

형질전환 벼 이용 품종 조기개발 체계 확립

원용재¹, 이기환¹, 조준현¹, 고종민¹, 박향미¹, 한창덕², 양세준¹, 김순철¹, 남민희^{1*}
¹영남농업시험장, ²경상대학교

Establishment of a New Breeding Scheme for Rapid Release of Variety Using *bar* Gene Transformed Rice

Yong Jae Won¹, Gi Hwan Yi¹, Jun Hyeon Cho¹, Jong Min Ko¹, Hyang Mi Park¹, Chang Deok Han²,
Sae Jun Yang¹, Soon Chul Kim¹, Min Hee Nam^{1*}

¹National Yeongnam Agricultural Experiment Station, RDA, Milyang 627-103, Korea

²Division of Applied Life science, Plant Molecular Biology & Biotechnology
Research Center, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT This study was carried out to establish a new breeding scheme which is connected with conventional breeding method and anther culture method. To develop a herbicide resistant and direct seeding rice, F₁ plants were subjected to anther culture and regenerated plants from 5 crosses were studied to confirm the introduction of *bar* gene. After PCR analysis, we selected 227 plants which were carrying herbicide resistance gene (*bar*) out of 1,508 regenerated plants from anther culture. Among 169 A₂ lines carrying herbicide resistant gene from 5 crosses including YR23235 (Dongjin Ds3(Bar^R)/ Milyang165), 42 lines that had superior agronomic characters were selected for further research. Among them, YR23235Acp79 which showed herbicide resistance, direct seeding adaptability and superiority in major agronomic characters was named Milyang 204. This breeding scheme proved that the anther culture of F₁ plants crossed between transformant and cultivar or transformant alone could be utilized in breeding programs for a rapid progeny fixation and development of a variety.

Key words: Breeding scheme, basta resistance, transformed rice, Milyang 204

서 론

형질전환작물이란 유전자재조합기술에 의하여 만들어지는 것으로 기존의 육종에 의한 품종개발과는 달리 식물, 동물 또는 미생물의 유용한 유전자를 인위적으로 도입하여 목적한 특성을 갖도록 한 작물이라 할 수 있다. 형질전환작물은 1994년 미국의 Calgene사가 연화지연 토마토를 개발하여 "Flavr Savr"라는 상표로 판매한 이후 1995년 제초제저항성 콩 "Round-up Ready" (Monsanto)와 충해에 내성을 가진 "Bt

maize" (Norvatis)라는 상표의 옥수수 등이 상품화되었다 (Kim 2002a). 이후 형질전환작물 개발은 미국 등 선진국을 중심으로 빠르게 증가되어 상품화된 것이 50여 종이 있으며, 안전성검사 중에 있는 것도 30여 종이 된다 (Kim 2002a; Kim 2002b; Woo 2002). James (2003)의 보고에 의하면 2002년 세계 형질전환 작물의 재배면적은 5,870만 ha로 '96년의 170만 ha에 비하여 25 배나 증가하였으며 이는 해마다 급증하는 추세이다. 또한, 형질전환작물의 시장규모는 2001년 38억불에서 2002년 42.5억불로 증가하였고, 2010년에는 200억불에 이를 것으로 전망되고 있다. 형질전환작물은 미국, 아르헨티나, 캐나다, 중국에서 전체 형질전환작물의 99%를 재배하고 있다. 특히 중국은 2002년 내충성 목화의 재배면적이 전체의 51%에

*Corresponding author Tel +82-55-350-1181 Fax +82-55-352-3059
E-mail: nammhee@rda.go.kr

