

국내 밀 43개 품종에 대한 아그로박테리움 형질전환 효율성 검정

Comparison of Agrobacterium-mediated Transformation Efficiency in 43 Korean Wheat Cultivars

김재윤¹

Jae Yoon Kim
공주대학교
식물자원학과

이건희¹

Geon Hee Lee
공주대학교
식물자원학과

이하늘¹

Ha Neul Lee
공주대학교
식물자원학과

현도윤^{2*}

Do Yoon Hyun
국립한국농수산대학교
작물산림학부

¹ Department of Plant Resources, College of Industrial Science, Kongju National University, Yesan 32439, Korea

² Department of Crops and Forestry, Korea National University of Agriculture & Fisheries, Jeonju 54874, Korea

ABSTRACT

Agrobacterium-mediated transformation (AMT) is a method that allows for the stable integration of DNA fragments into the plant genome. Transgenic plants generated through AMT typically exhibit a lower copy number of the transgene compared to those induced by particle bombardment. Furthermore, AMT offers a straightforward and efficient approach for generating transgenic plants. While the transformation efficiency of wheat is comparatively lower than that of other monocot plants such as Rice (*Oryza sativa* L.) and Maize (*Zea mays* L.), the cultivars 'Bobwhites' and 'Fielder' are commonly employed for wheat transformation. To date, there have been no reported instances of successful development of transgenic plants using Korean wheat varieties through AMT. This study aims to assess the transformation efficiency of 43 Korean wheat cultivars using the GUS assay, with the goal of identifying suitable Korean wheat cultivars for AMT. The pCAMBIA1301 vector, carrying the β -glucuronidase (GUS) gene, was incorporated into *Agrobacterium* strain EH105. Following the inoculation of *Agrobacterium* into immature embryos, GUS assays were conducted. 'Saeol', 'Jopum', and 'Jonong' showed 100% (the number of embryos showing GUS spots/the number of embryos used for AMT) among 43 cultivars. In addition, cultivars with more than 70% were 'Saekeumgang', 'Jojung', 'Tapdong', 'Anbaek', 'Dabun', 'Sugang', 'Keumgang', 'Jeokjung', 'Seodun', 'Joeun', 'Dajung', and 'Baekjung'. It seems that the 15 cultivars above showed the possibility of using AMT. On the other hand, 'Yeonbaek', 'Goso', 'Baekgang', and 'Johan' showed less than 20% and GUS spots were not observed in 'Gru', 'Gobun', 'Milseong', and 'Shinmichal-1'. This study explores transient GUS expression in Korean wheat cultivars seven days after AMT. The observed initial high efficiency of transient transformation suggests the potential for subsequent stable transformation efficiency. Korean wheat cultivars demonstrating elevated transient transformation efficiency could serve as promising candidates for the development of stable transgenic wheat.

Key Words : Agrobacterium, GUS staining, Korean wheat cultivars, Transformation

Received Dec. 06. 2023
Revised Jan. 08. 2024
Accept Jan. 08. 2024

*Correspondence

Do Yoon Hyun
dyhyun@korea.kr



서론

밀은 벼, 옥수수과 함께 세계 3대 주곡작물로 전세계적으로 가장 중요한 작물 중 하나이며 전세계 인구가 소비하는 식량칼로리의 약 20%와 단백질 섭취량의 25%를 제공한다(Howell et al., 1995; Shewry 2009). 전세계적으로 지속적인 밀의 생산과 공급은 인구부양과 식량안보의 측면에서 중요하며 우리나라에서도 식생활의 변화와 함께 밀 소비가 지속적으로 증가하고 있다.

밀은 이질6배체(Allohexaploid, AABBDD) 작물로 유전체 구조가 복잡하고 그 크기가 16G 정도로 인간 게놈의 5배, 벼 게놈의 35배에 달하여 매우 큰 편에 속한다(Zimin et al., 2017). 이러한 유전체 구조의 복잡함과 크기는 교배 육종을 통한 형질 개량을 어렵게 만드는 요인이며 이를 극복하기 위해 여러 유전적 도구를 개발해 왔다(Uauy 2017). 식물체 내로 외부유전자를 도입하기 위한 기술인 형질전환은 1990년대 초기에 배발생 캘러스(embryogenic callus)에 유전자총(particle bombardment)을 이용하여 DNA를 직접 도입하는 방식으로 밀에서 시도되었으며(Vasil et al., 1992), 아그로박테리움을 이용한 형질전환은 1997년에 처음 보고되었다(Cheng et al., 1997). *Agrobacterium radiobacter* (일반명: *Agrobacterium tumefaciens*)는 그람음성균(gram-negative)인 토양 박테리아로 쌍자엽 식물의 상처에 감염되어 근두암종(crown gall tumor)을 일으키는 병원균이다(Winans et al., 1988). 이 병원균이 식물의 상처 부위로 이동하여 식물세포와 접촉하면 거대한 플라스미드 중 일부분을 식물체로 옮기며 이러한 기작을 이용하여 원하는 외래유전자를 식물체로 도입하는 형질전환 기술이 쓰이고 있다.

