

석사학위논문

*Agrobacterium*을 이용한
유채 (*Brassica napus* L.) 하배축
조직의 형질전환



제주대학교 대학원

원예학과

안효민

2004년 12월

*Agrobacterium*을 이용한
유채(*Brassica napus* L.) 하배축
조직의 형질전환

지도교수 송관정

안효민

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함.



안효민의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장_____

위 원_____

위 원_____

제주대학교 대학원

2004년 12월

Agrobacterium-mediated transformation of
hypocotyl tissues in rape (*Brassica napus* L.)

Hyo-Min Ahn

(Supervised by Professor Kwan Jeong Song)



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirements for the Degree of
MASTER OF AGRICULTURE

Department of Horticulture
Graduate School, Cheju National University

December, 2004

목 차

목 차	i
Summary	ii
List of Tables	iv
List of Figures	v
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 식물재료	4
2. 재 분 화	5
3. 형질전환	5
4. 형질전환체 확인	8
5. 형질전환체 순화	12
III. 결과 및 고찰	13
1. 유체재분화	13
2. 형질전환	16
V. 적요	23
VI. 참고문헌	24

SUMMARY

In order to establish a genetic transformation system, one of major key techniques, for rapid development of new varieties and functional genomics, the regeneration response of cotyledon and hypocotyl explants and *Agrobacterium*-mediated transformation of hypocotyl explants were studied in an old local variety of rape (*Brassica napus* L.), an economic crop.

Regeneration responses of hypocotyl explants harvested from in vitro germinated seedlings to the combination of NAA and BA were investigated. Hypocotyl explants showed the highest regeneration efficiency of 25.0% in the combination of $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA and $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA. However, any adventitious shoot formation was not observed for cotyledon explants.

Resistance of hypocotyl explants to kanamycin was evaluated in order to determine the proper concentration for selection of putative transformants. The adventitious shoot formation on cutting edges of hypocotyl explants was partially inhibited at $20\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and the adventitious shoot formation and callus development was almost completely prevented at $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin.

To develop the putative transformants with GUS gene and citrus phytoene synthase gene, hypocotyl explants pre-cultivated for 2 days were inoculated with *Agrobacterium* LBA4404, co-cultivated for 2 days, and cultured on MS medium supplemented with $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA, and $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin for 4 weeks.

Adventitious shoots obtained from selective regeneration steps were transferred to shoot elongation and rooting medium for getting rapid plant growth and development, and then putative transformants were confirmed by GUS assay and PCR analysis. The results indicated that the efficiency of *Agrobacterium*-mediated gene transfer for hypocotyl explants of rape was estimated at about 8.0%.



List of Tables

Table 1. Composition of medium used in the transformation of rape.....	6
Table 2. Composition of YEP medium.	7
Table 3. Composition of GUS expression solution.	10
Table 4. Regeneration efficiency (%) of hypocotyl explants on MS basal medium supplemented with BA and NAA in rape (<i>Brassica napus</i> L.).	13
Table 5. Efficiency of <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation in rape (<i>Brassica napus</i> L.).	21

List of Figures

- Fig. 1. 7-day-old seedlings of in vitro germinated rapeseed (Brassica-apus L.).4
- Fig. 2. Structure of the T-DNA regions of pBI121 binary vectors including β -glucuronidase (GUS) and *Citrus phytoene synthase*. 7
- Fig. 3. Schematic overview of the procedure for *Agrobacterium* mediated transformation of rape. 9
- Fig. 4. Regeneration response of hypocotyl and cotyledon explants on MS medium supplemented with NAA $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA. 14
- Fig. 5. Regeneration response of cotyledon explants on MS medium supplemented with $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA and $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA..... 15
- Fig. 6. Resistance response of hypocotyl explants of rape to kanamycin supplemented in regeneration medium..... 16
- Fig. 7. Adventitious shoot formation from the cutting edges of hypocotyl on selective regeneration medium explants in rape. ... 17

Fig. 8. Effect of GA supplemented in shoot elongation and rooting medium on shoot development. Non-transformant, putative transformant on free GA medium, and Putative transformant, on meium supplemented with $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA. 18

Fig. 9. Gus assay of the selected putative transformants A, non-transgenic tissue; B, putative transformant tissue. 19

Fig. 10. PCR analysis of putative transgenic plants. PCR bands were detected for citrus pytoene synthase genes. 19

Fig. 11. Acclimatization of putative transformants. 20

Fig 12. Putative transformant showing abnormal pigmentation and bleaching of leaves.22



I. 서 론

유채(*Brassica napus* L.)는 십자화과(*Cruciferae*) 배추속(*Brassica*)에 속하는 1년생 또는 2년생 초본 식물로서 평지라고도 불린다. 우리나라에서는 중부이남 지역에서 오랫동안 월동형 유지작물로 재배되어 왔다.

유채는 단위면적당 채유량이 다른 유지작물에 비해 많고 재배가 간편하며 생산비가 비교적 저렴한 특징을 가지고 있다. 그러나 농가소득의 감소와 외국산과의 가격경쟁력 저하로 70년대 중반 이후부터 재배면적이 급격히 감소하였다. 근래에는 유지작물로 재배하기보다는 노란 꽃을 활용한 관광자원, 밀원, 그리고 박의 경우 청초를 활용하는 가축 사료 또는 퇴비, 하천 변의 정화 등 주로 자원식물로 이용하고 있다.

중국, 캐나다 등 외국의 경우 유채에서 유해성분으로 알려진 에루크산(erusic acid) 과 글루코지노레이트(glucosinolate)의 함량을 낮춘 신품종 유채 또는 캐놀라(canola)로 개량하여 유지작물로서의 재배가 계속적으로 증가하고 있는 실정이다. 유채 식용유는 세계적으로 콩기름, 팜유 다음으로 많은 양이 생산되어 식용 및 샐러드용으로 사용되고 있고, 일부는 항공기 윤활유, 세제의 정화제 및 천연 디젤연료 등 공업용으로도 광범위하게 이용되고 있다. 식용의 경우 토코페롤 함량이 높아 캐나다, 미국, 영국 및 프랑스 등에서 소비가 매년 급증하고 있는 추세이다(권 등, 1992; 장, 2002; Cardoza 등, 2003). 이에 따라 선진국에서는 유채의 유지성분 개량 및 활용도 증진을 위한 신품종 개발에 많은 연구 투자를 기울이고 있다.

