20, 30 mg/l)로 각각 종자는 GEM배지 그리고 배축은 SIM배지에 첨가하여 배양 4주 후 생존율을 측정하였다. Basta의 경우 0, 0.01, 0.03, 0.05 및 0.1% 농도로 첨가하였다.

Agrobacterium strain

본 실험에서는 제노마인(Genomine inc.)에서 제공한 수량증대 유전자(ORE 7)를 포함하고 phosphinothricin (PPT)에 저항

Table 1 Compositions of the media used in this study

| Media | Components |
|-------|--|
| GEM | MS (including MS vitamin; Murashige and Skoog, 1962), Sucrose 20 g/l, MES 500 mg/l |
| WM | MS, Sucrose 30 g/l, MES 500 mg/l, BAP 0.5 mg/l |
| SIM | MS, Sucrose 30 g/l, MES 500 mg/l, AgNO ₃ 5 mg/l, Zeatin 0.5 mg/l, 2,4-D 2 mg/l, BAP 2 mg/l, GA3 0.01 mg/l |
| RM | 1/2MS, Sucrose 10 g/l, MES 500 mg/l, NAA 0.02 mg/l |

GEM: Germination medium, WM: Washing medium, SIM: Shoot induction medium, RM (Rooting medium)

성을 나타내어 선발유전자로 사용되는 *bar* 유전자를 선발표지로 포함하는 pCAMBIA3301 vector (CSIRO, Canberra, Australia)에 *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 균주를 사용하였다(Fig. 1). *Agrobacterium*은 200 ml 삼각플라스크에 YEP 배지 100 ml와 균 stock 120 µl를 첨가한 후 190 rpm, 28°C, 압조건으로 진탕배양하였다. 40 h 후 OD₆₀₀ 0.6-1.0 사이의 균배양액 30 ml를 50 ml tube에 분주하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하여 pellet을 수확하고 pellet에 MS 액체배지 10 ml를 첨가하여 불텍싱하여 사용하였다. 실험에 사용할 배축조직을 filter paper 위에 올린 후 pellet 용액을 6 ml 분주하여 5, 10, 15, 20분간 접종 후, 공동배양배지에 치상하여 25°C에서 1, 3, 5 및 7일간 압조건에서 공동배양을 실시하였다. 공동배양 후 WMI (WM+ cefotaxime 500 mg/l)에서 130 rpm으로 28°C의 조건에서 4시간 동안 수세 후 WMII (WM+ cefotaxime 250 mg/l)에서 4시간동안 130 rpm, 28°C의 조건에서 수세하였다. 수세 후 멸균수로 1회 세척하고 멸균된 filter paper에 올려 충분히 건조 후 실험에 사용하였다.

선발 및 재분화

영산 품종의 성숙종자로부터 유도된 배축에 아그로박테리움을 이용하여 형질전환 후 PPT 20 mg/l 가 첨가된 GEM 배지에서 4주간 선발을 실시하였다. 그 후 생존한 개체는 PPT 5 mg/l 가 첨가된 SEM배지에서 2차 선발을 4주동안 실시하였으며 최종 생존한 개체는 PPT가 첨가되지 않은 RM배지로 치상하였다. RM 배지로 옮겨 뿌리를 유도하였다. 모든 기내 선발과정은 25 ± 1°C, 16시간 광주기 조건하에서 수행하였다. 선발을 마친 개체들은 크기가 10 ~ 15 cm 정도 자라면 순화과정을 거쳐 기외 조건에 적응한 후 온실로 이식하였다.