달하고 있으며, 세계적으로 형질전환작물의 재배면적이 가장 급속히 증가하는 나라가 되었다. 형질전환작물로는 콩이 3,650만 ha로 전체의 62%를 차지하고, 옥수수, 목화, 카놀라 등이 주종이며 형질전환에 쓰인 유전자별로는 제초제 저항성 유전자가 4,420만 ha로 전체의 75%, 내충성 유전자가 1,010만 ha로 17%에 달하고 있다. 바스타저항성 유전자인 *bar*의 클로닝 (Thompson et al. 1987) 이후 이를 배추 (Cho et al. 2001), 밀 (Nehra et al. 1994), 땅콩 (Brar et al. 1994), *Arabidopsis* (Akama et al. 1995; Choi et al. 1996), 감자 (Eliseu et al. 1994) 등의 작물에 도입하여 현재 형질전환작물 중 가장 넓은 면적에서 재배되고 있다. 벼에서 *bar* 유전자는 형질전환 중 선발 마커로 사용되는 경우가 대부분이며, 제초제 저항성 유전자가 도입된 형질전환 벼는 보고되어있으나 (Datta et al. 1992; Keertis et al. 1993) 계통으로 육성된 결과는 없다. 그러나 현재까지 형질전환 효율이 아직 낮은 수준이며, 도입된 유전자의 발현 및 유전적 안정성 문제 등은 여전히 해결해야 할 과제로 남아있고 또한 포장에서의 내병·내충성 검정과 수량성 평가 등 기존의 육종체계와의 연계가 필수적이라 할 수 있다. 따라서 본 연구는 형질전환 벼를 이용하여 약배양 등 기존의 육종체계와 연계함으로써 우량 계통을 조기에 육성할 수 있는 체계를 확립하고자 수행하였다.

재료 및 방법

시험재료

제초제저항성 유전자 (*bar*)가 선발마커로 있는 Ds 유전자를 형질전환하여 얻은 동진 Ds15 (Chin et al. 1999)와 단간 내도 복성이면서 양질 다수성인 밀양165호를 1999/2000년 동계에 온실에 공시하였고, 2000년 하계에는 동진 Ds3, 동진 Ds7, 동진 Ds15, 밀양165호 그리고 직파적응성 양질계통인 밀양178호를 공시하였다. 제초제저항성 인자 도입을 위해서 공시된 계통들 간에 인공교배를 실시하였다. YR23235 (동진 Ds15/밀양165호)조합 F₁들은 2000년 하계 포장에, YR22513 (동진벼 Ds7/주남벼) 등 4조합 F₁은 2000년 동계 온실에 공시하여 약배양에 이용하였다.

형질전환체 조기 고정을 위한 약배양

형질전환체 조기 고정을 위한 약배양은 F₁ 식물체의 화분이 1핵기말~2핵기초 단계인 이삭을 채취하여 polyethylene film으로 간이 진공포장하여 12°C에서 15일간 저온 전처리 후 약치상을 하였다. 배지는 N₆-Y₁기본배지에 4% maltose를 첨가한 N₆-Y₂배지 (pH 5.8)에 0.5% Gelrite, 2 ppm NAA, 0.2 ppm kinetin을 첨가한 배지를 사용하였고 치상후 25±1°C, 암

조건을 유지하면서 배양하였다. 식물체 재분화를 위해서는 약치상 후 35~45일에 N₆-Y₂배지 (pH 5.8)에 0.8% Gelrite, 0.2 ppm IAA, 2 ppm kinetin을 첨가한 배지를 사용하였고 25±1°C, 1일 14시간 2,500 Lux 광조건 하에서 배양하였다. 약배양에서 재분화된 개체 (A₁)는 온실에 이양하여 관행에 준하여 재배한 후 A₂ 종자를 수확하였다.

약배양 재분화 개체 후대 계통 육성

온실에서 수확한 YR23235 (동진벼 Ds15/밀양165호)조합의 A₂ 세대 288 계통을 2001년 5월 17일에 파종하여 6월 10일에 30×15 cm 재식거리로 1주 1본 이양하였고, YR22513 (동진벼 Ds7/주남벼) 등 4 조합 A₂ 279 계통은 2002년 5월 17일에 파종하여 6월 6일에 같은 방법으로 이양하였다. 기타 재배법은 영남농업시험장 벼 표준재배법에 준하였다. 포장에 이양한 후 계통별로 PCR 분석을 이용하여 제초제저항성 계통을 선발하였으며, YR23235Acp31 등 초형, 출수기 등 주요 농업형질이 우수한 7 계통을 선발하여 모본들과 함께 생산력검정 시험에 공시하였다.