지금까지 신품종 개발은 주로 전통육종에 의존하여 수행되어 왔다. 국내에서는 잡종강세 육종법에 의한 F1 hybrid 품종의 육성 (장, 2002), 재배면적 급감에 따른 관광 및 밀원 등 부가가치를 높일 수 있는 관상용 품종의 육성(장 등, 1998) 등이 보고 되었다. 외국의 경우 에루크산과 글루

코지노레이트의 함량을 낮춘 품종의 육성 (Rahman 등, 2001) 등이 보고 되어 왔다. 그러나 고전육종에 의한 신품종 개발은 소재의 다양화 및 육종기간 단축 등 많은 제한성을 가지고 있다. 그러므로 최근 선진국에서는 유채 활용도를 높이기 위한 유용 유전자 개발 및 외래 유용 유전자를 효율적으로 도입하여 신품종을 조기에 개발하기 위한 형질전환 신품종 육종 등 생물공학적 연구가 매우 활발히 수행되고 있다(Palmer & Keller, 2002).

유채 형질전환 신품종 개발의 대상형질로는 *Bar* gene과 *Neo* gene을 이용한 제초제 내성 부여 (Block 등, 1989), stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene의 도입에 의한 지방산 조성의 변화 (Knutzon 등, 1992), 내충성 강화 (Stewart 등, 1996), AtNHX1 gene의 발현을 통한 내염성 부여 (Zhang 등, 2002) 등이 연구되어 왔다. 그러나 상용화 정도를 높이기 위해서는 유용 유전자의 다양화 및 특이 발현조절 등이 계속적으로 보완되어야 할 것이다.

유용 유전자 도입 형질전환 기법으로는 polyethylene glycerol (Golz 등, 1990) 및 전기충격법 (electroporation)(Chapel, 1990), 미세주사법 (micro-injection)(Jones 등, 1995), 그리고 유전자총 (particle bombardment)(Chen 등, 1994) 등이 사용되고 있으나 많은 연구에서 *Agrobacterium* 이용법을 사용하고 있다. *Agrobacterium* 이용법은 사용의 간편성, 비용 저렴, 그리고 도입 유전자의 발현 안정성의 장점을 가지고 있어 선호도가 높은 편이다. 그러나 host range가 높아 종 및 품종 간 형질전환 효율의 차이가 많을 뿐만 아니라 이용 조직에 따라서도 차이가 많은 편이다. 유채에서는 대부분 자엽을 이용한 형질전환이 연구되고 있으나, 하배축을 이용한 형질전환 기술개발 (Schroder 등, 1994; Stewart 등, 1996; Halfhill 등, 2001; Cardoza 등, 2003)도 시도되어 왔다. 그런데 하배축을 이용한 경우에는 형질전환 효율이 4% 정도로 낮은 편이어서

개선이 필요한 실정이다.

한편 유채는 배추와 양배추의 합성종이고, 배추는 국내 김치의 주재료로 이용되는 국내 주요 채소 작물의 하나이다. 국내외 김치 시장의 확대에 따라, 최근 배추 유전체 연구가 확대되고 더불어 유채 유전체 정보에 대한 관심도 고조되고 있다. 그럼에도 불구하고 국내에서는 아직까지 유채 유전자 개발 및 형질전환 연구가 미약한 실정이다(허, 1995; 이 등, 1998).

따라서 유채(*Brassica napus* L.)의 부가가치를 증대할 수 있는 신품종 조기 육종 및 배추속 식물의 유전정보 해석에 필요한 핵심 기반기술인 형질전환 기술을 개발코자 제주 재래종을 이용하여 자엽 및 하배축 조직의 재분화 반응과 *Agrobacterium*을 이용한 하배축 조직의 형질전환 연구를 수행하였다.



II. 재료 및 방법

1. 식물재료

식물재료로 제주 재배종 유채(*B. napus* L.)의 종자를 (주)서울종묘에서 구입하여 사용하였다. 구입 종자는 4℃ 냉장고에 보관하여 저온처리한 후 표면 살균하고 기내파종하였다. 종자를 중성세제에 10분간 침지한 후 멸균수로 10분간 교반 및 세척을 2회 실시한 다음, 2% 차아염소산나트륨에서 15분간 침지 살균하고 멸균수로 10분씩 3회 수세한 후 멸균 여과지(filter paper)로 여액을 제거하였다. 생장조절제가 없는 20mL의 MS 고형 배지(Murashige and Skoog, 1962)를 포함한 배양병에 표면 살균한 종자를 5립씩 파종하고 24±1℃에서 16시간의 광주기로 조절되는 생육상에서 발아 및 식물체 생육을 유도하였다.



Fig. 1. 7-day-old seedlings of in vitro germinated rape (*Brassica napus* L.).

발아 7일 후의 식물체(Fig. 1)로부터 자엽과 하배축 조직의 절편체를 절취하여 재분화 및 형질전환에 이용하였다. 자엽의 경우 자병을 약 2mm 포함하도록 절단하여 전체를 이용하였고 하배축의 경우 0.7cm 내외의 크기로 절단하여 절편체로 이용하였다.

2. 재분화

기내 배양한 식물체의 자엽과 하배축 조직으로부터 절취한 절편체를 α -naphthalene acetic acid (NAA)와 6-benzyladenine (BA)가 첨가된 MS 배지에 치상하여 재분화 반응을 조사하였다. 성장조절제인 NAA와 BA는 각각 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0mg · L⁻¹ 및 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0mg · L⁻¹의 5수준으로 조합 처리하였다. 재분화 배양은 24±1℃, 30μmol · m⁻² · s⁻¹의 16시간 광주기 조건에서 수행되었다. 배양 4주 후 절편체의 재분화율을 조사하였다.

3. 형질전환

형질전환체를 선별하는 항생제의 적정 농도를 설정하기 위하여 kanamycin에 대하여 하배축 조직의 재분화 내성을 분석하였다. 재분화 배지(MS + 0.1mg · L⁻¹ NAA + 1.0mg · L⁻¹ BA)에 첨가된 kanamycin의 농도는 0, 25, 50, 75, 100, 125mg · L⁻¹의 6수준으로 설정하였다.

기내발아 식물체의 하배축 조직을 0.6cm 내외의 크기로 절취한 절편체를 성장조절제가 첨가된 MS 배지(Table 1)에서 전배양한 후 일정 농도로 배양한 *Agrobacterium*을 접종하여 형질전환을 수행하였다(Fig.

3)(Gallois 등, 1995). 식물체 절편체의 전배양은 $24\pm 1^\circ\text{C}$, $30\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 16시간 광주기 조건에서 2일간 수행하였다.

Table 1. Composition of medium used in the transformation of rape.