Polymerase Chain Reaction (PCR) 분석

PPT 저항성을 보이는 형질전환 추정 개체들의 외래 유전자 도입 여부를 확인하기 위하여 PCR 분석을 실시하였다. PPT 저항성을 가지는 신선한 식물체의 잎을 50 mg 절취하여 막자사발에 액체질소와 샘플을 함께 넣고 곱게 갈은 후 DNA extraction kit (Genomic DNA mini kit, Real Biotech corporation, Taiwan)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 본 실험에서는 *ORE7* 유전자(936 bp)의 도입을 확인하기 위해 forward primer로서 5'-ATGGAAGCGGTTACGAGCAAG-3', reverse primer로서 5'-TTAAAAAGGTGGTCTTGAAGGTG-3'을 이용하여 유전자 증폭을 수행하였고, *bar* gene (522 bp)의 도입

을 확인하기 위해 forward primer로서 5'-TCAAATCTCGGTGACGGGCA-3' 그리고 reverse primer로서 5'-ATGAGCCAGAACGACGCCC-3'을 이용하였다. PCR products는 샘플당 10 × PCR buffer 2 µl, Taq polymerase 0.2 µl, dNTPs mix (2.5 mM stock) 0.8 µl, primer Forward 0.5 µl, primer, Reverse 0.5 µl, DNA 5 µl, 3차중류수 11 µl를 넣어 최종 20 µl로 맞춘 후 PCR을 실시하였다. PCR 조건은 98°C에서 5 min 1 cycle, 98°C에서 30 sec, 64°C에서 15 sec, 72°C에서 30 sec 30 cycle, 72°C에서 5 min 1 cycle로 실행하였다. PCR products는 0.7% agarose gel (Duchefa. Haarlem, The Netherlands)에 샘플 3 µl (PCR products 2 µl + 5X loading buffer 2 µl)씩 분주하고 50V, 60 min 전기영동 처리하여 *bar* 및 *ORE7* gene의 도입을 확인하였다.

제초제 저항성(Basta) 검정

형질전환 추정체의 잎을 지름 1 cm의 구형으로 채취하여 제초제 저항성을 확인하기 위하여 0.5 % Basta 용액(Bayer Crop Science, Korea)을 사용하였다. Basta 용액에 처리 후 6일간 잎의 변색 및 피해 정도를 관찰하였다.

통계처리

모든 처리구는 각 100개 배축절편체를 사용하였으며, 아그로박테리움 조건실험은 4 반복 수행하였다. 모든 통계처리는 SPSS 23 (SPSS, Chicago, IL, USA)으로 ANOVA 검정 후, 던컨다중검정(DMRT)를 수행하였다.

결과 및 고찰

절편체 선정 및 선발약제 적정농도 선발

유채 형질전환은 Redke 등(1988)에 의해 처음 보고된 이래로 유전자총 및 아그로박테리움을 주로 이용하여 수행되어져 왔다. 이러한 형질전환 기법이 유채 우수품종개량 프로그램에 적용되기 위해서는 효율적인 조직배양 체계가 확보되어야 한다(Lee et al. 2010). 조직배양에 있어서 재분화의 효율성은 품종, 배양 절편체, 식물생장조절제의 종류와 농도 그리고 배지 첨가물질에 따라 달라진다(Lee et al. 2010). 본 연구에서도 사용한 영산 품종은 올레인산도 65% 함유하고 있어 비교적 높은 품종이고(Lee et al. 2016), 본 연구팀의 선행연구를 통해 유채 여러 품종들 중 재분화 및 증식효율에서 가장 좋은 결과를 나타내었으며, 종자, 자엽 및 배축 증어는 것이



Fig 1 Schematic diagram of pCAMBIA3301: *ORE7* harboring *bar* and *ORE 7* genes in T-DNA region (*ORE7*, NOS: nopaline synthase promoter; NOS: 3' signal of nopaline synthase; 35S: Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S promoter