제초제저항성 검정

Polymerase chain reaction (PCR) 분석을 위하여 앞에서 genomic DNA는 McCouch et al. (1988)의 방법에 따라 추출하였고, Ds-GUS 특이 primer (Forward 5'-TTT TCG CGA TCC AGA CTG AAT GCC CAC AG-3', Reverse 5'-GGT TAA AGT CGA AAT CGG ACG-3')를 사용하였다. PCR 증폭조건은 94°C에서 30초, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분간 35회 반복한 다음 72°C에서 10분간 반응시켰다. 증폭된 산물은 1X TBE 용액에 ethidium bromide를 함유한 2% agarose 겔에 전기영동하여 밴드를 확인하였다. 또한 비선택성 제초제인 상업용 Basta를 권장농도인 0.3%로 희석하여 유묘에 엽면살포하고, 10일 후 고사여부를 조사하였다.

생산력검정 시험

YR23235 (동진벼 Ds15/밀양165호)조합에서 선발된 YR23235Acp31 등 7 계통과 모품종인 동진벼와 주남벼를 2002년 5월 8일에 파종하고, 6월 6일에 30×15 cm 재식거리로 1주 1본, 난괴법 3 반복으로 이양하였다. 시비는 N-P₂O₅-K₂O=11-4.5-5.7 kg/10a을 완효성 : 요소=70 : 30%로 혼합하여 전량 기비로 주었다. 기타 재배법은 영남농업시험장 표준재배법에 준하였으며, 이양 후 내병성, 출수기, 수량 등 주요 농업형질을 조사하였다.

결과 및 고찰

인공교배 및 약배양

제초제저항성 인자도입 후대 육성을 위하여 1999년 동계에 *bar* 유전자가 도입된 동진 Ds15를 모본으로 하고 주남벼를 부본으로 인공교배를 실시하여 39립의 교배립을 획득하였고, 2000년 하계에는 단간 양질 다수성 품종인 주남벼와 직파적응성이며 양질계통인 밀양178호를 모본으로 하고 동진 Ds3, 동진 Ds7, 동진 Ds15를 부본으로 한 4 조합을 인공교배하여 213립을 획득하여 총 252립의 F₁ 종자를 획득하였다 (Table 1).

Table 1. Artificial cross for production of F₁ plants harboring *bar* gene.

Cross no.	Cross combination	No. of F ₁ seeds	Remark
YR23235	Dongjin Ds15(Bar ^R)/ Milyang 165	39	'99/2000 winter
YR22511	Dongjin Ds 3(Bar ^R)/ Milyang 178	24	2000 summer
YR22512	Dongjin Ds15(Bar ^R)/ Milyang 178	61	2000 summer
YR22513	Dongjin Ds 7(Bar ^R)/ Milyang 165	56	2000 summer
YR22514	Dongjin Ds 3(Bar ^R)/ Milyang 165	72	2000 summer
Total		252	

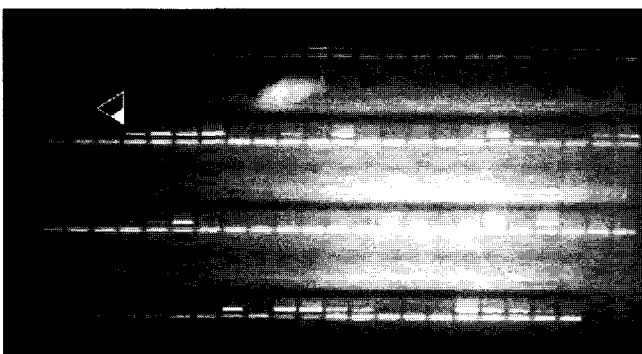


Figure 1. Selection of lines harboring herbicide resistant gene (*bar*) by PCR analysis in A₂ generation derived from anther culture (An arrow head indicate *bar* gene).