Media components	Media					MS liquid & Rooting
	Pre-cultivation	Co-cultivation	Regeneration	Shoot elongation	Shoot elongation	
Salts	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Sucrose($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	30	30	30	30	30	-
NAA	0.1	0.1	0.1	-	-	-
BA	1	1	1	-	-	-
GA	-	-	0.1	0.1	-	-
Kanamycin	-	-	50	-	-	-
Carbenicillin	-	-	500	500	-	-
Charcoal	-	-	-	-	3000	-

이용 균주는 plasmid pBI121을 포함하고 있는 *Agrobacterium* LBA4404를 사용하였다. T-DNA 영역은 Fig. 2와 같다. Plasmid pBI121의 T-DNA 영역은 CaMV35S promoter와 Nos-terminator로 발현이 조절되는 reporter gene인 GUS 유전자와 Nos-promotor와 Nos-terminator로 조절되는 selective marker gene인 NPT II를 포함하도록 구성되어 있다(Fig. 2A). Plasmid pBI121의 T-DNA 영역은 plasmid pBI121(B)의 GUS 유전자가 온주밀감의 phytoene synthase로 대체되어 구성되었다(Fig. 2B).

(A)

(B)

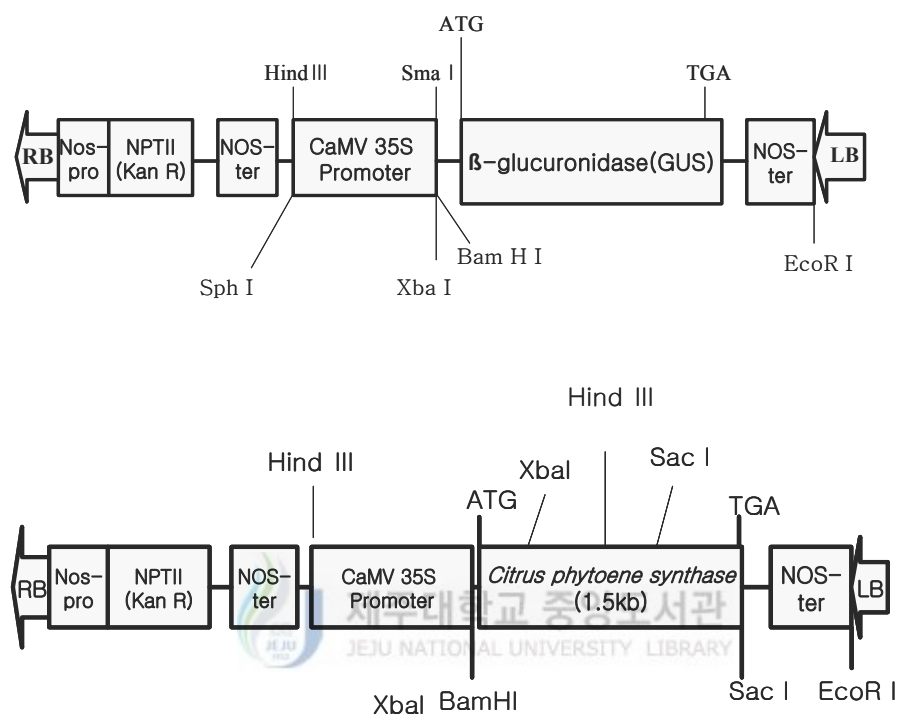


Fig 2. Structure of the T-DNA regions of pBI121 binary vectors including β -glucuronidase (GUS) (A) and *Citrus phytoene synthase* (B). RB, right border; Nos-pro, NOS promoter; NPTII (Kan R), neomycin phosphotransferase gene (kanamycin resistance); NOS ter, NOS terminator; LB, left border.

Table 2. Composition of YEP medium

Media components	Amounts(g · L ⁻¹)
Yeast-extract	10
Peptone	10
Sodium chloride	5

균은 kanamycin $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 첨가한 YEP 고체 배지(Table. 2)에 도말하여 28°C 에서 2일 동안 배양하였다. 단일 콜로니를 취하고 kanamycin $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 이 첨가된 5mL의 YEP 액체 배지로 옮겨 28°C , 120rpm에서 2일간 암 상태에서 배양하였다. 이로부터 50 μL 를 취하여 동일한 양의 항생제가 첨가된 5mL의 YEP 액체 배지에 넣어 28°C , 120rpm에서 OD₆₀₀ 0.6 ~ 0.7이 될 때까지 배양하였다. 배양한 균 액을 MS 액체 배지와 YEP 액체 배지가 동량(1:1)으로 혼합한 액체 배지를 이용하여 50배로 희석시킨 후 전배양한 절편체를 잠기지 않게 띄우고 10분간 접종하였다. 균 접종 후 절편체를 MS 액체 배지에 침지하여 2회 세척과정을 거친 뒤 멸균된 여과지 상에서 여액을 건조시켰다.

공동배양은 균 접종을 마친 절편체를 성장조절제가 첨가된 MS 고형 배지(Table 1)에 옮겨 $24\pm 1^\circ\text{C}$, 암 조건에서 2일간 수행되었다.

공동배양 후 절편체는 항생제가 첨가된 재분화 배지(Table 1)로 옮겨져 $24\pm 1^\circ\text{C}$, 16시간 광주기 조건의 생육상에서 4주간 배양되었다. 재분화 배지에는 일반 재분화 과정과는 달리 $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ gibberellin(GA)이 첨가되었다. 이는 목적 유전자가 phytoene synthase인 경우 재분화 신초의 생육을 촉진하기 위한 것과 관계된다.

4주 배양 후 재분화된 신초는 신초 신장 및 발근배지(Table 1)로 옮겨 4주 동안 급속 성장 및 발근을 유도하였다.

4. 형질전환체 확인

재분화 개체의 형질전환 여부를 β -glucuronidase(GUS) 분석과 polymerase chain reaction(PCR) 분석을 통해 확인하였다.