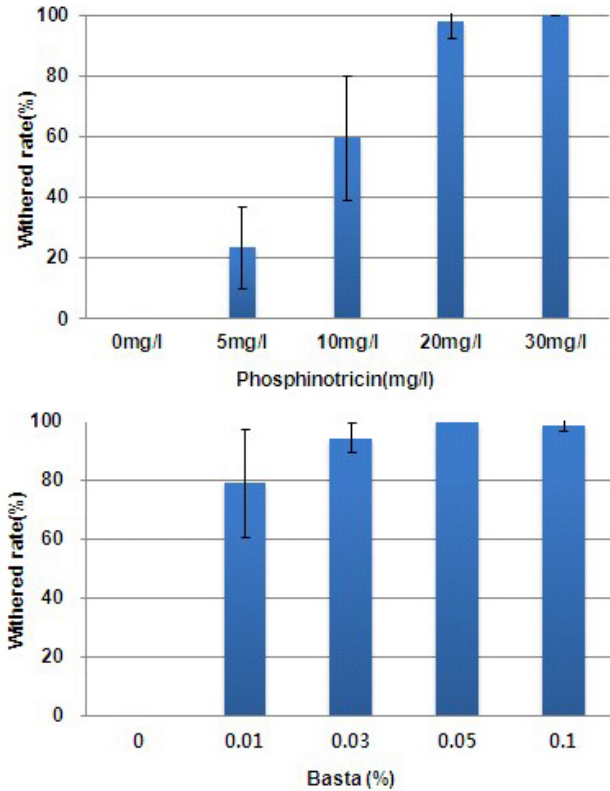


Fig 2 Effect on the different concentrations of PPT and Basta for the frequencies of withered plants (*Brassica napus* L. cv. Young-san) (Data were collected 8 weeks after cultured on basal medium supplemented with different concentrations of PPT)

조직배양 체계에 유리한 지 실험한 결과, 배축이 가장 우수한 것으로 나타나 배축을 절편체로 형질전환 실험을 수행하게 되었다(결과 미 제시). 자엽과 배축이 유채 형질전환 연구에 편리하게 사용되는 절편체인 것으로 보고된 바도 있다 (De Block et al. 1989; Moloney et al. 1989; Zhang et al. 2006). 이외에도 배축의 전처리가 아그로박테리움과의 접종효율을 높여준다는 연구보고(Cardoza and Stewart 2003)가 있었지만 본 연구에서는 전처리 효과는 없는 것으로 관찰되었다(결과 미 제시).

본 연구에서 사용된 목적유전자인 생산성 증대 유전자 외에 선발유전자로서 PAT (Phosphinotricin-acetyl-transferase)

단백질을 암호화해서 PPT가 주성분인 Bialaphos나 Basta에 저항성을 갖게 되는 *bar* 유전자를 사용하기에 PPT 및 Basta를 사용해서 어느 농도가 선발에 최적인지를 알아보고자 실험을 수행한 결과, PPT는 20 mg/l 그리고 Basta는 0.05% 농도에서 100%에 가까운 고사율을 보여주었다(Fig. 2). 이를 기반으로 1차 선발은 PPT 20 mg/l로 하고 이어지는 2차 선발에서는 5 mg/l 정도로 낮추어 선발하며 순화를 거쳐 온실이나 화분으로 이식한 후에는 스프레이로 Basta 0.03-0.5%로 살포하여 저항성 검정을 수행하였다. Boszoradova 등(2011)의 보고에 의하면 약한 선발압을 형질전환체 선발에 적용할 경우 escape 발생율을 높일 수 있기 때문에 어느 정도 강한 선발압이 필요하다고 판단된다.

