

## 영산 유채를 이용한 형질전환체 생산

노경희<sup>1</sup> · 곽보경<sup>1</sup> · 김현욱<sup>1</sup> · 이경렬<sup>1</sup> · 김순희<sup>1</sup> · 서미정<sup>2</sup> · 김효진<sup>2</sup> · 김종범<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부, <sup>2</sup>전남대학교 바이오에너지공학과

### Production of Transgenic Plants in *Brassica napus* Winter Cultivar ‘Youngsan’

Kyung Hee Roh<sup>1</sup>, Bo-Kyoung Kwak<sup>1</sup>, Hyun Uk Kim<sup>1</sup>, Kyeong-Ryeol Lee<sup>1</sup>, Sun Hee Kim<sup>1</sup>, Mi Chung Suh<sup>2</sup>, Hyojin Kim<sup>2</sup>, and Jong-Bum Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biotechnology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Bioenergy Science & Technology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Republic of Korea

Received January 27, 2011; Accepted March 7, 2011

To improve genetic transformation of *Brassica napus* winter cultivar ‘Youngsan’, factors influencing shoot regeneration and transformation from cotyledonary petioles were investigated. Shoot induction was enhanced in the combination of 0.5 mg/L NAA and 2~4 mg/L kinetin. Silver nitrate was essential for successful shoot regeneration, ranging from 5 to 9 mg/L. The addition of GA<sub>3</sub> promoted plant regeneration. Among the tested *Agrobacterium* strains, co-cultivation times, and antibiotic selection regimes, choice of appropriate *Agrobacterium* strain was the most critical factor for efficient transformation of *B. napus* cv. ‘Youngsan’. The EHA105 succinamopine strain was the most efficient and the maximum transformation efficiency was 26.8%. Transgenic shoots were selected on 10 mg/L phosphinothricin (PPT) containing media. The transgenic plants expressing *bar* and *gus* genes were resistant for commercial herbicide “Basta” and stained with X-Gluc. Southern blot hybridization indicated that the presence of one to three *gus* gene copies per genome and inheritance of the *gus* gene into the T<sub>1</sub> generation.

**Key words:** *Brassica napus*, regeneration, transformation, Winter cultivar

#### 서 론

유채(*Brassica napus*)는 유럽, 캐나다 그리고 아시아 전역에서 골고루 분포되어 널리 재배되고 있다. 유채는 춘파(春播)재배와 추파(秋播)재배가 모두 가능하며, 국내에서는 제주지역과 일부 남부지역에서 추파재배가 이루어지고 있는 실정이다.

유채의 활용범위를 살펴보면, 종자기름은 식용유 및 바이오디젤 원료로 쓰이며, 꽃은 지역 축제 행사를 통해 관광자원으로 이용되고 있으며, 최근 박(粕)은 동물사료로 사용되고 있다.

지금까지 국내에서의 유채 품종 개량은 교잡육종에 의해서만 이루어져 왔으며, 최근 생명공학기술이 발달함에 따라 유채에서 분자육종이 가능하게 되었다. 실질적으로, 분자육종에 의해 유채 종자내 중쇄지방산인 Lauric acid 함량이 50%까지 증대된

연구결과가 보고되었으며[Voelker 등, 1996], 이는 단일유전자에 의해 형질이 우수하게 개량된 분자육종의 대표적 성공사례이기도 하다. 이러한 분자육종을 하기 위해서는 형질전환이 잘 되어야 한다. 유채 형질전환은 1987년에 처음 보고된[Fry 등] 이후, De Block 등[1989]과 Moloney 등[1989]에 의해 본격적으로 연구가 시작되었다. 이후 유채 형질전환에 영향을 미치는 인자들에 대한 연구가 꾸준히 이루어졌으며, 이 중 재분화율, 식물의 유전자형, 아그로박테리움의 종류, 감염방법 등이 중요한 인자로 이해되고 있다[Poulsen, 1996; Damgaard 등, 1997; Bhalla와 Singh, 2008].

이제까지 보고된 유채 형질전환 연구에는 대부분 유럽에서 육성된 춘파품종(Spring-type)이 사용되었다. 특히, ‘Westar’는 형질전환 효율이 높아 가장 많이 사용되고 있다[Poulsen, 1996]. 하지만 이러한 품종들은 국내 재배환경과 맞지 않아 분자육종의 재료로 사용하기가 어렵다.

우리는 국내 육성 품종 중 올레인산 함량이 높아 바이오디젤 원료로 사용하기에 적합하고, 수량성이 좋은 ‘영산’ 품종을 선정하여 형질전환 하였다. Bhalla와 Singh[2008]의 방법에 준

\*Corresponding author

Phone: +82-31-299-1702; Fax: +82-31-299-1707

E-mail: Jong9571@korea.kr

하여 형질전환을 한 결과, 형질전환 효율이 0.1~1%로 매우 낮았다. 이것은 ‘영산’이 추파품종에 속하며, 유럽 육성 품종들과는 다른 유전자형을 갖고 있기 때문일 것으로 사료된다.