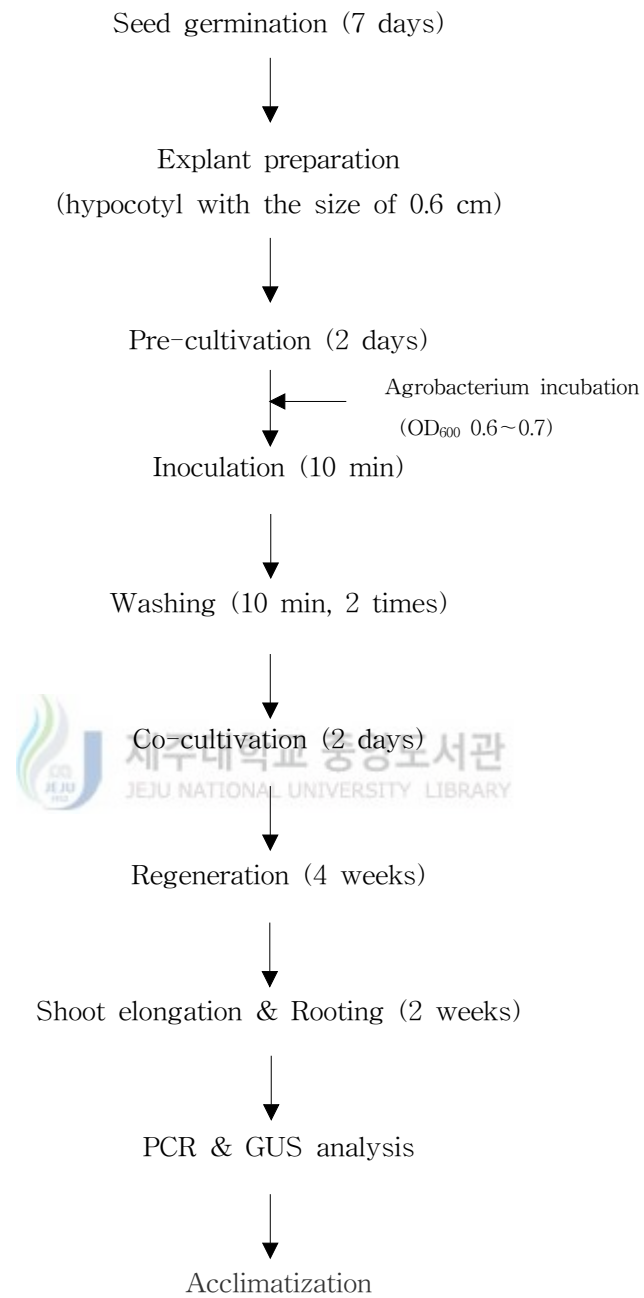


Fig. 3. Schematic overview of the procedure for *Agrobacterium*-mediated transformation of rape.

1) GUS 분석

형질전환 재분화 개체의 GUS 분석은 Jefferson(1987)의 방법에 따라 수행하였다. 형질전환체로 추정되는 식물체의 잎을 절취하고 1.5mL microtube에 옮긴 후 1mg의 5-bromo-4-chloro-3-indoly- β -glucuronidase (X-gluc) 염색용액(Table 3)을 첨가한 다음 37°C에서 24시간 동안 암배양 하였다. 청색의 GUS 발색은 광학현미경 하에서 관찰하였다.

Table 3. Composition of GUS expression solution.

Reagents	Added amount
N, N-dimethyl formamide	1 ~ 2drop
5-bromo-4-chloro-3-indosyl- β -glucuronidase (X-Gluc)	1mg
0.1M phosphate buffer(pH7.0)	980 μ L
0.2M KH ₂ PO ₄	87mL
0.2M K ₂ HPO ₄	122mL
Distilled water	209mL
5mM potassium ferricyanide	10 μ L
5mM potassium ferrocyanide	10 μ L
Triton X-100	1 ~ 2drop
Total Volume	1mL

2) PCR 분석

PCR 분석을 위한 DNA 추출은 CTAB 방법(Gawel, 1991)을 이용하였다. 식물체 조직 1g을 막자사발에 넣고 액체질소를 첨가하여 마쇄한 후 50mL 튜브로 옮겨 담았다. 6mL의 CTAB extraction buffer(1% CTAB(1% CTAB(Hexadecyltrimethyl ammonium bromid) 100mM

Tris-Cl(pH8.0), 1.4M NaCl, 20mM EDTA(pH8.0), 1.4M NaCl, 20mM EDTA(pH8.0), 0.4% β -mercaptoethanol)와 120 μ L의 β -mercaptoethanol을 첨가하고 65 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 동량의 chloroform을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 12,000 rpm으로 원심분리 후 상정액을 취해 동량의 isopropanol과 400 μ L의 3M sodium acetate(pH 5.2) 를 처리하고 -20 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 침전시켰다. 침전 후 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 12,000rpm으로 원심분리한 다음 상정액을 버리고 침전물을 회수하여 건조시켰다. 3차 멸균 증류수와 RNase를 처리하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 단백질을 제거를 위한 동량의 phenol/chloroform(1 : 1)용액을 첨가하고 원심분리 한 후 상정액을 취하였다. 동량의 chloroform을 넣어 원심분리하고 상정액을 취한 후 동량의 isopropanol과 400 μ L의 3M sodium acetate(pH5.2)를 처리한 다음 -20 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 침전시켰다. 이를 원심분리한 후 상정액을 버리고 침전물을 회수하고 건조시킨 다음 소량의 멸균 3차 증류수에 녹여 PCR 분석에 사용하였다.

유전자 증폭을 위한 PCR 반응액은 template DNA 1 μ L(4 μ g \cdot μ L $^{-1}$) primer(10pmol \cdot μ L $^{-1}$) 각각 1 μ L, 10x PCR buffer 5 μ L, 2.5 mM dNTP mixture 5 μ L, Taq polymerase(Takara, Japan) 0.5 μ L에 멸균된 3차 증류수를 첨가하여 총 50 μ L로 하여 조제하였다. primer로는 온주밀감 phytoene synthase 유전자에 대하여 5'-TTTCTTTACCAACATCAAA-CCC-3'과 5'-GAGTCATCTGTCCTCCTACAC-3'을 사용하였다. PCR 반응은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 최초 denaturation시킨 뒤 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 52 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension과정을 30회 반복한 뒤 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 최종 extension 과정으로 수행하였다. 증폭된 DNA 밴드의 크기는 450bp로서 소량의 EtBr이 첨가된 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

5. 형질전환체 순화

GUS 분석 및 PCR 분석을 통해 형질전환체로 추정되는 식물체는 신초 신장 및 발근 배지에 옮겨 신초신장과 발근을 유도하였다. 4주 후 잎의 수가 10매 이상이고 10cm 정도 자란 식물체는 포트에 이식하고 24±1℃, 16시간 광주기, 상대습도 50±2%의 생육상에서 순화하였다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 유체 재분화

형질전환 과정에서 필수적 단계인 식물체 재분화 반응을 탐색하기 위하여 NAA와 BA의 농도를 각각 5수준으로 조합 처리하여 총 25 조합을 설정하여 재분화 양상을 분석하였다. 하배축 조직의 배양 4주 후 재분화 반응은 Table 4와 같다. BA 1.0mg · L⁻¹ 및 NAA 0.1mg · L⁻¹ 의 수준에서 가장 높은 25.0%의 재분화 반응을 나타내었으나, BA 1.0~2.0mg · L⁻¹ 수준에서는 거의 차이가 없었다.

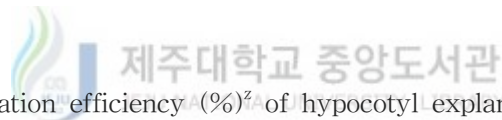


Table 4. Regeneration efficiency (%)^z of hypocotyl explants on MS basal medium supplemented with BA and NAA in rape (*Brassica napus* L.).

BA (mg·L ⁻¹) \ NAA (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)				
	0	0.1	0.25	0.5	1.0
0	-	1.0±2.0	3.0±3.3	3.0±3.8	2.0±2.3
0.5	-	8.0±3.3	8.0±3.8	2.0±4.0	3.0±3.8
1.0	1.0±2.0	25.0±6.8	2.0±2.3	4.0±5.0	1.0±2.0
1.5	1.0±2.0	12.0±5.7	5.0±3.8	7.0±5.0	2.0±2.3
2.0	2.0±2.3	18.0±7.7	8.0±3.3	8.0±2.3	1.0±2.0

^z Each value represents the mean±SE. The percentage numbers of explants with regenerants were calculated.