아그로박테리움 형질전환 조건 확립

애기장대에서 잎의 노화를 지연시키는 것과 엽병을 약간 짧게 하고 잎의 모양을 둥글게 하고 약간 커지는 잎의 변형 외에도 이삭 수를 증가시켜 전반적인 biomass가 증대되는 형질이 발현된다고 보고된 *ORE 7* 유전자(Lim et al. 2007)를 아그로박테리움 형질전환 기법을 이용해서 유체에 도입하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 접종시간은 20분 그리고 공동배양기간은 3일에서 100개의 접종된 배축 중 4주 후 36-38개의 PPT 저항성 개체를 획득할 수 있었다(Table 2). 또한 아그로박테리움 과발생으로 인한 오염율도 2.8-3.1% 정도로 접종시간 5분 및 공동배양 1일인 경우와 비교해도 별 차이가 나지 않음을 보여주었다. 본 연구결과와 같이 3일간의 공동배양기간을 적용한 연구는 Zhang 등(2000), Lee 등(2016), Wallbraun 등(2009) 및 Kim(1997)의 연구에서도 보고된 바 있다. 반면 Cardoza와 Stewart(2003)의 연구에서는 24, 48 및 72시간의 전처리 배양기간과 24, 48 및 72시간의 공동배양 기간 효과를 구명하는 실험 결과, 72시간의 전처리 배양을 거치고 나서 48시간의 공동배양 기간을 가지는 것이 최대 25%의 형질전환 효율이 관찰되었다고 보고하였고, Wang 등(2016)의 연구에서도 2일간 전처리 기간 후 2일간의 공동배양 기간을 적용해서 내염성 유채를 개발하였다. 또한 Kim 등(2010)의 연구

Table 2 Effect of infection time on the transformation efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation in hypocotyls from the oilseed rape “Young-san” cultivar

| Infection time (min) | *# of PPT resistant shoots with roots /100 inoculated hypocotyls* | % of putative transgenic plants with overgrowth** |
|----------------------|---|---|
| 5 | 6.5 ± 2.2**c | 1.5 |
| 10 | 9.5 ± 3.6c | 2.4 |
| 15 | 19.7 ± 4.3b | 3.3 |
| 20 | 36.1 ± 6.6a | 3.1 |

*Data were collected 4 weeks after transformation. \

**Values are means ± standard deviation (n = 5). Means followed by the same letters in each column are not significantly different (p < 0.05) using DMRT (Duncan’s Multi Range Test).

Table 3 Effect of co-cultivation period on the transformation efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation in hypocotyls from the oilseed rape “Young-san” cultivar

| Co-cultivation period (days) | *# of PPT resistant shoots with roots /100 inoculated hypocotyls | % of putative transgenic plants with overgrowth by <i>Agrobacterium</i> |
|------------------------------|--|---|
| 1 | 12.1 ± 3.7**c | 2.4 |
| 3 | 38.8 ± 4.4a | 2.8 |
| 5 | 33.9 ± 8.4ab | 6.3 |
| 7 | 24.8 ± 6.4b | 12.8 |

*Data were collected 4 weeks after transformation.

**Values are means ± standard deviation (n = 5). Means followed by the same letters in each column are not significantly different (p < 0.05) using DMRT (Duncan’s Multi Range Test).

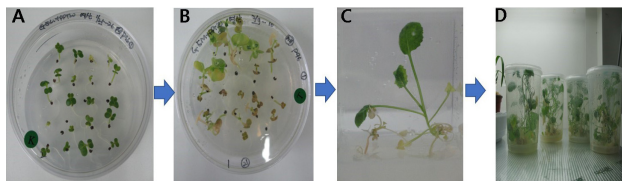


Fig 3 Flowcharts of production of transgenic oilseed rape cv. Young-san. A) Transformed seeds with *Agrobacterium* and cultured on SIM with PPT 20 mg/L, B) Survived plantlets on SIM 4 weeks after transformation, C) Survived plantlets on SM (PPT 10 mg/L) 8 weeks after transformation, D) Putative transgenic plant on SM 16 weeks after transformation

에서도 유채 ‘한라’ 품종으로 20초 접종시간과 2일간의 공동 배양기간을 적용해서 제초제 저항성 형질 유채 식물체가 개발되었으며, 형질 전환 효율은 10.4%을 보여주었다. 또한 Boszoradova 등(2011) 연구에서도 배축과 자엽을 비교한 결과 2일간의 공동배양 기간을 적용하여 최대 3.9%의 형질 전환 효율을 보여준 자엽 절편체에 비해 배축 절편체는 5.5%의 효율로서 높은 형질전환 효율을 보여주었다. 3일 이상의 공동배양 기간을 적용한 경우 아그로박테리움 과발생에 의한 오염이 증가함을 보여주었다(Table 3).