따라서, 본 연구는 ‘영산’ 품종의 형질전환 효율 향상을 위해 재분화가 잘 되는 식물생장호르몬 조건을 구명하였다. 그리고 ‘영산’ 품종의 유전자형과 상호반응이 높은 아그로박테리움 계통(Strain)과 농도 조건을 조사하였다.

### 재료 및 방법

**식물재료.** 농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물센터에서 육성한 고정종(OP; Open pollination)인 ‘영산’을 분양 받아 실험에 사용하였다.

**종자소독과 재료육성.** 종자를 70% 에탄올에 4분간 침지한 후, 1.3% 차아염소산나트륨(NaClO) 용액을 넣고 30분간 소독한다. 멸균수로 5번 세척한 다음, 멸균된 여과지 위에 종자를 올려 놓고 수분을 제거한다. 멸균된 종자는 발아배지(Table 1)에 치상하였고, 재료는 25±1°C가 유지되는 배양실에서 3일간 암배양 한 후 2일간 명배양 조건에서 육성하였다.

**배지조제.** MS배지[Murashig와 Skoog, 1962]에 설탕(삼양사)을 농도에 맞게 첨가한 후 pH를 5.7로 조정한 후, 배지 응고제를 해당 농도에 맞게 첨가하고 고압 멸균하였다. 식물생장호르몬, Acetosyringone 및 질산은(AgNO<sub>3</sub>)은 보통 1000배액으로 만든 후 여과 살균하였고, 배지를 대략 60°C로 식힌 후 적정량을 첨가하였다.

**아그로박테리움 Strain과 Plasmid.** 상이한 Opine과 Ti-plasmid를 갖는 *Agrobacterium tumefaciens* 3종이 사용되었고, 여기에는 pCAMBIA3301 운반체가 내포되었다(Table 2). pCAMBIA3301은 phosphinothricin (PPT)에 저항성을 나타내는 Bar 유전자와 β-glucuronidase (Gus) 유전자를 포함하며, 각

의 유전자는 양방향의 Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S 프로모터에 의해 작동한다. 이 때, GUS 유전자는 Castor bean 유래 카탈라아제 효소의 Intron을 포함하고 있어 아그로박테리움 안에서 발현되지 않는다.

**형질전환.** 아그로박테리움은 Kanamycin 100 mg/L과 Rifampicin 50 mg/L이 첨가된 LB배지에 접종하여 섭씨 28도가 유지되는 회전배양기에서 최소 16시간 이상 배양하였다. 원심분리 하여 모아진 균은 설탕(삼양사) 3%가 첨가된 MS 액체배지를 첨가 하면서 적정 농도로 맞추어 사용하였는데, 이 때 균 농도는 분광광도기(Beckman, Brea, CA)의 흡광도(Absorbance) 600에서 조사되었다. 균 접종액에 Acetosyringone을 200 μM이 되도록 첨가한 후 성장점 부위가 제거된 자엽 부착 잎자루(Cotyledonary petiole)를 넣고 10분간 침지한 후 공동배양매지로 옮겨 25±1°C가 유지되는 항온기에서 3일간 암배양 하였다. 공동배양이 끝난 절편체는 선발배지로 옮겨져 25±1°C가 유지되는 배양실에서 2주 간격으로 계대배양 되었고, 캘러스를 거쳐 재분화된 줄기는 뿌리유기배지로 옮겨져 배양하였다.

**GUS 활성조사.** Jefferson[1987]의 방법에 준하여, 형질전환 처리과정을 거친 식물절편(Cotyledonary petiole)의 끝부분에서 캘러스가 형성되는 배양 4주째에 GUS 활성을 조사하였다. 식물 절편을 GUS 염색액(1 mM X-gluc, 100 mM Phosphate buffer, 1 mM Potassium ferricyanide, 1 mM Potassium ferrocyanide)에 담근 후, 37°C가 유지되는 항온기에서 24시간 반응하였다. 잎자루 끝부분에 형성된 캘러스 또는 비대조직에 푸른색 반점(Spot)이 있으면 그 식물개체는 GUS 활성이 있다고 판단하였으며, 이 때 반점의 강약은 따로 구분하지 않았다.

**통계분석.** 모든 실험은 독립적으로 최소 3번 이상 수행되었으며, 매 실험마다 처리별 최소 2반복이상 하였다. 식물생장호르몬 처리간 평균값의 유의성은 Duncan의 다중검정으로 확인하였고, 아그로박테리움의 Strain과 농도별 처리간 평균값의 유

