

2. 환경재해내성 유전자 도입한 Birdsfoot trefoil 형질전환 식물체 생산

김기용¹ · 최영진¹ · 서 성¹ · 임용우¹ · 김맹중¹ · 이병현² · 손대영² · 곽상수³

(농촌진흥청 축산연구소¹, 경상대학교², 한국생명공학연구원³)

Production of Transgenic Birdsfoot trefoil(*Lotus corniculatus* L.) with Tolerance Gene to Environmental Stress

K. Y. Kim¹, Y. J. Choi¹, S. Seo¹, Y. W. Rim¹, M. J. Kim¹, S. J. Lee¹, B. H. Lee² and S. S. Kwak³

(National Livestock Research Institute, Chonan 331-801, Korea¹, Gyeongsang Natl. Univ., Jinju 660-701, Korea²,
Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology³)

Key words : Transgenic birdsfoot trefoil, Environmental stress, New variety

<목적>

각종 환경스트레스(재해)는 세계적으로 식물생태계를 위협하고 있으며, 식량생산에도 부정적인 영향을 미치고 있다. 농촌진흥청에서 주관하는 바이오그린21사업의 일환으로 본 연구에서는 식물생명공학 기술을 이용하여 환경적응성이 높은 재해내성 사료작물을 개발하고자 한다. 분자유종기술은 기존의 재해내성 사료작물 개발의 한계를 극복할 수 있는 유일한 대안으로 대두되고 있다. 우리 나라에서 재배 이용되고 있는 대부분의 사료작물은 외국으로부터 도입된 품종이기 때문에, 우리 나라의 기후 및 토양에서는 잘 적응할 수 없거나 수량성이 낮아지는 문제점이 있다. 환경재해에 내성을 부여하는 유전자를 사료작물에 도입하여, 불량한 환경에서도 적응할 수 있는 사료작물을 개발하게 되면, 축산의 중요 기반이 되는 조사료 증산 및 안정적인 조사료 생산에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구에서는 사료작물 중 두과 목초인 버즈풋 트레포일을 형질전환 하였다.

<재료 및 방법>

○ 공시재료

- 버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.)

○ 유전자, 발현벡터, *Agrobacterium*

- 환경재해 저항성 유전자 : NDPK 및 SOD+APX

- 버즈풋 트레포일 형질전환에 이용한 발현벡터 : pCAMBIA1300 및 pCAMBIA2300

- *Agrobacterium tumefaciens* strain : EHA105

- 유전자 및 발현벡터 분양 : 한국생명공학연구원 곽상수 박사로부터 분양받았음

○ 시험방법

- 1) 버즈풋 트레포일 종자를 소독하여 2,4-D 3 mg/ℓ를 첨가한 SH-3 배지에서 캘러스를 유도
- 2) 상기의 유전자를 갖는 발현벡터로 *Agrobacterium* 을 형질전환 후 전기영동으로 확인
- 3) 형질전환 *Agrobacterium* 과 버즈풋 트레포일 캘러스를 공배양하여 유전자 도입
- 4) *Agrobacterium* 으로 감염된 캘러스를 hygromycin 및 cefotaxim 첨가배지에서 배양
- 5) 형질전환 캘러스를 선발하여 BOi2Y 배지에서 20~30일 간격으로 계대배양
- 6) 형질전환 캘러스로부터 shoot 및 root를 유도하여 형질전환된 식물체를 생산
- 7) Genomic DNA 분리하여 PCR 및 Southern blot 분석 실시하여 유전자 도입 확인

- 8) Total RNA 분리하여 northern blot 분석 실시하여 도입 유전자의 발현 확인
- 9) 형질전환체의 온실순화, 계통조성, 특성검정 및 포장에서 재배시험 실시

<결과 및 고찰>

1. 재해내성 birdfoot trefoil 형질전환체 생산

- Birdfoot trefoil 종자 유래의 캘러스에 한국생명공학연구원으로부터 분양받은 환경재해내성 발현벡터 3종(① SWPA2pro::SOD + SWPA2pro::APX, ② SWPA2pro::NDPK2, ③ E35Spro::NDPK2)을 *Agrobacterium* 을 매개로 하여 도입하여 형질전환 식물체를 제작하였음.
- Fig. 1의 좌상은 식물체 재분화과정에서 shoot가 형성되는 과정, 우상은 확대한 사진, 좌하는 재분화된 식물체의 순화과정, 우하는 뿌리가 완전히 활착된 상태의 재분화된 식물체 사진.
- SSA, SN 및 EN 발현벡터에 대해 각각 5개체씩, 모두 15개체의 재분화된 식물체로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR 및 Southern blot를 통해 형질전환체의 분석을 실시 중에 있음.

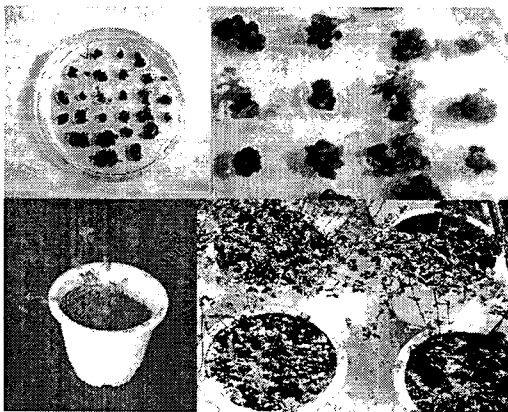


Fig. 1. Production of transgenic birdsfoot trefoil plants with tolerance gene to environmental stress. A, Transgenic callus; B, Shoot formation; C, Transgenic plant; D, Transgenic plants in growth chamber.

2. 재해내성 사료작물의 온실순화 및 특성검정

- 복합 재해내성 유전자로 형질전환된 사료작물은 온실에서 영양체를 증식하여 보존 중에 있으며, '05년에는 이들 영양체를 GMO 격리포장에서 재배하며 형질전환체의 특성을 검정하며, 형질전환체간 교배를 통해 GM종자를 생산할 계획임.
- Fig. 2의 좌측은 형질전환체를 온실에서 증식 보존하는 사진이며, 우측은 GMO 격리포장에서 재배하는 사진임('04년 수원에서 촬영한 사진).



Fig. 2. The lines of transgenic orchardgrass(*Dactylis glomerata* L.) plants with *Dgp23* or *DgHsp17.8* gene.

- ① Birdsfoot trefoil (15개체) : SSA, SN 및 EN 각각 5개체씩, 모두 15개체 증식 및 보존.
(형질전환 확인 중)
- ② Orchardgrass (2개체) : EN 형질전환체 2개체를 온실에서 증식 보존.
(유전자 도입 및 유전자 발현이 확인된 계통)
- ③ Tall fescue (4개체) : 페스큐 SN, SSA 형질전환체 각 2개체를 온실에서 증식 보존.
(유전자 도입 및 유전자 발현이 확인된 계통)