YR23235 조합 F₁ 39립을 2000년 5월17일 파종, 6월 10일에 이양하여 F₁ 개체양성을 하였으며, YR22511 등 4조합 F₁ 213립은 2000년 동계온실에서 F₁ 개체양성을 하였다. F₁ 식물체에서 제초제저항성 유전자 도입 여부를 확인하였으며, 이들을 이용하여 형질을 조기에 고정시키고자 약배양을 실시하였다. 약배양은 화분이 1핵기 말~2핵기 초의 발달단계에 있을 때 이삭을 채취하여 12℃에서 15일간 저온 전처리를 실시한 후, N₆-Y₂배지에 치상하였다. 치상 후 35~45일에 캘러스를 재분화 배지에 이식하였고, 재분화 개체 (A₁)는 수경재배 후 온실에 이양하여 A₂ 종자를 수확하였다.

식물체 재분화 및 제초제저항성 유전자 도입계통 선발

YR23235 등 5 조합에 대한 약배양 결과, 재분화 식물체 1,508 개체를 획득하여 식물체 재분화율은 평균 14.2%를 보였으며, 만수체를 제외한 567 개체 중에서 PCR 분석을 이용 제초제저항성 유전자가 도입된 227 개체 (40%)를 선발하였다 (Table 2, Figure 1).

제초제저항성 인자 도입 계통 육성 및 농업적 특성 검정

제초제저항성 인자 도입이 확인된 227 개체 중 임실율이 불량한 계통을 제외한 A₁ 169개체를 재종하였다. YR23235조합 83 계통을 2001년 5월 17일에 파종, 6월 10일에 이양하여 출수기 등 주요 농업형질이 우량한 A₂ 21계통을 선발하였고, 이 중 수량 및 도복관련 형질이 우수한 YR23235Acp31 등 7개의 유망계통을 선발하여 생산력검정 시험에 공시하였다. YR22511 등 4 조합 86 계통은 2002년 5월 17일에 파종하고 6월 6일에 이양하여 그 중 주요농업형질이 우량한 A₂ 21 계통을 선발하였다 (Table 3).

YR23235Acp31 등 7개의 유망계통들에 대한 생산력검정 예비시험 결과, YR23235Acp79 계통은 출수기가 8월 25일로 만생이고 간장은 65.8 cm로 단간, 수수형 초형에 쌀 수량이 557 kg/10a로 모품종인 동진벼 대비 17%, 주남벼 대비 5% 증수되었다. 이 결과를 근거하여 YR23235Acp79 계통은 제초제저항성 유전자가 도입되었으며 단간 내도복 양질이고, 영남지역 1모작 평야지에서 대표적인 품종인 주남벼와 동진벼에 비

Table 2. Regeneration and selection of plants harboring herbicide resistant gene (*bar*).

Cross no.	Cross combination	No. of Inoculated anthers	No. of regenerated plants (%)	No. of plants tested	No. of plants harboring <i>bar</i> gene (%)
YR23235	Dongjin Ds15/Junam	3,700	564 (20.9)	288	141 (49.0)
YR22511	Dongjin Ds 3/Milyang 178	1,300	177 (13.6)	37	4 (10.8)
YR22512	Dongjin Ds15/Milyang 178	2,700	320 (8.6)	69	25 (36.2)
YR22513	Dongjin Ds 7/Junam	1,700	291 (17.1)	46	23 (50.0)
YR22514	Dongjin Ds 3/Junam	1,200	156 (13.0)	127	34 (26.8)
Total		10,600	1,508 (14.2)	567	227 (40.0)

하여 수량성이 높은 우수한 계통임을 인정받아 “밀양 204호” 계통명이 부여되었다 (Table 4).