**Table 1. Media used in this experiment for transformation**

Medium	Composition (per liter)	Description
A	0.5X MS basal medium (including vitamins), Sucrose 30 g and plantagar 5 g	Seed germination, plantlet growth, Root formation
B	1X MS basal medium, Sucrose 20 g and phytagel 4 g; after autoclave, add filter-sterilized 200 μL Acetosyringone (stock, 1 M), 100 μL Kinetin (stock, 1 mg/mL), 200 μL NAA (stock, 1 mg/mL), 700 μL AgNO <sub>3</sub> (stock, 10 mg/mL) and 100 μL GA <sub>3</sub> (stock, 0.1 mg/mL)	Cocultivation of Brassica explants with <i>Agrobacterium</i> for 3 days in the dark at 25±1°C
C	1X MS basal medium, Sucrose 20 g and phytagel 4g; after autoclave, add filter-sterilized 300 μL Kinetin (stock, 1 mg/mL), 500 μL NAA (stock, 1 mg/mL), 700 μL AgNO <sub>3</sub> (stock, 10 mg/mL) and 100 μL GA <sub>3</sub> (stock, 0.1 mg/mL), 1 mL PPT (stock, 10 mg/mL) and 2 mL Carbenicillin (250 mg/mL)	Callus induction and shoot initiation; Transformant selection
D	1X MS basal medium, Sucrose 20 g and phytagel 4 g; after autoclave, add filter-sterilized 100 μL Kinetin (stock, 1 mg/mL), 100 μL NAA (stock, 1 mg/mL), 700 μL AgNO <sub>3</sub> (stock, 10 mg/mL) and 100 μL GA <sub>3</sub> (stock, 0.1 mg/mL), 1 mL PPT (stock, 10 mg/mL) and 2 mL Carbenicillin (250 mg/mL)	Shoot outgrowth; Transformant selection

**Table 2. *A. tumefaciens* strains and their characteristics**

Strain	Chromosomal Background	Ti plasmid	Opine <sup>a</sup>	Reference
LBA4404	TiAch5	pAL4404	Octopine	Hoekema <i>et al.</i> (1983)
GV3101	C58	pMP90 (pTiC58 ΔT-DNA)	Nopaline	Koncz and Shell (1986)
EHA105	C58	pEHA105 (pTiBo542 ΔT-DNA)	Succinamopine	Hood <i>et al.</i> (1993)

<sup>a</sup>Grouped according to the opine catabolism of the original progenitor wild-type strain and/or non-disarmed parental Ti plasmid

의성은 Student의 t-검정으로 확인하였다.

**Southern hybridization.** 형질전환 과정을 거쳐 재분화 된 식물체로부터 분리한 Genomic DNA 10 µg을 *Hind* III(식물체 핵 내로 삽입되는 Border내에 존재하는 단일 제한효소)로 처리하였다. 길이 12 cm가 되는 0.8% Agarose gel을 이용하였으며, 전압 23 V에서 21시간 동안 천천히 전기영동 하였다. 0.25 N HCl 용액에 10분간 담가 Depurination 하였고, 0.4 N NaOH 용액으로 막 전이를 하였다. Probe는 GUS 유전자의 일부 (Forward: 5'-AACCACGCGTCTGTTGACTGGCAGGTG-3'; Reverse: 5'-CCACGCTTGGGTGGTTTTGTCACGCG-3', 625 bp)와 Ready-To-Go™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ)와 방사선동위원소( $\gamma$ -<sup>32</sup>P-labelled deoxyribonucleoside triphosphate)을 사용하여 만들었다. 65°C가 유지되는 배양기에서 40 rpm 속도로 회전하며 밤새 Hybridization 하였다. 세척과정(2X SSC/0.1% SDS, 10분간 2반복; 0.2X SSC/0.1% SDS, 10분간 2반복)을 거친 후 X-ray 필름에 노출시켜 확인하였다.

## 결 과

**재분화.** ‘영산’ 유체의 재분화를 향상시키기 위해 여러 종류의 식물생장호르몬을 단독 또는 혼용하여 처리한 결과, Auxin과 Cytokinin을 혼용(1-naphthaleneacetic acid (NAA)와 6-benzylaminopurine (BAP) 또는 NAA와 Kinetin) 첨가하였을 때 재분화가 잘 되는 것을 관찰하였으며(Table 3), 2,4-D, Zeatin 그리고 Indole-3-acetic acid (IAA) 첨가는 재분화에 효과가 없는 것으로 관찰되었다(Data not shown). 캘러스는 전반적으로 모든 처리구에서 잘 형성되었으며, 캘러스 색 또한 대체적으로 녹색을 띄었다. 처리구 4~6에서는 노란색의 캘러스가 다른 처리구에 비하여 많이 발생하였으며, 이 캘러스는 줄기로 재분화가 되지 않고 계속 캘러스 상태로 유지하다가 결국 갈색으로 변하며 조직이 괴사하는 특징을 보였다. 줄기형성은 BAP가 첨가된 처리구에 비해 Kinetin이 첨가된 처리구가 더 양호하였다. 특히, 처리구 7~9에 해당하는 NAA 0.5 mg/L 첨가구가

NAA 1.0 mg/L 첨가구보다 줄기형성율이 좋았다. 개체당 형성되는 줄기수는 전반적으로 평균 1~2개 정도 형성되었고, 처리구 간 큰 차이는 없는 것으로 간주하였다. AgNO<sub>3</sub> 첨가가 재분화에 미치는 영향을 살펴보면 줄기 재분화에는 AgNO<sub>3</sub>가 반드시 필요하였다(Table 4). AgNO<sub>3</sub>의 경우 농도는 적어도 5 mg/L 이상이 적합하였고, 최고 9 mg/L까지 첨가하여 재분화가 이루어지는 것을 관찰하였으며, 농도와 재분화율이 비례하는 상관관계는 관찰되지 않았다. 이 외에도 GA<sub>3</sub>를 0.01 mg/L 첨가할 경우 재분화에 긍정적인 효과가 있는 것으로 조사되었으며, 농도를 0.05 mg/L 이상 첨가하면 재분화율이 감소하는 부정적인 효과가 관찰되었다.