이러한 공동배양 기간의 차이는 품종, 아그로박테리움 균주의 감염능력 차이라고 판단된다. 공동배양 후 선발약제가 첨가된 배지에서 선발하는 과정을 연기하는 방식을 도입하는 것이 유용하다는 보고(Boszoradova et al. 2011)도 있었고, 전처리와 더불어 아그로박테리움과 공동배양 후 일정기간 휴식기를 가진 후 선발과정을 수행하는 것에 관한 연구보고도 있었다(Ovesna et al. 1993). 따라서 향후 공동배양 후 바로 선발배지로 이식하지 않고 일정기간 휴식기를 부여한 후 선발과정을 수행하여 형질전환 효율을 높이고 형질전환 개체의 생존율을 높이는 연구가 필요하다고 판단된다.

PCR assay, Basta 검정 및 형질전환체 증식

본 연구에 생산된 형질전환 유채 식물체는 초기 PPT 20 mg/l의 강한 선발압을 거쳐 약 4개월이 경과한 후, 18계통 174개체가 증식되었는데(Fig. 3), 이 중 8개체를 임의로 선발하여

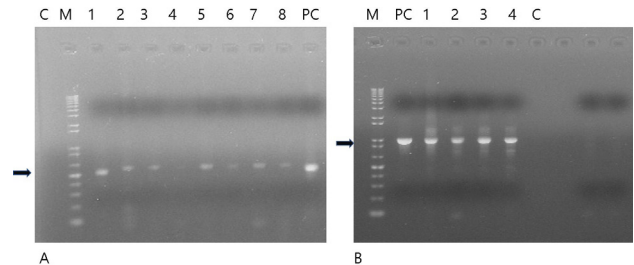


Fig 4 PCR analysis of transgenic oilseed rape (A: *bar* gene (552 bp), B: *ORE 7* gene (936 bp) (M: marker, PC: positive control, C: control (non-transformed oilseed rape), lane 1-8: transgenic oilseed rape lines). Arrows indicate 552 bp and 936 bp, respectively

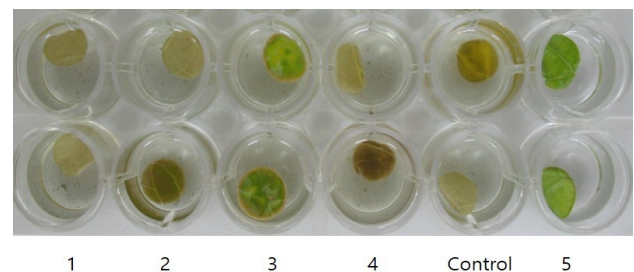


Fig 5 Treatment of transgenic oilseed rape with 0.5% (v/v) Basta solution. Control: non-transformed oilseed rape, lane 1-5: transgenic oilseed rape lines conformed by PCR assay

bar 유전자(552 bp)도입유무를 알기 위해 PCR 검정을 수행한 결과 7개체에서 도입이 확인되었다(Fig. 4A). 또한 174개체 중 임의로 4개체를 선발하여 *ORE 7* 유전자(936 bp) 도입유무를 확인하기 위해 PCR 검정을 수행한 결과 4개체 모두 도입되었음이 확인되었다(Fig. 4B). 또한 선발유전자로 도입된 *bar* 유전자가 제대로 형질발현 되는지 확인하기 위해 PCR 검정을 통해 *bar* 유전자 도입이 확인된 7개체 중 5개을 임의로 선발하여 Basta 검정을 수행한 결과, 2개체에서 Basta 0.5% 용액에 침지 후 6일 경과 후에도 Basta에 의한 피해가 1개체에선 거의 나타나지 않았고 1개체에서는 약간의 피해 그리고 나머지 3개체는 비형질전환체인 대조구와 비슷하게 Basta에 의한 피해가 심하게 나타났다(Fig. 5). 본 연구에서 제초제 저항성 유전자인 *bar* 유전자를 선발유전자로 하고