전 세계적으로 많은 연구팀에서 아그로박테리움을 이용하여 밀의 다양한 형질에 대한 형질전환을 시도하였다. 흰가루병, 녹병 등 병저항성(Bliffeld et al., 1999; Mamun et al., 2018), 내건성, 내염성 등 abiotic stress 저항성(Gao et al., 2018; Wang et al., 2020) 연구와 밀의 수발아에 대응하여 종자 휴면을 조절하는 유전자에 대한 형질전환체를 제작하는 등 여러 연구가 진행되어 왔다. 또한 글루텐 알러지 병 중 하나인 셀리아맥을 유발하는 α -글리아딘 함량을 감소시킨 형질전환 식물체도 제작하였다(Sánchez-León et al., 2018). 국내에서도 최근의 정밀 육종 기술 발달과 CRISPR/Cas9 등 유전자교정 기술의 적용으로 밀의 형질전환이 필수적인 기술로 육종에 이용되고 있다. 그러나 아그로박테리움 형질전환에 이용되는 품종은 대부분 외국

품종인 Bobwhite와 Fielder로 이들 품종이 아닌 국내 품종을 이용하는 경우는 매우 드문 실정이다(Altpeter et al., 1996).

본 연구는 밀 형질전환 시스템 개발을 위하여 국내 등록된 밀 품종 43개에 대하여 형질전환을 시도하여 품종 별 형질전환 효율과 도입 유전자의 발현 비율을 검증하고자 한다. 이 연구를 통하여 국내품종이 밀 형질전환에 이용될 가능성을 높이고 이를 통해 밀 분자유종 프로그램에 활용될 것을 기대한다.

연구방법

식물재료 및 재배조건

본 실험에서 사용된 재료는 농촌진흥청 국립식량과학원에서 분양 받은 국내 밀 43개 품종을 사용하였다. 사용된 품종은 고분밀(IT 214681), 고소밀, 그루밀(IT 014297), 남해밀(IT 014436), 다분밀(IT 227094), 다중밀(IT 227076), 다홍밀(IT 014465), 밀성밀(IT 246568), 백중밀(IT 227093), 서둔밀(IT 213098), 수안밀, 수강밀(IT 247762), 새올밀(IT 213244), 안백밀(IT 341962), 알찬밀(IT 175574), 연백밀(IT 227127), 올그루밀(IT 175570), 올밀(IT 014564), 은파밀(IT 014308), 적중밀(IT 246750), 조경밀(IT 213249), 조농밀(IT 332394), 조아밀, 조은밀(IT 213101), 조품밀(IT 215856), 진품밀(IT 213099), 탑동밀(IT 159613), 한백밀(IT 311644), 금강밀(IT 213100), 우리밀(IT 172221), 새금강밀(IT 332202), 청계밀(IT 014371), 영광밀(IT 014337), 조광밀(IT 014340), 신미찰밀(IT 215851), 신미찰1호(IT 329347), 호중밀, 백찰밀, 조중밀(IT 301315), 백강밀(IT 332201), 태중밀(IT 330409), 조한밀(IT 326898), 황금밀이다. 분양 받은 종자는 2개월간 건조 시킨 뒤 발아를 유도하였다. 종자의 발아는 물에 적신 30.48cm × 45.72cm의 seed germination crepe paper (Saran Hand Made Paper Industry, Damdama, India)를 이용하여 4℃에서 저온 발아를 유도하였으며, 밀 종자의 춘화처리를 위하여 6주 간 4℃의 저온 발아를 유지하였다. 발아된 밀 seedling은 직경 11cm의 원예용 플라스틱 포트에 옮겨 심었으며 상토는 원예용상토(Cham Grow, Chungcheongnam province, Korea)를 사용하였다. 준비된 포트는 2주일의 안정기를 거친 후 2월경 공주대학교 야외 연구포장으로 옮겨졌으며 5월에 미성숙 배가 형성될 때까지 포장에서 생육하였다.

조직배양

조직배양에 필요한 밀 미성숙배는 각 품종별 개화 후 11일 경에 해당하는 이삭에서 추출하였다. 추출된 미성숙배의 크기가 직경 1.0~1.5 mm가 되는 샘플을 기준으로 이용하여 수행하였으며 기준치를 벗어난 샘플을 제거하였다. 종자 소독 방법은 Hayta et al. (2019)의 방법을 따라 70% 에틸알코올과 차아염소산나트륨용액을 사용하여 소독하였으며 소독된 종자는 증류수로 3~4 회 washing하여 에틸알코올과 차아염소산나트륨을 제거한 후 이용하였다. 미성숙 배 분리 과정은 Lee et al. (2020)의 방법을 따라 진행하였다.