Khan 등(2003)은 *Brassica napus*의 하배축 조직에서 품종간 재분화 반응을 분석하였는데, $0.4\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 와 $4\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 가 첨가된 MS 배지에서 'Cyclone' 품종이 92.0%의 가장 높은 재분화율 나타내었고, 'Rainbow' 56.6%, 'Dunkled' 46.2%, 'Oscar' 26.9%, 그리고 'Ks75' 12.0%의 재분화율을 나타내어 품종간 재분화 반응에 차이가 큼을 보고하였다. 이와 달리 본 연구에서는 NAA $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, BA $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 수준에서 재분화율이 가장 높았고 그 정도는 25.0% 내외로 낮았는데, 이는 유채에서의 품종간 차이로 생각되었다.

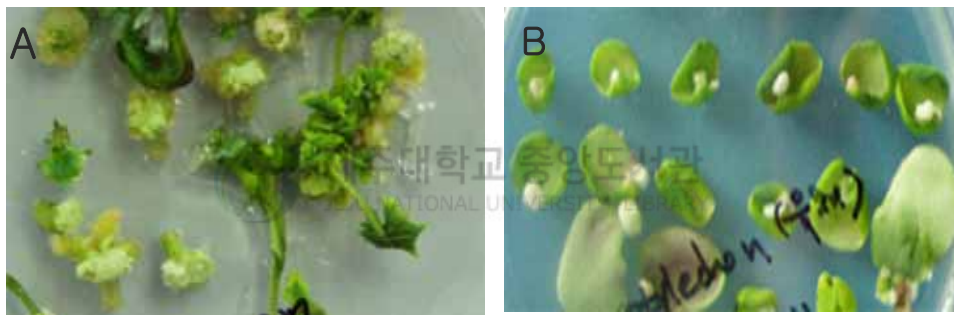


Fig. 4. Regeneration response of hypocotyl (A) and cotyledon explants (B) on MS medium supplemented with NAA $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and BA $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

조직간 재분화 반응을 살펴보고자 자엽과 하배축 조직의 절편체를 이용하였다. NAA $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, BA $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 수준에서 하배축 조직이 25.0% 내외의 재분화 반응을 나타낸 것과는 달리 자엽 조직은 전혀 재분화가 이루어지지 않았다(Fig. 4). NAA와 BA의 농도별 25조합에서 자엽은 캘러스를 형성시켰으나 싹은 전혀 형성되지 않았다. 또한 NAA 농

도가 $0.25\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 이상에서는 캘러스 형성과 함께 뿌리가 형성되었다 (Fig. 5). 이는 Basu 등(2001)이 MS 배지에 $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 만을 첨가한 조건에서 보고한 40 %의 재분화와 이 등(1998)이 MS 배지에 NAA $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 BA $2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 첨가한 조건에서 보고한 52 %의 재분화 반응과는 차이가 있었다. 그러므로 품종의 유전적 차이에 따라 조직의 재분화율 및 성장조절제에 대한 재분화 반응에 크게 달라질 수 있다고 보아진다. 본 연구에서 사용한 제주 재래종의 경우 자엽 조직이 신헌 재분화가 전혀 이루어지지 않아 형질전환 연구에서는 하배축 조직만을 이용하였다.



Fig. 5. Regeneration response of cotyledon explants on MS medium supplemented with $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA and $0.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA.

2. 형질전환

형질전환체 선발을 위한 kanamycin 에 대한 내성을 살펴보고자 재분화 배지에 항생제를 6수준으로 첨가하여 내성 및 선택성을 분석하여 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 하배축 조직의 절편체는 $25\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 수준에서부터 신초 재분화가 억제되었다. $25\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 수준에서 캘러스의 형성도 저해되었는데, 절편체 양끝의 절단면에서만 미약하게 캘러스가 형성되는 정도였다. $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 수준에서는 캘러스 형성이 완전히 억제됨은 물론 절편체 양끝 부분의 고사현상이 나타났고 농도가 높아질수록 고사 정도가 심하였다. 그러므로 형질전환체 선발을 위한 kanamycin의 적정농도는 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 수준으로 판단되었다. 이는 Cardoza 등(2003)이 사용한 $200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 Khan 등(2003)이 사용한 $100\sim 200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Schroder (1994) 등이 사용한 $250\sim 500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin의 농도와 비교하여 상당히 낮은 농도로서 재분화 반응과 마찬가지로 품종의 유전적 차이에 기인하는 것으로 생각된다.



Fig. 6. Resistance response of hypocotyl explants of rape to kanamycin supplemented in regeneration medium.

밭아 7일 후 식물체의 하배축 조직을 절취하여 0.6cm 내외의 크기로 절편체를 준비하였다. MS 재분화 배지 상에서 2일간 전배양한 후 *Agrobacterium*을 접종하였다. 2일 동안의 공동배양 후 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin과 $500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ carbenicillin을 첨가한 재분화 배지에서 4주간 배양하여 재분화 신초를 선발하였다.

재분화 2주 후부터 절편체 양끝 절단면에서 캘러스가 형성되기 시작하였고 3주 후부터는 일부 캘러스 부위에서 신초가 형성되기 시작하였으며 4주 후에는 0.7cm 정도로 성장하였다. 캘러스 부위에서의 신초발생은 단일 혹은 2~3개의 형태로 관찰되었고 일부 신초에서는 백화현상이 관찰되었다(Fig. 7).



Fig. 7. Adventitious shoot formation from the cutting edges of hypocotyl on selective regeneration medium explants in rape.

재분화 신초는 MS 기본배지에 $500\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ carbenicillin이 첨가된 신초신장 및 발근 배지에서 급속한 식물체 생육을 유도시켰다. 이 과정에서 대부분의 신초들이 왜화 현상(Fig. 8.)을 나타내었고, 이후로는 신초신장 및 발근 배지에 $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA를 첨가하여 사용하였다.