“밀양 204호”가 육성된 일련의 과정을 정리하면 Table 5와 같은데, 1999년 동계에 교배를 하여 2002년 동계에 “밀양 204호”로 계통명이 부여될 때까지 걸린 기간이 3년이였다. 본 체계는 동계에 온실을 운영하는 장점을 살리고, F₁ 세대에서 유전적인 고정을 조기에 이루고자 약배양을 실시하여 얻어진 결과로서, 형질전환식물체를 이용하여 목적하는 계통을 조기에 육성할 수 있는 체계가 확립된 것이며, 앞으로 또 다른 형질전환체를 이용한 계통육성에 크게 활용될 것으로 판단된다.

적 요

형질전환 식물체를 직접 이용하기에는 후대에 유전적인 고정 및 포장검정이라는 문제가 대두되는데, 이를 해결하기 위

하여 본 연구는 바스타저항성 유전자가 도입된 벼와 직파적응성 계통을 교잡한 후 약배양에 의한 형질전환체 고정 등 기존 육종체계와 연계하여 제초제 저항성 직파적응 계통을 조기에 육성할 수 있는 체계를 확립하고자 수행하였다. 제초제 저항성 직파적응 계통을 조기에 육성하고자 1999년 동계에 교배된 동진벼 Ds15 (Bar^R)/주남벼 등 5조합으로부터 2000년 F₁을 양성하고, 이들을 PCR 분석으로 제초제 저항성 유전자 *bar* 도입을 확인한 후 약배양을 실시하여 얻어진 1,508개의 재분화 식물체 중 제초제 저항성 유전자가 도입된 169개체 (A₂)에서 채종하였다. 이들을 2001년 포장에 공시하여 42계통을 선발하고, 2002년에 동진벼 Ds15 (Bar^R)/주남벼 조합에서 수량 등 주요 농업형질이 우수한 7계통을 생산력 검정시험에 공시한 결과 제초제 저항성이면서 직파적응성 등 기타 농업형질이 우수한 YR23235Acp79를 선발하여 밀양 204호로 계통명을 부여하였다. 결과적으로 형질전환체를 이용하여 교배부터 계통선발까지 3년 만에 목적하는 계통을 조기에 육성할 수 있는 생력육종체계가 확립되었다.

Table 3. Selection of elite lines harboring herbicide resistant gene (*bar*).

Cross no.	Cross combination	No. of lines	No. of selected lines	Remark
YR23235	Dongjin Ds15/ Milyang 165	83	21	'01 summer
YR22511	Dongjin Ds 3/ Milyang 178	4	1	'02 summer
YR22512	Dongjin Ds15/ Milyang 178	25	3	'02 summer
YR22513	Dongjin Ds 7/ Milyang 165	23	8	'02 summer
YR22514	Dongjin Ds 3/ Milyang 165	34	9	'02 summer
Total		169	42	-

사사 - 본 연구는 농촌진흥청 대형공동연구 및 과학기술부 21C 프론티어사업 작물유전체기능연구사업단(#CG161) 연구 결과의 일부이며 연구비 지원에 감사 드립니다.

Table 5. The breeding scheme of “Milyang 204” showing herbicide resistant as well as direct seeding adaptability.

Year	Breeding practice	Remark
'99/00 winter	Leading variety X Transformant line (Milyang 165) (Dongjin Ds)	Artificial cross
2000 summer	Anther culture(F ₁)	Genetic fixing
winter	Generation proceeding	A ₁ generation
2001 summer	Analysis, Selection	A ₂ generation
2002 summer	Yield trials, Selection of novel line	A ₃ generation

Table 4. Agronomic characteristics of selected lines on yield trial field.