벡터구축

형질전환 벡터는 pCAMBIA1301을 분양받아 사용하였다. 일시적인(transient) 형질 전환에 사용된 pCAMBIA1301의 구성은 선택적 마커(selective marker)로 hygromycin B phosphotransferase (*HygR*) 유전자를 사용하였으며 *HygR*은 enhanced가 포함된 CaMV 35S 프로모터와 CaMV poly(A)에 의하여 발현이 조절되었다. GUS 유전자는 CaMV 35S 프로모터와 Nos terminator에 의하여 발현이 조절되었다. 사용된 일시적인 형질전환 마커는 Fig. 1에 개략적인 모식도를 표시하였다.

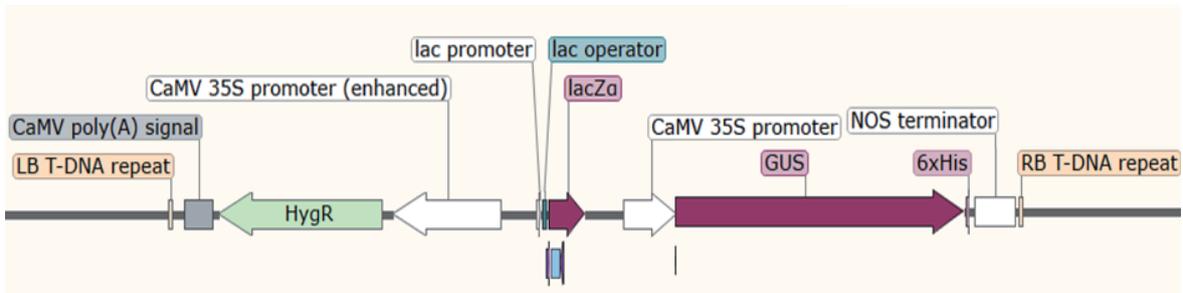


Fig. 1. Schematic diagram of binary vector for wheat transformation. The hygromycin B phosphotransferase (*HygR*) gene is under the control of enhanced 35S promoter with CaMV35S and polyA. The GUS gene is under the control of CaMV35S promoter and Nos terminator. LB and RB indicate left border and right border, respectively

형질전환

형질전환에 사용된 *A. tumefaciens* 균주는 EH105로서 동국대학교 이병무 교수 연구팀에서 분양받아 사용하였다. *Agrobacterium* competent cell은 단일 colony를 LB 배지에 rifampicin 50mg/L이 포함된 5ml 용액 배지에 접종하여 28°C에서 16시간 200rpm으로 진탕배양 하였다. 진탕 배양된 *Agrobacterium*은 배양액 200µl와 고압 멸균처리된 15% 글리세롤 용액(v/v) 200µl와 섞어 상온에서 6시간 배양한 뒤 형질전환 실험을 할 때까지 -80°C에서 보관하였다. *Agrobacterium*에 형질전환 벡터의 삽입은 Wise et al. (2006)에 서술된 freeze/thaw method을 사용하였다. 벡터의 삽입여부는 PCR을 통하여 확인하였으며 사용된 프라이머는 선택적 마커인 *HygR* 유전자에 결합하는 sense primer(5'-GACAATGGCCGCATAACAGC-3'), antisense primer(5'-GCTGCTCCATACAAGCCAAC-3')를 사용하였다. PCR screening을 통해 벡터의 삽입이 확

인된 *Agrobacterium* colony는 표준 접종액으로 사용하였다. *Agrobacterium* 표준 접종액의 제조는 Tingay et al. (1997)의 방법을 이용하였다.

밀 형질전환 전말, 표준 접종액 400µl와 항생제가 첨가되지 않은 MG/L (Garfinkel and Nester, 1980) 배지를 10ml 첨가한 뒤 28°C에서 16시간 200rpm으로 진탕배양한 뒤 배양액을 상온에서 3,100rpm으로 10분간 원심분리하여 접종액의 OD600 값이 0.5가 되도록 조절하여 형질전환에 사용하였다.

개화 후 11일 된 국내 43개 품종의 이삭을 수집하여 미성숙 배에 종자 소독을 진행하고 여과지(Hyundai micro, seoul, Korea)를 여러장 깔은 petri dish에 치상한다. *Agrobacterium* 표준 접종액을 최종적으로 4°C에서 14,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 제거한 뒤 최종 접종액(inoculum)을 1ml로 제조하여 실온에서 4~6시간 배양시킨 뒤 petri dish위의 미성숙배에 붓는다. 미성숙배에 접촉된 *Agrobacterium* 접종액이 미성숙배에 충분히

히 흡수된 후 표면에 남아있는 점종액을 제거하고 100 μ M acetosyringone이 포함된 co-cultivation 배지(Wheat co-cultivation medium, Hayta et al., 2021)로 옮겨서 25 $^{\circ}$ C에서 암조건으로 감염을 유도하였다. Co-cultivation 2일 후 각 미성숙배의 배축(embryonic axis)을 메스를 이

용하여 제거하고, *Agrobacterium*을 제거한 뒤 미성숙배를 5일간 25 $^{\circ}$ C에서 암조건으로 배양하였다. 사용된 배지에 대한 조성은 Table 1에 포함하였다.