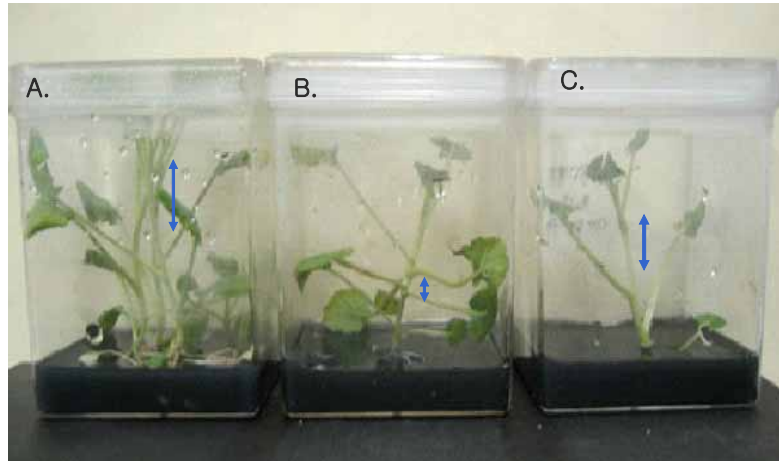


Fig. 8. Effect of GA supplemented in shoot elongation and rooting medium on shoot development. Non-transformant (control, A) and putative transformant (B) on free GA medium. Putative transformant (C) on medium supplemented with $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA. Arrows indicated the level of internode elongation.

신초 신장 및 발근 과정을 거친 개체들은 GUS 분석 및 PCR 분석으로 형질전환 여부를 확인하였다. GUS 분석 결과는 Fig. 9에 나타내었다. GUS 유전자 도입된 형질전환체로 추정되어지는 식물체 조직에서는 잘려진 도관 부분은 물론 식물체 전 부분에서 X-Gluc 염색용액에 의해 청색으로 염색되었다. 이는 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide가 기질로 작용하여 나타난 현상으로 GUS 유전자가 35S promoter에 의해 식물체 전 부위에서 활발하게 발현함을 알 수 있었다. 이는 Khan 등 (2003)의 연구결과와 유사하였다.

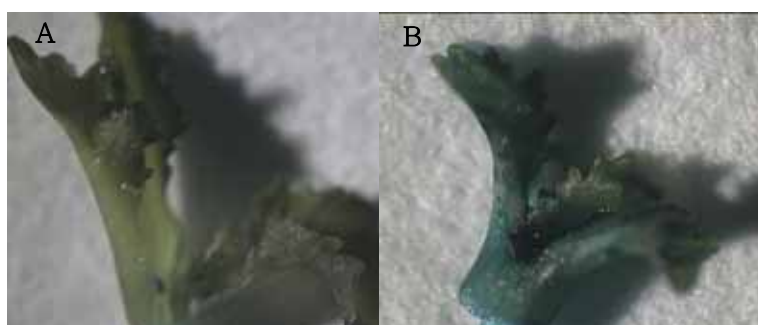


Fig. 9. GUS assay of the selected putative transformants A, non-transgenic tissue B, putative transformant tissue.

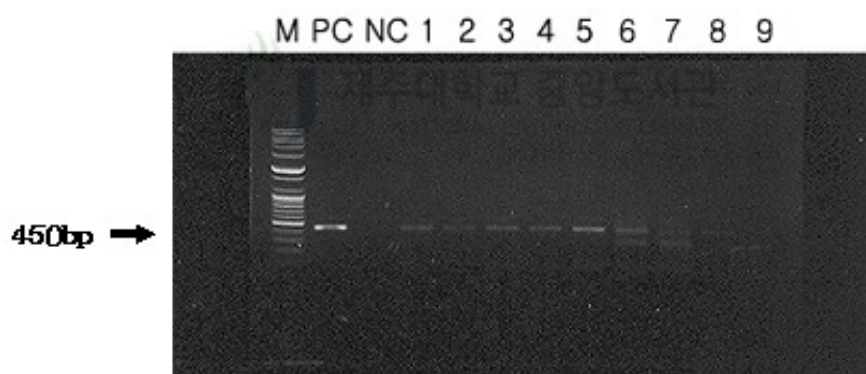


Fig. 10. PCR analysis of putative transgenic plants. PCR bands were detected for citrus pytoene synthase genes. M, 100pb plus maker; PC, Plasmid (positive control); NC, Non-transformant (negative control). Lane 1-8, putative transformants. No band represents the non-transformant (lane 9).

온주밀감의 pytoene synthase 유전자가 도입된 선발 식물체들의 경우 DNA를 추출하여 PCR 분석을 수행하였다. PCR 분석 결과는 Fig. 10에 나타낸 바와 같이 450bp 크기의 특이밴드를 확인할 수 있었다. PCR로 확인된 형질전환 식물체는 Fig. 11과 같이 순화하였다.



Fig. 11. Acclimatization of putative transformants.

*Agrobacterium*을 이용한 제주 재래 유채 하배축 조직의 재분화 및 형질전환 효율을 Table 5에 나타내었다. 하배축 조직의 절편체 재분화 정도는 25.0% 내외이었으나 *Agrobacterium* 접종한 후 항생제가 첨가된 재분화 배지에서 4주간 배양 했을 때의 재분화 정도는 16.0% 내외로 나타났고 PCR 또는 GUS 분석에 근거한 형질전환율은 8.0% 내외로 나타났다. 이는 송 등(2001)이 사과에서 *Agrobacterium* 접종 시 재분화율의 약 50%가 형질전환체로 확인되었다는 보고와 유사하였다.

Table 5. Efficiency^z of *Agrobacterium*-mediated transformation in rape (*Brassica napus* L.).

Regeneration without antibiotics	Regeneration with antibiotics	Transformation
25.0	16.0	8.0

^z The percentage numbers of explants with regenerants or transformants confirmed by PCR and GUS analysis were calculated.

카로티노이드 생합성 과정에서 phytoene synthase 유전자는 geranyl-geranylpyrophosphate (GGPP)로부터 phytoene을 합성하는 대사과정을 조절한다(Lindgren 등, 2003). 또한 GGPP는 GA와 엽록소의 phytol 사슬 합성의 전구물질이기도 하다. 본 연구에서 온주밀감의 phytoene synthase 유전자를 도입한 일부 식물체들이 백화 또는 왜화 현상을 나타내었다(Fig. 12). 이는 Busch 등(2002)이 phytoene synthase 유전자를 담배에서 과다 발현시킬 경우 전구물질의 감소로 엽록소 및 지베렐린 합성이 저해되어 백화현상과 왜화현상이 발생함은 물론 잎의 형태와 색이 변형될 수 있다는 보고와 유사하였다. 또한 phytoene synthase 유전자가 도입된 형질전환 유채에서 카로티노이드 합성이 증가하여 종자 색이 황색으로 바뀌거나 엽록소 함량이 감소하였고(Shewmaker 등, 1999), 애기장대에서는 카로티노이드 함량의 증가에 따라 abscisic acid의 함량이 증가하였으나 GA의 합성이 저해되어 발아가 지연될 수 있음이 보고되었다(Lindgren 등 2003). 그러므로 본 연구에서 얻어진 형질전환체들은 개화, 종자 형성 및 종자 발아 등과 관련하여 다양한 대사과정의 연구소재로 이용될 가능성이 높다고 보아진다.