수량증대 유전자인 *ORE7* 유전자를 도입하기 위해 아그로박테리움 형질전환 실험을 수행한 결과, 공동배양기간과 접종시간의 조건을 확립하였으며, 이를 기반으로 분자생물학적 방법을 통하여 수량증대유전자와 선발유전자의 도입을 확인하였고, Basta 검정을 통하여 선발유전자인 제초제저항성 *bar* 유전자의 발현을 확인하였다. 본 연구결과는 국내 우수한 유채품종을 대상으로 쌍자엽 식물에 있어서 유용한 형질전환 기법인 *Agrobacterium*을 이용하여 제초제저항성 유채품종 개발 그리고 이삭 수 증가 및 종자수확량 증대를 통한 생산성 증대 유채식물체 개발에 기여할 것으로 판단된다.

적 요

본 연구는 유채(*Brassica napus* L.)의 배축을 이용하여 수량증대 유전자인 *ORE7* 그리고 선발유전자로 제초제저항성을 나타내는 *bar* 유전자를 *Agrobacterium* 기법을 이용하여 형질전환 하였다. 효율적인 유채형질전환 기법을 확립하기 위해 한국 유채 '영산' 품종의 배축 절편체를 이용하여 *Agrobacterium* 접종 시, 20분간의 접종시간 그리고 3일간의 공동배양기간을 적용할 때 100개의 접종된 배축 절편체들로부터 약 32-36개 개체가 PPT (Phosphinothrixin) 20 mg/l 첨가된 선발배지에서 생존하여 높은 형질전환 효율을 보여주었다. 또한 본 연구에서 도입된 선발 및 생산성 증대 유전자 도입 여부를 확인하기 위해 PCR을 수행하여 도입 여부를 확인하였다. 또한 생산성 증대 유전자 *ORE7* 유전자와 같이 도입된 *bar* 유전자의 발현 여부를 확인하기 위해 0.5% Basta 용액에 처리한 결과, 제초제저항성 형질이 발현됨을 확인하였다. 본 연구 결과를 통해 향후 국내 유채품종을 대상으로 *Agrobacterium*을 이용하여 제초제 저항성, 건조저항성, 생산성 증대 형질 그리고 오일함량 증대 등의 유용형질 개량에 이용되리라 판단된다.

사 사

이 논문은 건국대학교 2021년 KU 학술연구비 지원에 의한 논문임.

References

Boszoradova E, Libantova J, Matusikova I, Poloniova Z, Jopcik M, Berenyi M, Moravcikova J (2011) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of economically important oilseed rape cultivars. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 107:317-323

Burbulis N, Kuprienė R, Blinstrubienė A (2008) Callus induction and plant regeneration from somatic tissue in spring rapeseed

(*Brassica napus* L.) *Biologia* 54:58-263

Cardoza V, Stewart CN (2003) Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyls 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 Gen* 49(4):343-347

De Block M, De Brouwer D, Tenning P (1989) Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants. *Plant Physiol* 91:694-701

Fry J, Barnason A, Horsch RB (1987) Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium tumefaciens* based vectors. *Plant Cell Rep* 6:231-235

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*. *Biol Plant* 49(2):175-180

Kahrizi D, Salmanian AH, Afshari A, Moieni A, Mousavi A (2007) Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E. coli* (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate. *Plant Cell Rep* 26:95-104

Kim CS, Lee SH (2006) Economic analysis of a Rape production for Biodiesel. *Kor J Organ 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, Sohn JK, Chung JD (1997) Transformation of *Brassica napus* via *Agrobacterium* vector: plant regeneration and progeny analysis. *Kor J Plant Tissue Cult* 24(5):269-272