Table 1. Medium recipes used in this study

Wheat Inoculation Medium (WIM)	0.44 g/liter Murashigeand Skoog (MS) medium
	10 g/liter glucose
	0.5 g/liter 2-(N-morpholino)ethanesulfonicacid (MES)
Wheat co-cultivation medium	0.44 g/liter Murashigeand Skoog (MS) medium
	10 g/liter glucose
	0.5 g/liter MES
	100 μ M Acetosyringone
	5 μ M AgNO ₃
	1.25 mg/liter CuSO ₄ ·5H ₂ O
	8 g/liter agarose
Wheat callus induction (WCI)	4.3 g/liter MS medium
	30 g/liter maltose
	1.0 g/liter casein hydrolysate
	10 ml 100 \times vitamin stock
	2 mg/liter picloram
	0.5 mg/liter 2,4-D
	1.25 mg/liter CuSO ₄ ·5H ₂ O
	160 mg/liter timentin
MG/L	5 g/liter agarose
	5.0 g/liter tryptone
	2.5 g/liter yeast
	100 mg/liter
	5 g/liter mannitol
	1 g/liter glutamic acid
	250 mg/liter KH ₂ PO ₄
	100 mg/liter MgSO ₄
1 μ g/liter biotin	

GUS assay 및 효율성 분석

GUS 유전자의 활성을 보기 위해 Luo et al. (2004)을 참고하여 실시하였다. 0.5mM K₃Fe(CN)₆ 1mL, 0.5mM K₄Fe(CN)₆ 1mL, pH 7.0 sodium phosphate buffer 5mL, 0.5M sodium EDTA 20ul, 10% Triton-X 1mL와 D.W.를 780ul 넣어 총 부피가 10mL인 GUS 염색 용액을 만들었다. 캘러스가 담긴 1.5mL tube에 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Beta-D-Glucuronide(X-Gluc) 480ul와 GUS 염색 용액 3.52mL를 섞은 용액을 캘러스가 잠길만큼 넣은 후 25 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 반응시켰다. 캘러스에서

GUS 발현 여부는 육안으로 확인하였고 미성숙배 기준 한 부분이라도 파란색을 띠면 발현한 것으로 정하였다. GUS 발현량은 Table 2에 포함하였다

결과 및 고찰

미성숙배 형질전환

형질전환 예비실험에 사용된 금강밀의 미성숙배는 공주대학교의 스피드육종 생육실에서 성장한 미성숙배를 이용하였다. 미성숙배에 대한 조직배양 실험은 Lee et al. (2020)의 실험과 동일하게 진행되었으며 본 실험에서 사용밀 미성

Table 1. The ratio of the number of showing at least a GUS spot in total

	CULTIVAR	Seed coat color	TOTAL	EXPRESSION	EXPRESSION /TOTAL
1	Gru	Red	19	0	0.0%
2	Tapdong	Red	21	17	81.0%
3	Namhae	Red	21	10	47.6%
4	Olgru	Red	18	10	55.6%
5	Uri	Red	15	6	40.0%
6	Alchan	Red	15	8	53.3%
7	Kobun	Red	5	0	0.0%
8	Seodun	Red	22	16	72.7%
9	Keumgang	White	26	20	76.9%
10	Saeol	Red	27	27	100.0%
11	Jinpum	Red	20	13	65.0%
12	Millseong	Red	10	0	0.0%
13	Joeun	Red	7	5	71.4%
14	Jopum	Red	25	25	100.0%
15	Anbaek	Red	25	21	84.0%
16	Jonong	Red	25	25	100.0%
17	Jokyeong	Red	20	8	40.0%
18	Yeonbaek	White	30	2	6.7%
19	Dabun	Red	31	26	83.9%
20	Sinmichal-1	Red	16	0	0.0%
21	Baekjung	White	27	19	70.4%
22	Jeokjung	White	16	12	75.0%
23	Sugang	Red	25	20	80.0%
24	Hanbaek	White	26	12	46.2%
25	Suan	Red	33	18	54.5%
26	Dajung	Red	31	22	71.0%
27	Koso	Red	24	1	4.2%
28	Joa	Red	30	20	66.7%
29	Hojung	Red	24	11	45.8%
30	Baekchal	White	27	10	37.0%
31	Jojung	Red	26	24	92.3%
32	Baekgang	Red	30	2	6.7%
33	Saekeumgang	Red	25	23	92.0%
34	Johan	Red	24	3	12.5%
35	Hwang-geum	Red	23	16	69.6%
36	Jogwang	Red	24	13	54.2%