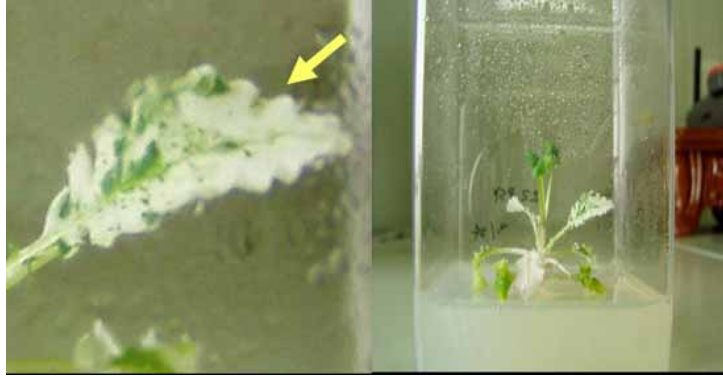


Fig. 12. Putative transformant showing abnormal pigmentation and bleaching of leaves.

VI. 적 요.

자원식물로 이용되고 있는 유채(*Brassica napus* L.)의 고부가가치 신품종 조기육성 및 유전체 정보해석 분야의 핵심 기반기술인 형질전환 기술을 개발코자 제주 재래종에 있어서 자엽 및 하배축 조직의 재분화 반응과 *Agrobacterium*을 이용 형질전환 연구를 수행하였다.

기내 발아한 유채 실생 자엽과 하배축의 NAA 및 BA 농도에 따른 재분화 반응을 조사하였다. 하배축 조직은 $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA 및 $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA 조합에서 25.0%의 가장 높은 신표 재분화 효율을 나타내었다. 반면, 자엽 조직은 신표 재분화가 전혀 이루어지지 않았다.

형질전환 재분화 신표 선발을 위한 kanamycin의 적정농도를 설정하기 위하여 하배축 절편체의 kanamycin에 대한 저항성을 분석하였다. $20\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 농도에서 신표형성이 저해되었고, $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 농도에서부터 캘러스 및 신표형성이 억제되었다.

하배축 절편체를 2일간 전배양한 후 *Agrobacterium* strain LBA4404를 접종하고 2일 공동배양한 다음 $0.1\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA, $1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA, 그리고 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kanamycin이 첨가된 MS 배지에서 4주간 신표 재분화를 유도하였다. 재분화 신표는 신표신장 및 발근 배지에서 급속 성장을 유도하였고 GUS 및 PCR 분석으로 목적 유전자 도입을 확인하였다. 이들 분석에 근거한 형질전환 효율은 8.0% 내외로 추정되었다.

V. 참 고 문 헌

- Basu, U., A.G. Good and G.J. Taylor. 2001. Transgenic *Brassica napus* plants overexpressing aluminium-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminium. *Plant Cell and Environment*. 24: 1269-1278.
- Bartley, G.E. and P.A. Scolnik. 1993. cDNA cloning expression during development and genome mapping of psy2 a second tomato gene encoding phytoene synthase. *Journal of Biological Chemistry* 268: 25718-25721.
- Bergman, P. and K. Glimelius. 1993. Electroporation of rape protoplasts : transient and stable transformation. *Physiol. Plant*. 18: 604-611
- Block, D.M., D. Brower and P. Tenning. 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: 694-701
- Busch, M., A. Seuter and R. Hain. 2002. Funtional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in Tabacco. *Plant physiol*. 128: 439-453.
- Cardoza, V. and C.N. Stewrt. 2003. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants. *Plant Cell Rep*. 21: 599-604.

Chapel, M. and K. Glimelius. 1990. Temporary inhibition of cell wall synthesis improves the transient expression of the GUS gene in *Brassica napus* mesophyll protoplast. Plant Cell Rep. 9: 105-108.

Chen, J.L. and W.D. Beverdorf. 1994. A combined use of microprojectile bombardment and DNA inhibition enhances transformation frequency of canola (*Brassica napus* L.). Appl. Genet. 88: 187-192.

조화진, 김신제, 김병동. 1992. *Agrobacterium*을 이용한 β -glucuronidase 유전자 도입 및 발현. 한국원예학회지 33: 259-265

Fray R.G., A. Wallace, P.D. Valero, D. Hedden., P. Bramley, and P.M. Grierson. 1995. Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. Plant J. 8: 693-701.



Gallois, P. and P. Marinho. 1995. Leaf disk transformation using *Agrobacterium tumefaciens*-expression of heterologous genes in tobacco. Plant Mol Biol. 49: 39-48

Golz, C., F. Kohler and O. Schieder. 1990. Transfer hygromycin resistance into *B. napus* using total DNA of a transgene *B. nigra* line. Plant Mol. Biol. 15: 475-483.

하선화, 김정봉, 박종석, 류태훈, 김경환, 한범수, 김종범, 김용환. 2003. 식물에서 Carotenoid 생합성 경로와 대사공학적 응용. 식물생명공학학회지 30: 81-95.

- Ha, S.H., S.W. Lee, J.G. Kim and Y.S. Hwang. 1999. Expression patterns of genes involved in carotenoid biosynthesis in pepper. *Agric Chem. Biotechnol.* 42: 92-96.
- Halfhill, M.D., G.A. Richards, S.A. Mabon and C.N. Stewart. 2001. Expression of GFP and Bt transgenes in *Brassica napus* and hybridization with *Brassica rapa*. *Theor Appl Genet.* 103: 659-667.
- 허태린. 1995. 카놀라 유채유 불포화 지방산 함량증진을 위한 분자유종. *대산논총.* 34-44.
- 장영석, 김철우, 최인후, 오용비, 정병준, 방진기, 권병선, 이정일. 2002. 유채의 목포 CGMS 및 유지친 개발. *한국육종학회지.* 34: 163-167.
- 장영석, 최인후, 오용비, 최수연. 1998. 유채 조숙 관상 종실 겸용 신품종 “탐미유채”. *특작논문집* 40: 67-70.
- 장영석. 2002. 유채품질평가 현황과 전망. *한국작물학회지.* 47: 175-185.
- Jones, V.E., B. Huang, I. Purdohomme, S. Bird, R. Kemble, J. Hattori and B. mike. 1995. Assessment of microinjection for introducing DNA into uni-nuclear microspores of rapeseed. *Plant cell Tiss. Org. Cult.* 40: 97-100
- Inomata, N. 2002. A cytogenetic study of the progenies of gybrids between *Brassica napus* and *Brassica oleracea*, *Brassica bourgeau*, *Brassica cretica* and *Brassica montana*. *Plant Breeding.* 121: 174-176.