Knutzon DS, Thompson GA, Radke SE, Johnson WB, Knauf VC, Kridl JC (1992) Modification *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearoyl acyl carrier protein desaturase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:2624-2628

Lee KR, Kim EH, Roh KH, Kim JB, Kang HC, Go YS, Suh MJ, Kim HU (2016) high-oleic oilseed rapes developed with seed-specific suppression of *FAD2* gene expression. *Appl Biol Chem* 59(4): 669-676

Lee SI, Kim YH, Lee DH, Lee YN, Park SJ, Kim JB (2010) Current status of tissue culture and genetic transformation systems in oilseed rapew plants (*Brassica napus* L.) *J Plant Biotechnol* 37: 379-387

Lehmann P, Jenner CE, Kozubek E, Greenland AJ, Walsh JA (2003) Coat protein-mediated resistance to *Turnip mosaic virus* in oilseed rape (*Brassica napus*) *Mol Breeding* 11:83-94

Li X, Zeng L, Ren L, Chen W, Liu F, Yang H, Yan R, Chen K, Fang X (2020) Marker-free lines of *phytase*-transgenic *Brassica napus* show enhanced ability to utilize phytate. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 140:11-22

Lim PO, Kim YM, Breeze E, Koo JC, Woo HR, Ryu JS, Park DH, Beynon J, Tabrett A, Buchanan-Wollston V, Nam HG (2007)

- Overexpression of a chromatin architecture-controlling AT-hook protein extends leaf longevity and increases the post-harvest storage life of plants. *Plant J* 52:1140-1153
- 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 bio assays with *Tobacco* tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Ovesna J, Ptacek L, Opartny Z (1993) Factors influencing the regeneration capacity of oilseed rape and cauliflower in transformation experiments. *Biol Plant* 35:107-112
- Pechan PM (1989) Successful cocultivation of *Brassica napus* microspores and proembryos with *Agrobacterium*. *Plant Cell Rep* 8:387-390
- 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 introduced naping gene. *Theor Appl Gen* 75:685-694
- Stewart CN, Adang MJ, All JA, Raymer PL, Ramachandran S, Parrott WA (1996) Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAC* gene. *Plant Physiol* 112:115-120
- Thomzik JE, Hain R (1990) Transgenic *Brassica napus* plants obtained by co-cultivation of protoplast with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 9:233-236
- Voelker TA, Wprell AC, Anderson L, Bleibaum J, Fan C, Hawkins DJ, Radke SE, Davies HM (1992) Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants. *Science* 257:72-74
- Voelker TA, Hayes TR, Cranmer AM, Turner JC, Davies HM (1996) Genetic engineering of a quantitative trait: metabolic and genetic parameters influencing the accumulation of a laurate in rapeseed. *Plant J* 9:229-241.
- Wallbraun M, Sonntag K, Eisenhauer C, Krzcal G, Wang YP (2009) Phosphomannose-isomerase (*pmi*) gene as a selectable marker for *Agrobacterium*-mediated transformation of rapeseed. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 99:345-351
- Wang J, Guo C, Dai Q, Feng B, Zuo K, Lin M (2016) Salt tolerance conferred by expression of a global regulator IrrE from *Deinococcus radiodurans* in oilseed rape *Mol Breeding* 36:88
- Wang YP, Sonntag K, Rudolf E, Han J (2005) Production of fertile transgenic *Brassica napus* by *Agrobacterium*-mediated transformation of protoplasts. *Plant Breeding* 124:1-4
- Zhang FL, Takahata Y, Watanabe M, Xu JB (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Rep* 19:569-575
- Zhang Y, Hu J, Han L, Wei W, Guan Z, Cong L, Chai T (2006) Efficient shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica juncea*. *Plant Mol Bio Rep* 24:255a-255i