숙배는 *Agrobacterium*-mediated 형질전환을 수행하였다(Fig. 2). *Agrobacterium*과 접종을 마친 거친 미성숙배는 acetosyringone이 포함된 배지로 옮겨 co-cultivation을 진행하였으며 co-cultivation 2일 후 *Agrobacterium*이 과도하게 자란(overgrowth) 미성숙배를 분리하고 나머지 미성숙배는 배아의 발아를 억제하기 위해 배축(embryonic axis) 제거 후 resting 과정이 진행되었다. Resting 과정은 *Agrobacterium*의 성장을 억제하여 추가적인 감염과정을 막고 co-cultivation에 의한 미성숙배의 스트레스를 회복시켜주는 과정에서 삽입된 T-DNA의 안정

화와 선택적 마커로 이용되는 항생제 저항성 유전자의 발현을 촉진시켜 선발과정에 도움을 주는 것으로 알려져 있으며 본 실험에서도 미성숙배의 안정적인 성장에 역할을 한 것으로 사료된다(Dong and Qu, 2005; Hiei and Komari, 2008; Zhao et al., 2002).

GUS 발현을 통한 형질전환 검정

국내 밀 43 품종에 대한 *A. tumefaciens* 감염 효율을 검정하기 위해 GUS staining 분석을 수행하였다. 미성숙 배



Fig. 2 Selection of wheat spikes and immature embryos. And isolation, inoculation, and co-cultivation of embryos. (A) Spikes of Baekgang 15 days after flowering. Immature embryos (1.0 ~ 2.0 mm in diameter) were rescued 13 to 15 days after anthesis. (B) Seeds collected from the spikes of Baekgang 15 days after flowering. After harvesting the seeds from the spikes, seeds were sterilized in sodium hypochlorite for 5 minutes and then rinsed with distilled water more than 3 times. (C) Immature embryos in seeds. (D) Immature embryos (1.0 - 2.0 mm in diameter) from seeds were isolated. (E) The collected immature embryos were placed in wheat inoculation medium (WIM) and centrifuged at 14000 rpm at 4°C for 10 minutes. The WIM was discarded after centrifugation, and 1 mL of the inoculum was added and incubated for at least 20 minutes. Immature embryos after inoculation were placed on a medium supplemented with acetosyringone. Inoculated embryos were co-cultivated for 2 days, then transferred to Wheat callus induction (WCI) medium. The immature embryos were incubated for 5 days and performed GUS assay for 24 hours.

를 이용한 밀 형질전환 효율은 식물조직에 감염된 *A. tumefaciens*의 숙주 식물의 유전체에 T-DNA 삽입을 통하여 식물 염색체의 통합 효율과 식물세포의 재분화 능력 두 가지 조건에 의해 주로 영향을 받는다(Manfori et al., 2015). 이러한 조건 중 T-DNA 전달 능력을 평가하기 위하여 이전에 수행된 밀을 포함한 여러 식물 형질전환 연구에서 GUS 유전자로 인한 염색 신호를 이용하여 검증하였다(Bartlett et al., 2008; Lui et al., 2017; Thiyagarajan et al., 2022). 또한, T-DNA 전달은 미성숙배의 크기, co-cultivation 기간, acetosyringone 농도 및 배지의 pH와 같은 매우 다양한 조건에 의하여 영향을 받기 때문에 사전에 최적화가 필요하지만, 이전 밀 형질전환 연구에서 봄밀인 cv. Bobwhite, cv. Canon과 겨울밀인 cv. Florida 및 cv. Cadenza 4가지 품종의 *A. tumefaciens* 감염 조건에 대한 연구 결과를 참고하여 모든 품종에 동일한 조건으로 수행하였다(Wu et al., 2003). 국내 밀 품종의 GUS 분석 결과, 32개의 품종에서 1개 이상의 조직에 염색된 신호가 관찰되었으며, 4개의 품종(그루밀, 고분밀, 밀성밀, 신미찰

1호)에 대해서는 염색된 신호가 관찰되지 않았다(Fig. 3). 또한, 전체 43개의 품종 중 6개의 품종(울밀, 다홍밀, 청계밀, 은파밀, 신미찰밀, 태중밀)에서는 과도한 *A. tumefaciens*의 성장이 관찰되었고, 영광밀에 대해서는 미성숙배의 직경이 1.0 mm 미만으로 관찰되어 총 7개의 품종에 대해서는 GUS staining 분석이 이루어지지 못하였다. 분석이 진행되지 못한 7품종은 Table 2에서 제외하였다. 그동안 대부분의 밀 형질전환 연구는 cv. Bobwhite(Altpeter et al., 1996)와 같은 일부의 품종에 국한되어 있어, 국내 장려 밀 품종의 형질전환 효율에 영향을 미치는 조건에 대한 검증이 필요하다. 중국에서는 중국 엘리트 품종에 대한 particle bombardment 형질전환 효율을 검증하기 위해 10개의 밀 품종에 대해서 GUS 분석을 통한 내인성 GUS 유전자의 발현을 분석하였으며, *A. tumefaciens* 형질전환에 대해서는 17개의 상업용 중국 밀 품종에 대한 일시적 GUS 발현을 이용하여 T-DNA 전달 효율에 대하여 검증하였다(Wang et al., 2017; Zhang et al., 2015).