**형질전환.** 영산 유체의 자엽 부착 잎자루 부위(Cortyledonary petiole)를 아그로박테리움에 감염시킨 후 GUS 염색을 통해 형질전환 유무를 판단하여 형질전환효율을 살펴보았다(Fig. 1a). 형질전환 과정에서 사용한 배지는 Table 3과 같다. 영산 유체의 형질전환 효율 향상을 위해 서로 다른 Opine과 Ti-plasmid를 가지고 있는 3종의 아그로박테리움을 사용하였다(Table 2). Table 5의 결과를 보면, 아그로박테리움 계통 중 Succinamopine을 갖는 EHA105가 영산 유체에 형질전환을 가장 잘 되게 하였고, 아그로박테리움의 농도가 높으면 높을수록 형질전환율이 평균 10%대에서 평균 20%대로 증가하는 것으로 조사되었다. Nopaline을 갖는 GV3101은 농도 0.3~0.5에서 형질전환율이 평균 10%대로 양호하였다. Octopine을 갖고 있는 LBA4404는 모든 농도에서 형질전환율이 0%로 조사되었다.

**형질전환체 육성과 유전분석.** 아그로박테리움에 감염된 식물 절편은 항생제 PPT가 첨가된 선발배지로 옮겨져 2주마다 계대 배양을 하면서 캘러스, 줄기 및 뿌리를 유지하였다(Fig. 1a-c). 재분화된 형질전환체는 순화과정을 거쳐 원예용 상토가 담긴 포트에 이식되어 온실에서 육성되었고, 개화 및 종자형성에 이르기까지 정상적으로 생육하는 것을 관찰 하였다(Fig. 1d,e). 형질전환된 Bar 유전자와 GUS 유전자가 후대(T<sub>1</sub>세대)로 유전되는 것을 확인하였다(Fig. 2). Bar 유전자가 들어간 후대 형질전환체는 유묘기(본엽 1-2매)에 0.5% 바스타액제(글루포시네이트

Table 3. Effect of plant growth regulator on *in vitro* regeneration of *B. napus* cv. ‘Youngsan’

Treatment	Growth regulator (mg/L)		Shoot induction (%)	Number of shoot per explant (cm)	Callus induction (%)	Color of callus (%)		
						Dark green	Green	Yellow
1	NAA 0.5	BAP 2	28 <sup>f</sup>	1.6 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	0	42	58
2		BAP 3	43 <sup>def</sup>	1.7 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	0	96	4
3		BAP 4	31 <sup>f</sup>	1.1 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	8	92	0
4	NAA 1.0	BAP 2	35 <sup>f</sup>	1.6 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	6	82	12
5		BAP 3	50 <sup>bcd</sup>	1.9 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	0	80	20
6		BAP 4	36 <sup>f</sup>	1.1 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	0	78	22
7	NAA 0.5	Kinetin 2	71 <sup>abc</sup>	1.7 <sup>ab</sup>	96 <sup>a</sup>	4	96	0
8		Kinetin 3	61 <sup>abc</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	97 <sup>a</sup>	4	84	8
9		Kinetin 4	68 <sup>abc</sup>	1.5 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	28	72	0
10	NAA 1.0	Kinetin 2	47 <sup>c</sup>	1.1 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	0	90	10
11		Kinetin 3	76 <sup>abc</sup>	1.4 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	0	92	8
12		Kinetin 4	60 <sup>abc</sup>	1.4 <sup>ab</sup>	100 <sup>a</sup>	8	84	8

Growth regulator was added into the regeneration medium (MS medium+3% Sucrose+5 mg/L AgNO<sub>3</sub>+0.01 mg/L GA<sub>3</sub>+0.4% Phytigel)