Lines	HD	CL(cm)	PL(cm)	NP	NG	RG(%)	Rice yield (kg/10a)		
							Rough	Milled	Index (%) (D/J)
YR23235Acp31	8.6	75.4	20.7	13.4	95	88.0	670	500	106/95
YR23235Acp32	8.23	68.5	17.4	14	112	90.5	665	505	106/95
YR23235Acp42	8.12	75.8	21.1	10.9	122	90.8	624	504	105/95
YR23235Acp43	8.24	66.9	18.3	12.9	109	89.7	652	493	104/93
YR23235Acp44	8.23	62.7	18.2	11.8	97	88.0	714	541	114/102
YR23235Acp79 (Milyang204)	8.25	65.8	17.8	14.2	108	89.2	733	557	117/105
YR23235Acp82	8.17	59.7	17.6	10.7	95	88.0	627	466	98/88
Junam	8.25	61.6	19.9	11.4	104	88.8	703	530	111/100
Dongjin	8.27	78.7	19.3	12.3	97	92.8	629	478	100/90

HD: heading date, CL: culm length, PL: panicle length,

NP: number of panicles, NG: number of grains per panicle,

RG: ripened grain ratio, Index: milled rice yield compare to dongjin(D) and Junam(J).

인용문헌

- Akama K, Puchta H, Hon B (1995) Efficient Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the *bar* gene as selectable marker. *Plant Cell Rep* 14: 450-454
- Brar GS, Cohen BA, Vick CL, Johnson GW (1994) Recovery of transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants from elite cultivars utilizing ACCELL technology. *Plant J* 5: 745-753
- Chin HG, Choe MS, Lee SH, Park SH, Koo JC, Kim NY, Lee JJ, Oh BG, Yi GH, Kim SC, Choi HC, Cho MJ and Han CD (1999) Molecular analysis of rice plants harboring an Ac/Ds transposable element-mediated gene trapping system. *Plant J* 19: 615-624
- Choi KH, Jeon JH, Kim HS, Joung YH, Cho SJ, Lim YP and Joung H (1996) Development of herbicide-resistant transgenic potato. *J Plant Biotechnol* 23: 161-165
- Cho HS, Park BS, Kim JS, Jin YM and Kim HI (2001) Development of "basta" resistant Chinese cabbage by transfer of *bar* gene. *Kor J Breed* 33: 324-331
- Datta SK, Datta K, Soltanifar N, Donn G, Potrykus I (1992) Herbicide-resistant indica rice plants from IRRI breeding line 72 after PEG-mediated transformation of protoplasts. *Plant Mol Biol* 20: 619-629
- Eliseu S, Figueiredo LFA, Monte-neshich DC (1994) Transformation of potato (*Solanum tuberosum* cv Mantiqueira) using *Agrobacterium tumefaciens* and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Rep* 13: 666-670
- James C (2003) Global Review of Commercialized Transgenic Crops: 2002 Feature: Bt Maize. in ISAAA Briefs 29.
- Keertis SR, Vija KC, Thomas KH (1993) Use of *bar* as a selectable marker gene and for the production of herbicide-resistant rice plants from protoplasts. *Plant Mol Biol* 21: 871-884
- Kim SH (2002a) A trend of GMO related patent registration in Korea. *Curr Trend Health Ind Dev* 14: 67-71
- Kim YC (2002b) A trend of GM crop production. *Curr Trend Health Ind Dev* 14: 92-100
- McCouth SR, Kochert G, U ZH, Wang ZY, Khush GS, Coffman WR, Tanksley SD (1988) Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet* 76: 815-829
- Nehra NS, Chobbar RN, Leung N, Caswell K, Mallard C, Steinhauer L, Baga M, Kartha KK (1994) Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs. *Plant J* 5: 285-297
- Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Cramer R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygrosopicus*. *EMBO J* 6: 2519-2523
- Woo SS (2002) Development of Korean biotechnology at the early stage of industrialization. In: Organization Strategies for Korean Agricultural R&D Personnel and Increasing Competitiveness in Various Field of Agriculture. Symp Korean Association of Society for Agricultural Science, pp 153-166.

(접수일자 2003년 12월 2일, 수리일자 2003년 1월 30일)