국내 밀 품종별 형질전환 효율성

국내 밀 품종별 *A. tumefaciens* 감염에 대한 효율은 먼저 종피색에 의한 분류로 8개의 백립계 품종 및 28개의 적립계 품종에 대한 감염 효율을 비교한 결과, 평균에서는 유의한 차이가 없었다(Fig. 4). 하지만, 조농밀, 조품밀, 새을밀, 조중밀, 새금강밀의 적립계 품종에서 90% 이상의 매우

높은 것으로 관찰되었고, 전체 품종에서 22개의 품종에 대해서 50% 이상의 효율을 나타냈다(Table 2). 특히 조농밀 및 새을밀 품종은 GUS 발현이 미성숙배에서 모두 관찰된 조품밀과 비교하여 미성숙배의 배반 조직 전체에서 GUS의 파란색 신호가 관찰되어 매우 강한 발현이 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 3). 따라서, 조농밀 및 새을밀은 형질전환에

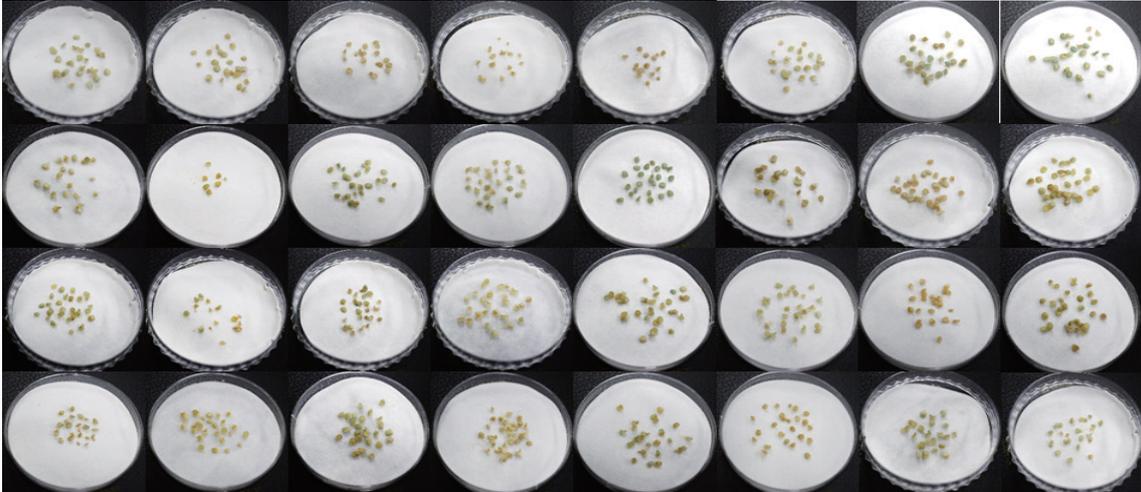


Fig. 3. The number of embryos showing at least one GUS spot was counted. GUS assay was performed 7 days after AMT. Starting from the top right, Tapdong, Namhae, Olgru, Uri, Alchan, Seodun, Keumgang, Saeol, Jinpum, Joeun, Jopum, Anbaek, Jonong, Jogyeong, Yeonbaek, Dabun, Baekjung, Jeokjung, Sugang, Hanbaek, Suan, Dajung, Koso, Joa, Hojung, Baekchal, Jojung, Baekgang, Saekeumgang, Johan, Hwang-geum, and Jogwang.

이용하기 위해 적합한 품종으로 나타났다. 하지만 조농밀 및 새을밀을 포함하는 국내의 밀 품종은 대부분 적립계로 나타나지만, 국내 집단 재배 품종과 제면용 수입 밀은 백립계를 사용한다(Kang et al., 2008). 해당 결과에서 적립계 품종에서 높은 GUS 발현을 보이는 품종이 조사되었지만, 백립계 품종 중 백중, 적중, 금강은 각각 70.4%, 75.0%, 76.8%로 비교적 높은 발현을 보이는 것으로 나타났다. 따라서, 국내 밀 재배 및 소비에 많이 사용되는 금강 품종은 *A. tumefaciens*을 이용한 형질전환에 적합한 품종으로 확인되었다. 그러나 해당 연구를 토대로 더욱 정밀한 연구를 위해서는 각 품종의 조직배양 과정을 수행하여 캘러스 유도 기간에 따른 안정적인 GUS 발현 효율을 조사할 필요가 있는 것으로 판단된다. 다른 연구 사례에서 형질전환 및 조직배양 기간을 최적화하기 위하여 co-cultivation, resting 및 selection 기간에 대한 안정적인 T-DNA integration의 효율을 GUS 발현량으로 조사하였다(Hayta et al., 2019). 따라서, 국내 밀 품종을 밀 형질전환에 이용하기 위해서는 조직배양 효율도 동시에 검정이 필요할 것으로 판단된다. 이 연구는 밀 형질전환의 필요조

건인 *A. tumefaciens*의 T-DNA 전달을 위한 감염 효율을 검정하여 국내 밀 품종의 형질전환 효율을 높이기 위한 형질전환 품종 선발에 이용할 수 있을 것으로 사료되며 본 연구의 결과는 형질전환을 이용한 밀 분자유종에 크게 도움이 될 것으로 기대한다.