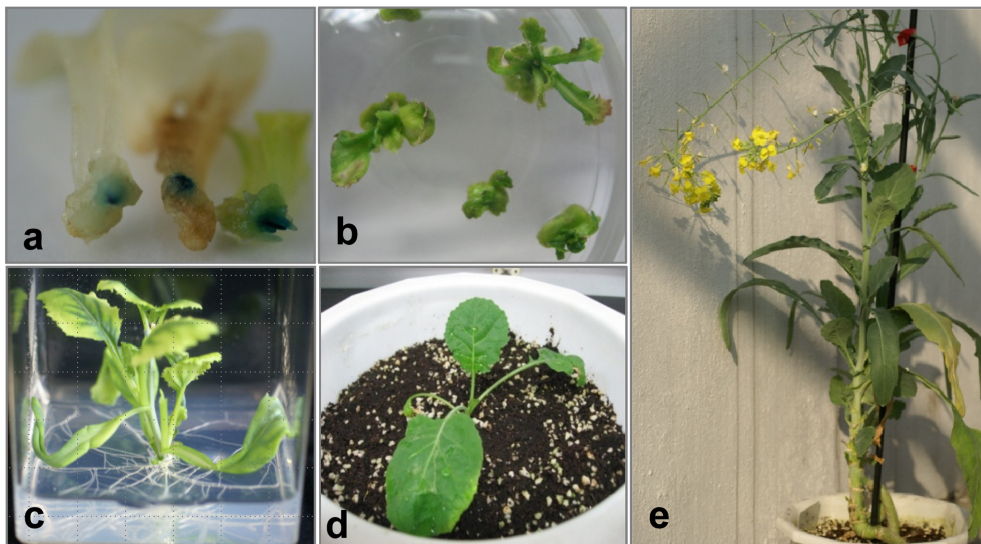
<sup>abc</sup> Duncan's multiple range tests at the alpha level 5%

**Table 4. Effect of AgNO<sub>3</sub> and GA<sub>3</sub> on *in vitro* regeneration of *B. napus* cv. ‘Youngsan’**

AgNO <sub>3</sub> (mg/L)	GA <sub>3</sub> (mg/L)	Number of explant	Shoot induction (%)	Callus induction (%)	Color of Callus <sup>a</sup>
0	0	61	1.6	86.9	YG
	0.01	45	0.0	93.3	B
	0.05	46	0.0	84.8	B
	0.1	53	0.0	58.5	B
1	0	89	12.1	100	YG
	0.01	80	18.8	85.0	DG
	0.05	45	4.4	77.8	DG
	0.1	62	0.0	85.5	G
3	0	72	15.6	86.1	YG
	0.01	36	8.3	91.7	G
	0.05	70	7.1	74.3	G
	0.1	45	6.7	95.6	G
5	0	45	18.0	93.3	G
	0.01	33	20.8	100	G
	0.05	47	2.1	91.5	G
	0.1	36	11.1	94.4	DG
7	0	36	27.8	100	G
	0.01	29	37.9	100	DG
	0.05	42	2.4	71.4	DG
	0.1	36	2.8	100	G
9	0	35	20.0	68.6	DG
	0.01	27	29.6	100	DG
	0.05	36	2.8	97.2	DG
	0.1	36	2.8	72.2	B

AgNO<sub>3</sub> and GA<sub>3</sub> were added into the regeneration medium (MS medium+3% Sucrose+0.5 mg/L NAA+2.0 mg/L BAP+0.4% Phytigel)

<sup>a</sup>B: Brown; DG: Dark Green; G: Green; YG: Yellow Green



**Fig. 1. Production of transgenic plant from *B. napus* cv. ‘Youngsan’.** (a) GUS expression in the expanded tissue at the cut surface of the cotyledonary petiole. (b) Shoot regenerated on medium containing L-phosphinothricin (10 mg/L). (c) A fully developed GUS<sup>+</sup> plant. (d) A transplanted GUS<sup>+</sup> plant. (e) Flowering and seed maturation of a GUS<sup>+</sup> plant.

암모늄염제를 살포하여 약해가 전혀 없는 개체임을 확인하였다(Data not shown). Bar 유전자가 들어있는 후대 형질전환체 내 GUS 유전자는 Southern 분석을 통해 개체별 1~3 copy가 존재하는 것을 확인하였다(Fig. 2a). 아그로박테리움을 통해 식물체 핵 안으로 들어갈 거라고 추정하는 Binary vector안의 삽

입부위(LB~RB)는 약 6.2 kb에 해당되고, Hind III로 잘려진 GUS 유전자의 시스트론 부위는 약 2.9 kb에 해당된다(Fig. 2b). Southern 분석에 의해 검출된 밴드는 모두 4 kb 이상의 크기에 해당되었고, 이는 GUS 유전자의 시스트론 부위가 온전하게 식물체의 핵내로 전이되었을 거라고 추정케 한다.