- Khan, M.R., H. Rashid, M. Ansar and Z. Chardry. 2003. High frequency shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer in Canola(*Brassica napus*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 75: 223-231.
- Kim, K.M., J.K. Sohn and J.D. Chung. 1997. Transformation of *Brassica napus* via *Agrobacterium* Vector : Plant regeneration and progeny analysis. *Korean J. Plant Tissue culture*. 24: 269-272.
- Knutzon, D.S., G.A. Thompson, S.E. Radke, W.B. Johnson, V.C. Knauf and J.C. Krid. 1992. Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proc Natl Acad Sci*. 89: 2624-2628
- 권병선, 진일두, 장영석. 1992. 유채 내열개성 정도의 품종간 차이. *한국육종학회지* 24: 335-342.
- Laurence, J.M., L.M. Wayne, P.E. Hedley, T. Shepherd, H.V. Davies, S. Millam and M.A. Taylor. 2004. Metabolic engineering of high carotenoid potato tubers containing enhanced levels of β -carotene and lutein. *Journal of Experimental Botany* 1: 1-9.
- Leckband, G., M. Frauen and W. Fried. 2002. NAPUS 2000 rape(*Brassica napus*) breeding for improved human nutrition. *Food Research International* 35: 273-278.
- Lee, B.H., J.K. Bang, S.N. Ryu and K.S. Kim. 2002. Status and prospect of rape production in Korea and Canada. *Kor. J. Agri*. 10: 1-7.

- Lee, H.S., M.S. Chung and J.K. Jo. 1998. Transformation of *Brassica napus* with Glutathione Reductase Gene. J. Korean Grassl. Sic. 18: 69-76.
- Lee, Y.H., S.B. Lee, C.S. Suk, M.O. Byun and H.I. Kim. 2000. Herbicide resistant Cabbage(*Brassica oleracea ssp. capitata*) Plants by *Agrobacterium*-mediated Transformation. J. Plant Biotechnology. 2: 35-41.
- Lindgren, L.O., K.G. Stalberg and A.S. Hoglund. 2003. Seed-specific overexpression of an endogenous arabidopsis phytoene Synthase Gene Results in Delayed germination and increased levels of carotenoids, chlorophyll and abscisic acid. Plant physiology. 132: 779-785.
- Palmer E.C. and A. Kelle. 2002. Transgenic Oilseed Brassicas, p 773-792. in: Transgenic plants and crops. Marcel Dekker, INC.
- Rahman, M.H., M. Joersbo and M.H. Poulsen. 2001. Development of yellow-seeded *Brassica napus* of double low quality. Plant Breeding. 120: 473-478.
- Ravanello, M.P., K.D. Alvarez, J.B. Huang and C.K. Shewmaker. 2003. Coordinate expression of multiple bacterial carotenoid genes in canola leading to altered carotenoid production. Metab Eng. 2003 5(4): 255-63
- Schroder, M.C. Dixelius., R. Lennart and G. Kristina. 1994. Transformation of *Brassica napus* by using the *aadA* gene as selectable marker and inheritance studies of the marker genes. Physiologia plantarum. 92: 37-46.

Shewmaker, C.K., J.A. Sheely, M. Daley, S. Colburn and D.Y. Ke. 1999. Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J.* 20: 401-412

손재근, 김성희, 김경민. 1993. *Agrobacterium*을 이용한 유채(*Brassica napus*)의 형질전환. *한국육종학회지.* 26: 46-52.

송관정, 성은수, 황전환, 제갈성, 차지은, 김정희, 신용익. 2001. 사과 갈라 품종의 *Agrobacterium* 이용 형질전환에 영향을 미치는 요인. *한국조직배양학회지.* 28: 221-225.

Souvre, A., M.F. Jardinaud and G. Albert. 1993. Transient GUS gene expression in *Brassica napus* electroporated microspores. *plant cell Rep.* 93: 177-184.



Stewart, C.N., M.J. Adang, P.L. Raymer and S.P. Ramachandran. 1996. Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillusthuringiensiscry* IAC gene. *Plant Physiol.* 112: 115-120

Sun, M. X.H. Tian and C.Y. Yao. 2004. High frequency conversion of microspore-derived embryos of *Brassica napus* cv. topas by supplemental calcium and vitamins. *Plant Cell and Organ Culture* 76: 159-165.

Wang, W.C., G. Menon and G. Hansen. 2003. Development of a novel *Agrobacterium*-mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants. *Plant cell Rep.* 22: 274-281

Zhang, H.Z., J.N. Hodson, J.P. Williams and E. Blumwald. 2002. Engineer salt-tolerant brassica plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plant with increased vacuolar sodium accumulation. PNAS 98: 12832-12836.



감사의 글

길지 않은 2년이란 시간동안 많은 시행착오를 겪으면서 이 논문을 완성하게 되었습니다. 이 자리에 당당히 설 수 있도록 도와주신 모든 분들께 감사드립니다.

부족한 저를 이 자리까지 올 수 있도록 이끌어 주시고 세심한 조언을 아끼지 않으신 송관정 교수님께 감사드립니다. 바쁘신 와중에 많은 가르침을 주셨던 문두길 교수님, 소인섭 교수님께 마음 깊이 감사드립니다. 그리고 학부 때부터 지금까지 저에게 많은 가르침과 조언을 주신 박용봉 교수님, 강 훈교수님, 대학원 과정 중 도움을 주신 한상헌 교수님께도 감사드립니다.

본 연구를 편히 수행할 수 있도록 배려해주신 Bio-Agr.의 모든 분들께 감사드립니다. 이세영 교수님, 든든한 버팀목 전경용 팀장님, 아무것도 모르던 저와 처음부터 함께해주신 오현정 선배님, 실험과정중 많은 가르침과 격려를 해주신 홍권춘 선생님, 그동안 저에게 많은 도움을 준 난희언니, 김현정언니, 순복 모두 감사드립니다.

대학원에 몸을 담는 동안 도움을 주셨던 선후배님들께도 감사드립니다. 많은 조언을 해 주셨던 치원오빠 같이 졸업하는 시현오빠, 안희언니, 임찬규 조교선생님, 변재웅 조교선생님 제게 가장 큰 힘이 되어준 진웅오빠, 미선언니, 보경언니 모두 감사드립니다. 그리고 언제나 미안하기만한 희범, 셋별, 은진, 동욱, 에게도 감사의 인사를 전합니다.

2년이란 시간을 늘 옆에서 함께 해준 민욱언니, 너무 고생한 윤희, 늘 뒤에서 애정어린 핀잔과 응원을 해줬던 현진, 보고싶은 지현 모두 고맙습니다.

괜히 바쁜 척 하던 날 이해해준 친구들; 현이, 현진, 복희, 경화, 은주, 민경, 윤정, 남순. 언제나 한결같은 13년지기 은미 모두 고맙다.

서울에서 고생하고 있는 언니, 언제나 힘이 되어 준 동생, 인쇄하시느라 수고하신 작은아빠, 그동안 지켜봐주신 할아버지, 할머니, 마지막으로 사랑하는 부모님께 이 지면으로나마 그동안 못 드렸던 감사의 말씀을 전합니다.