적요

본 연구는 국내 밀 43 품종에 대한 *A. tumefaciens* 형질전환 효율을 검정하기 위해 GUS staining 분석을 수행한 것으로서 대부분의 밀 형질전환 연구가 특정 품종에 국한되어 있기 때문에 국내 장려 밀 품종에 대한 형질전환 효율에 영향을 미치는 조건에 대한 검정이 필요하다. 국내 밀 품종 중 32개에서 1개 이상의 조직에 염색된 신호가 관찰되었으며 4개 품종에서는 염색된 신호가 관찰되지 않았고 6개 품종에서 과도한 *A. tumefaciens* 성장이 관찰되었고, 7개 품종은 미성숙배의 크기 등의 이유로 GUS staining 분석이 불가능하여 추가 분석에서 제외하였다.

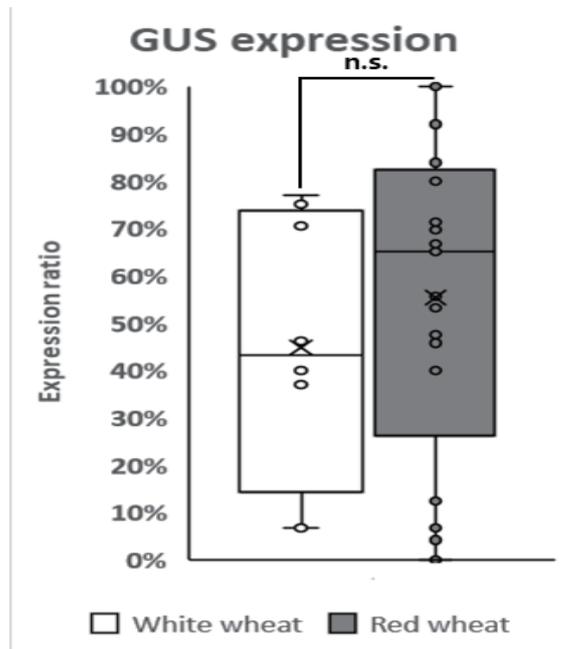


Fig. 4. Comparison of *A. tumefaciens* inoculation efficiency between Korean wheat varieties according to seed coat color. There was no significant difference in average inoculation efficiency between 8 white-grained wheats and 28 red-grained wheats.

국내 밀 품종별 *A. tumefaciens* 감염 효율 비교 결과, 백립계 8개 품종 및 적립계 28개 품종에서는 평균적으로 유의한 차이가 없었다. 특히 조농밀, 조품밀, 새올밀, 조중밀, 새금강밀 등 적립계 품종에서 90% 이상의 높은 감염 효율이 관찰되었고, 전체 품종 중 22개는 50% 이상의 효율을 나타내었다. 본 연구를 통하여 조농밀 및 새올밀은 미성숙배에서 전체 조직에서 강한 GUS 발현으로 형질전환에 적합한 품종으로 나타났으며 금강 품종은 백립계에서 상대적으로 높은 발현을 보여 *A. tumefaciens*을 이용한 형질전환에 적합한 것으로 확인되었다.

추가적인 연구를 통해 품종의 조직배양 효율을 검정하고, 안정적인 GUS 발현 효율을 조사하는 것이 필요하며, 이를 통해 밀 형질전환에 이용 가능한 품종을 더욱 정밀하게 선별할 수 있을 것으로 판단된다. 해당 연구 결과는 국내 밀 품종의 형질전환 효율을 높이기 위한 기초 자료로 활용 가능할 것이다.

참고문헌

1. Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, Stoger E, Vasil IK. 1996. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Plant cell reports* 16:12-17.
2. Bartlett JG, Alves SC, Smedley M, Snape JW, Harwood WA. 2008. High-throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. *Plant Methods* 4(1):1-12.
3. Bliffeld, M., J. Mundy, I. Potrykus, and J. Fütterer. 1999. Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1079-1086.
4. Cheng M, Fry JE, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan Y. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 115(3): 971-80.
5. Dong S, Qu R. 2005. High efficiency transformation of tall fescue with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 168(6): 1453-1458.
6. Gao, H., Y. Wang, P. Xu, and Z. Zhang. 2018. Overexpression of a WRKY transcription factor TaWRKY2 enhances drought stress tolerance in transgenic wheat. *Frontiers Plant Science* 9: 997.
7. Garfinkel DJ, Nester EW. 1980. *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *J Bacteriol.* 144(2): 732-43.