**Table 5. Effect of the *Agrobacterium* strains on transformation of *B. napus* cv ‘Youngsan’, based on percentage of explants stained blue by using X-gluc**

Agrobacterium Strain <sup>a</sup>	Density of OD <sub>600 nm</sub>				Average
	0.1	0.3	0.5	0.7	
EHA105	13.7 <sup>b±4.7<sup>c</sup></sup>	12.3±4.3	19.6±1.0	21.9±4.9	16.9**
GV3101	4.5±1.9	9.5±4.8	13.9±3.6	3.8±1.5	7.9**
LBA4404	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0**

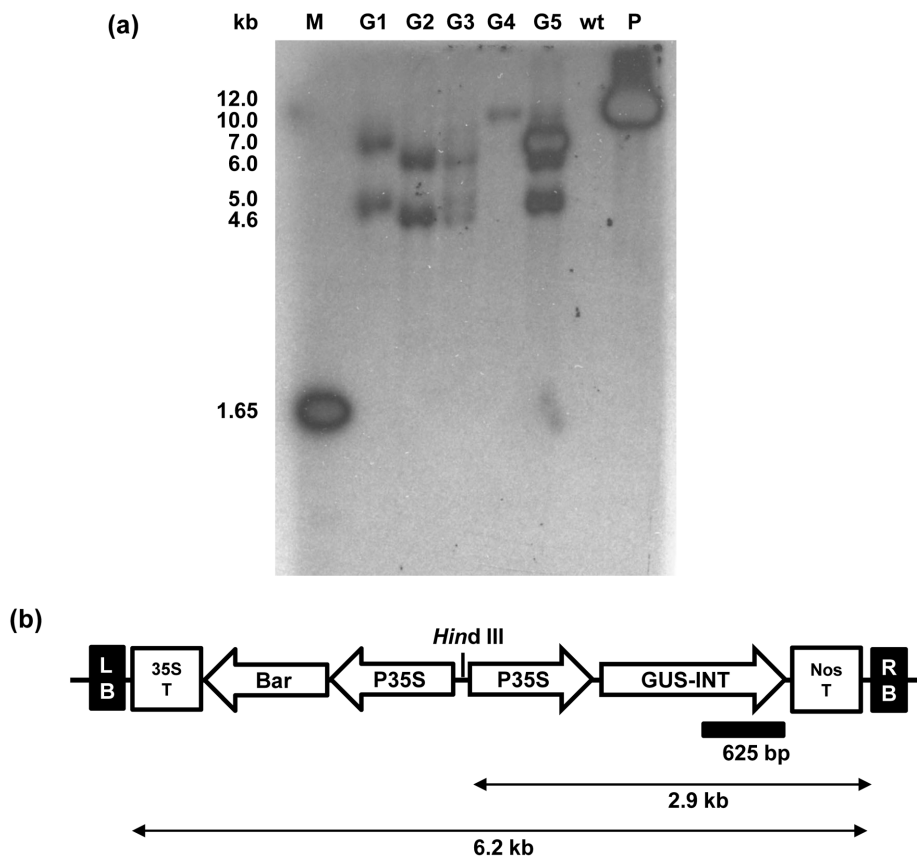
<sup>a</sup> Strains harboring pCAMBIA3301 were grown for 18 hr in LB medium containing 200 μM acetosyringone and 100 μg/mL kanamycin

<sup>b</sup> Data represent the mean of three or more independent experiment

<sup>c</sup> Numbers are standard errors

Upper diagonal represents t-values

\*\* Significant at 1% level



**Fig. 2. Southern blot analysis of transgenic GUS<sup>+</sup> plants from *B. napus* cv. ‘Youngsan’.** (a) DNA from transgenic plants (lane 2-6), wild type plant (lane 7) and vector of pCAMBIA3301 (lane 8) were digested with *Hind* III. Sizes in kb of the Marker (1-kb plus ladder, invitrogen) are shown to the left of the panel. (b) T-DNA region of binary plasmid pCAMBIA3301. Arrows indicate the direction of transcription. The localization of the GUS probe (625 bp) is shown. P: vector of pCAMBIA3301; LB: Left border; P35S: CaMV 35S promoter; 35ST: CaMV 35S polyA; NosT: nopaline synthase terminator; Bar: phosphinotricin acetyltransferase; GUS INT: β-glucuronidase with a catalase intron.

**고 찰**

Brassica 속(屬) 작물의 유전자형에 따른 재분화 양상은 매우 다양하다고 알려져 있으며[Narasimhulu와 Chopra, 1988; Chi 등, 1990], 동일 종(種) 내에서도 유전자형과 식물생장호르몬의 배합에 따라 재분화율이 0~100%로 큰 차이가 있다고 보고된 바 있다[Zhang 등, 1998; Kamal 등, 2007; Munir 등, 2008]. 또한 Brassica 속(屬) 작물의 재분화에는 에틸렌 저해제로 알려져 있는 AgNO<sub>3</sub>가 반드시 필요하다고 보고되었다[Chi 등, 1990; Williams 등, 1990]. 일반적으로 유채 재분화에 가장 많이 사용

되고 있는 식물생장호르몬은 NAA와 BAP가 혼용되어 첨가된다. 본 실험에서는 ‘영산’ 유채의 경우 NAA와 BAP의 혼용보다 NAA와 Kinetin의 혼용 첨가구에서 재분화가 더 잘되는 것을 알 수 있었다. 이것은 국내에서 육성된 ‘영산’ 유채의 독특한 유전자형에 기인한 것으로 사료된다. Brassica 속(屬) 작물인 ‘영산’ 유채 또한 AgNO<sub>3</sub>가 첨가되어야만 재분화가 이루어졌으며, GA<sub>3</sub> 첨가는 재분화에 긍정적인 효과가 있는 것으로 조사되었으나, 필수적인 요인은 아닌 것으로 사료된다. 토마토 재분화[Roh 등, 2010]에 있어 줄기형성에 효과적이라고 알려져 있는 항산화제인 Ascorbic acid와 Cystein을 첨가하여 ‘영산’ 유

채의 재분화 양상을 살펴본 결과, 유의성 있는 효과가 관찰되지 않았다. 뿌리유기는 줄기와 잎이 완전한 형태를 갖추고 있으면 통상적으로 5~14일 이내에 정상적으로 이루어졌다.