8. 777Hayta S, Smedley MA, Demir SU, Blundell R, Hinchliffe A, Atkinson N, Harwood WA. 2019. An efficient and reproducible *Agrobacterium*-mediated transformation method for hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Methods* 15: 121.
9. Hiei Y, Komari T. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nat Protoc* 3: 824-834.
10. Howell, T. A., J. L. Steiner, A. D. Schneider, and S. R. Evett. 1995. Evapotranspiration of irrigated winter wheat. *Southern High Plains. Trans. ASAE.* 38: 745-759.
11. Ishida Y., Tsunashima M., Hiei Y., Komari T. 2015. Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos. pp 189-198. In: Wang K. (Eds) *Agrobacterium* Protocols. Springer, New York, NY.
12. Kang CS, Kim HS, Cheong YK, Kim JG, Park KH, Park CS. 2008. Flour characteristics and end-use quality of commercial flour produced from Korean wheat and imported wheat. *Korean J. Food Preserv* 15(5): 687-693.
13. Lee GH, Kim TK, Choi CH, Kim JY. 2020. Evaluation of tissue culture efficiency in a speed breeding system for stable and sustainable supported wheat (*Triticum aestivum*) immature embryogenesis. *Korean J. Crop Sci.* 65(4): 365-376.
14. Liu, Y, Zhang Z, Fu J, Wang G, Wang J, Liu Y. 2017. Transcriptome analysis of maize immature embryos reveals the roles of cysteine in improving *agrobacterium* infection efficiency. *Frontiers Plant Science* 8: 1778.
15. Mamun, M. A., C. Tang, Y. Sun, Md. N. Islam, P. Liu, X. Wang, and Z. Kang. 2018. Wheat gene TaATG8j contributes to stripe rust resistance. *International Journal of Molecular Sciences* 19(6): 1666.
16. Manfroi E, Yamazaki-Lau E, Grando MF, Roesler EA. 2015. Acetosyringone, pH and temperature effects on transient genetic transformation of immature embryos of Brazilian wheat genotypes by *Agrobacterium tumefaciens*. *Genetics and Molecular Biology* 38: 470-476.
17. Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Giménez MJ, Sousa C, Voytas DF, Barro F. 2018. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnology Journal* 16(4): 902-910.
18. Shewry PR. 2009. Wheat. *J Exp Bot.* 60(6):1537-53.
19. Thiyagarajan K, Noguera LM, Pacheco M, Govindan V, Vikram P. 2022. *Agrobacterium* mediated transformation and deciphering SNPs in TaLr67 gene homeologs for gene editing in wheat. *bioRxiv: 2022-03.*
20. Tingay S, McElroy D, Kalla R, Fieg S, Wang M, Thornton S, Brettell R. 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J* 11: 1369-1376.
21. Uauy C. 2017. Wheat genomics comes of age. *Curr Opin Plant Biol* 36: 142-8.
22. Vasil V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK. 1992. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Nature Biotechnology* 10: 667-674.
23. Wang K, Liu H, Du L, Ye X. 2017. Generation of marker-free transgenic hexaploid wheat via an *Agrobacterium*-mediated co-transformation strategy in commercial Chinese wheat varieties. *Plant Biotechnology Journal* 15(5): 614-623.
24. Wang M, Yuan J, Qin L, Shi W, Xia G, Liu S. 2020. TaCYP81D5, one member in a wheat cytochrome P450 gene cluster, confers salinity tolerance via reactive oxygen species scavenging. *Plant Biotechnology Journal* 18(3): 791-804.
25. Winans SC, Kerstetter RA, Nester EW. 1988. Transcriptional regulation of the virA and virG genes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 170: 4047-4054.
26. Wise AA, Liu Z, Binns AN. 2006. Three Methods for the introduction of foreign DNA into

- Agrobacterium*. In: Wang K. (eds) *Agrobacterium Protocols*. Methods in Molecular Biology vol 343. Humana Press.
27. Wu H, Sparks C, Amoah B, Jones HD. 2003. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant cell reports* 21(7): 659-668.
28. Zhang K, Liu J, Zhang Y, Yang Z, Gao C. 2015. Biolistic genetic transformation of a wide range of Chinese elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Journal of genetics and genomics* 42(1): 39-42.
29. Zhao ZY, Gu W, Cai T, Tagliani L, Hondred D, Bond D, Schroeder S, Rudert M, Pierce D. 2002. High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize. *Molecular Breeding* 8: 323-333.
30. Zimin AV, Puiu D, Hall R, Kingan S, Clavijo BJ, Salzberg SL. 2017. The first near-complete assembly of the hexaploid bread wheat genome, *Triticum aestivum*. *Gigascience* 6(11): 1-7.