‘영산’ 유채의 형질전환 효율 향상을 위해 재료부위(자엽, 하배축, 자엽 부착 잎자루), 공동배양기간(2-7일), 아그로박테리움의 종류와 농도 그리고 초기 선발단계에서의 PPT농도(5-10 mg/L) 등 다양한 인자를 탐색한 결과, 아그로박테리움의 종류와 농도가 가장 큰 영향을 주는 것으로 관찰되었다. 이제까지의 유채 형질전환 관련 연구를 보면 주로 Nopaline과 Octopine type의 Opine을 갖는 *A. tumefaciens*이 이용되었는데, 대체적으로 Nopaline type을 갖는 GV3101을 이용하여 형질전환체를 얻었고[Poulsen, 1996; Damgaard 등, 1997; Bhalla와 Singh, 2008; Kim 등, 2010], Moloney 등[1989]은 Succinamopine type의 Opine을 갖는 EHA101을 이용하여 ‘Westar’유채의 형질전환율이 55%였다고 보고하였다. 그리고, Damgaard 등[1997]은 Octopine type인 LBA4404를 사용하여 유채에 형질전환 한 결과, 춘파품종에서의 형질전환율은 4~8%였고, 추파품종에서는 대부분 형질전환율이 0%였다고 보고하였다. 본 실험에서 ‘영산’ 유채는 Succinamopine type을 갖는 EHA105에 가장 민감하게 반응하였으며, 농도가 높을수록 형질전환이 잘 되는 경향을 보인 반면, Octopine type의 LBA4404는 ‘영산’ 유채의 형질전환에 사용하기가 적합하지 않은 것으로 사료되었다. 이러한 결과는 앞에서 언급한 연구결과들과 대체적으로 일치하는 경향을 보이는 것으로 사료되었다. 재료부위에 따른 형질전환 효율은 하배축>자엽 부착 잎자루>자엽 순으로 조사되었으나, 하배축의 경우 캘러스로부터 줄기가 형성되는 데 소요된 배양 일수가 30~120일 정도로 길고, 변이 폭이 큰 특징이 있는 반면, 자엽 부착 잎자루는 평균 30~60일 정도로 짧고, 비교적 변이 폭이 작아 ‘영산’ 유채의 형질전환 재료로 사용하기에 적합하다고 판단하였다. 이것은 Babic 등[1998]이 보고한 *Brassica carinata*의 형질전환에서 자엽 부착 잎자루를 이용하였을 때 형질전환체의 재분화가 잘 되며, Moloney 등[1989]이 발표한 *B. napus* cv ‘Westar’의 자엽 부착 잎자루에서 재분화율이 80% 이상 높았다는 연구결과와 일치하였다. 공동배양기간에 따른 ‘영산’ 유채의 형질전환 효율을 살펴본 결과 큰 차이가 없는 것으로 조사되었으며, 우리 실험실에서는 실험여건에 따라 2~4일정도 공동배양하고 있다. 참고적으로 ‘Westar’유채의 경우 공동배양기간에 따라 형질전환 효율이 민감하게 반응한다고 보고된 바 있다[Cardoza와 Stewart, 2003]. 형질전환 과정의 초기 선발 단계에서 항생제 농도가 높으면 형질전환된 식물세포의 증식 및 분화가 억제된다는 연구결과가 보고된 바 있다[Chang과 Schmidt, 1991; Schreuder 등, 2001]. 그래서 우리는 공동배양이 끝난 ‘영산’ 유채의 절편을 PPT가 첨가되지 않은 배지에서 1주일간 배양한 후, PPT 5 mg/L가 첨가된 선발배지에서 배양하다가 줄기가 형성되고 나면 PPT 10 mg/L가 첨가된 선발배지로 옮겨 배양하면서 완전 재분화 개체를 획득하였다. 그러나 이렇게 하여 얻어진 개체의 형질전환 유무를 검정한 결과, 평균 50% 이상이 비형질전환체로 확인되었으며, 형질전환 효율에 있어서도 초기단계에서부터 PPT 10 mg/L가 첨가된 선발배지에서 배양한 처리군과 큰 차이가 없는 것으로 나타났다.

## 초 록

국내 육성 추파 품종인 ‘영산’ 유채의 자엽 부착 잎자루 부위를 이용하여 재분화와 형질전환의 효율 증진에 영향을 주는 요인을 살펴보았다. 줄기 형성율은 NAA 0.5 mg/L와 Kinetin 2~4 mg/L가 혼용 첨가된 배지에서 61~71%로 가장 양호하였다. 또한 질산은(Silver nitrate) 5~9 mg/L 첨가는 재분화에 필수적이었고, GA<sub>3</sub> 0.01 mg/L 첨가는 재분화에 긍정적인 영향을 주는 것으로 관찰되었다. 아그로박테리움의 Strain 종류, 공동배양 시간, 그리고 형질전환체 초기 선발시 항생제 농도 조절(저→고농도)에 따른 ‘영산’ 유채의 형질전환 효율을 살펴본 결과, 아그로박테리움의 Strain 선정이 가장 중요한 요인으로 조사되었다. 특히, EHA105 succinamopine strain을 사용하였을 때 형질전환 효율이 26.8%로 가장 효과적이었다. Bar 유전자와 GUS 유전자가 내재된 형질전환체는 제초제 ‘바스타’ 살포시 생존하고, X-Gluc으로 염색되었다. 그리고 Southern 분석을 통해 후대로 유전자가 안정적으로 유전됨을 확인하였다.

**Key words:** *Brassica napus*, regeneration, transformation, Winter cultivar

## 감사의 글

본 논문은 2011년도 농촌진흥청 국립농업과학원의 기관고유사업(PJ006704) 지원에 의해 이루어졌으며 이에 심심한 감사를 드립니다.

## 참고문헌

- Babic V, Datla RS, Scoles GJ, and Keller WA (1998) Development of an efficient *Agrobacterium*-mediated transformation system for *Brassica carinata*. *Plant Cell Rep* **17**, 183-188.
- Bhalla PL and Singh MB (2008) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. *Nat Protocol* **3**, 181-189.
- Cardoza V and Stewart CN (2003) Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyls segment explants. *Plant Cell Rep* **21**, 599-604.
- Chang CC and Schmidt DR (1991) Initiation and proliferation of carrot callus using a combination of antibiotics. *Planta* **185**, 523-526.
- Chi GL, Barfield DG, Sim GE, and Pua EC (1990) Effect of AgNO<sub>3</sub> and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. *Plant Cell Rep* **9**, 195-198.
- Damgaard O, Jensen LH, and Rasmussen OS (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Brassica napus* winter cultivars. *Transgenic Res* **6**, 279-288.
- De Block M, De Brouwer D, and Tenning P (1989) Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo* genes in the transgenic plants. *Plant Physiol* **91**, 694-704.

- Fry J, Barnason A, and Horsch RB (1987) Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium tumefaciens* based vectors. *Plant Cell Rep* **6**, 321-325.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, and Schilperoort RA (1983) A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**, 179-180.
- Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, and Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res* **2**, 208-218.
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol Bio Rep* **5**, 387-405.
- Kamal GB, Illich KG, and Asadollah A (2007) Effects of genotype, explants type and nutrient medium components on canola (*Brassica napus* L.) shoot *in vitro* organogenesis. *African J Biotechnol* **6**, 861-867.
- Kim H, Lee H, Go YS, Roh KH, Lee YH, Jang YS, and Suh MC (2010) Development of herbicide-tolerant Korean rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars. *J Plant Biotechnol* **37**, 319-326.
- Koncz C and Schell J (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* **204**, 383-396.
- Moloney MM, Walker JM, and Sharma KK (1989) High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Rep* **8**, 238-242.
- Munir M, Rashid H, Chaudhry Z, and Bukhari MS (2008) Callus formation and plantlets regeneration from hypocotyls of *Brassica napus* by using different media combinations. *Pak J Bot* **40**, 309-315.
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**, 473-497.
- Narasimhulu SB and Chopra VL (1988) Species specific shoot regeneration response of cotyledonary explants of Brassicas. *Plant Cell Rep* **7**, 104-106.
- Poulsen GB (1996) Genetic transformation of *Brassica*. *Plant Breeding* **115**, 209-225.
- Roh KY, Lee KJ, Park JS, Kim JB, Lee SB, and Suh SC (2010) Effect of cultivar and ascorbic acid on *in vitro* shoot regeneration and development of bombardment-mediated plastid transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J Plant Biotechnol* **37**, 77-83.
- Schreuder MM, Raemakers CJJM, Jacobsen E, and Visser RGF (2001) Efficient production of transgenic plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Euphytica* **120**, 35-42.
- Voelker TA, Hayes TR, Cranmer AM, Turner JC, and Davies HM (1996) Genetic engineering of a quantitative trait: metabolic and genetic parameters influencing the accumulation of laurate in rapeseed. *The Plant J* **9**, 229-241.
- Williams J, Pink DAC, and Biddington NL (1990) Effect of silver nitrate on long-term culture and regeneration of callus from *Brassica oleracea* var. gemmifera. *Plant Cell Tiss Org* **21**, 61-66.
- Zhang FL, Takahata Y, and Xu JB (1998) Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) (1998) *Plant Cell Rep* **17**, 780-786.