

Breeding of Self-compatible Strains by RNA Interference Using Self-incompatible Male Determinant Gene *SP11* in *Brassica*

정효진¹, 박종인², 노일섭^{1*}

¹순천대학교 식물생산과학부, ²이와테대학 농학부

목적

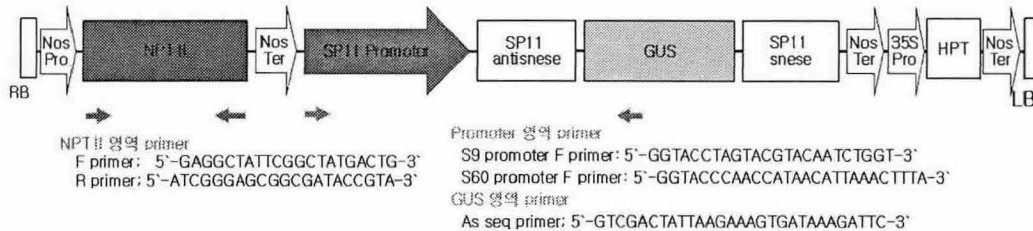
RNA interference(RNAi)를 이용하여 자가불화합성 *Brassica*류를 자가화합성으로 개변하고자 함. 화분측 자가 불화합성 유전자인 *SP11/SCR*의 RNAi cassette 및 vector를 구축하고, 아그로박테리움 매개법에 의하여 배추류 ('Osome', 'Seoulbaechu')에 형질전환을 하여 자가화합성 계통을 육성함.

재료 및 방법

1. 공시재료

시판중인 F₁ 'Osome'(S⁵²S⁶⁰)와 'Seoulbaechu'의 배축을 절출하여 이용하였다.

2. 형질전환체 검정용 primer 위치 및 sequence



3. 형질전환방법

Agrobacterium 매개법에 의하여 'Osome' 및 'Seoulbaechu'에 RNAi vector를 도입하였다.

파종(1/10 MS 배지) ⇒ Pre-culture(파종 후 6일째) ⇒ Agrobacterium Infection(파종 후 7 일째) ⇒ Callus 유도(감염 3후) ⇒ 재분화 배지에 계대배양(감염 10일째) ⇒ 성숙배지에 계 대배양(감염 62일째) ⇒ 발근배지에 계대배양(감염 83일째) ⇒ 순화 ⇒ 춘화처리 ⇒정식

4. RT-PCR을 이용한 형질전환체의 SP11 유전자 발현분석

	SP11S52 primer	SP11S60 primer
Forward primer	atg aaa tcc gtt ctt tat gc	atg aga tat gct act tct ata tat aca
Reverse primer	t tgt cgt tgt aaa ata tgc t	c tgt tgc aaa gtt aaa tca t

5. Aniline blue 염색법에 의한 화분관 검경

고정(ethanol : acetic acid = 3 : 1에 5시간) ⇒ 1N NaOH 용액에 2시간(60°C) ⇒ 0.01% aniline blue 용액(2시 간)에 반응시킨 후 형광현미경으로 관찰

결과 및 고찰

1. 재분화계 확립

재분화계를 확립하기 위하여 'Osome' (*B. rapa*, S^{60}/S^{52})에 GUS 및 Bromelain 유전자를 도입하였고, GUS 유전자를 도입한 'Osome'의 callus를 이용하여 GUS assay 실시하였다(Fig. 1A). 또한 GUS 유전자 도입 'Osome'의 NPT II 유전자를 PCR 분석에 의해 검정할 수 있었다(Fig. 1B).

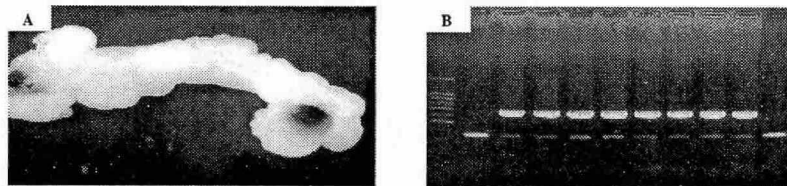


Fig. 1. A: Gus assay in 'Osome'. B: PCR amplification of NPT II gene of transformants (F: GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG, R: ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA).

2. RNAi vector 구축

웅성측 자가불화합성 유전자인 *SP11/SCR*의 RNAi cassette를 구축, pBI101 vector 및 pBI121에 삽입하여 *B. rapa*용 vector 4종, *B. oleracea*용 vector 2종 그리고 GUS 발현용 vector 4종을 구축하였다(Fig. 2).

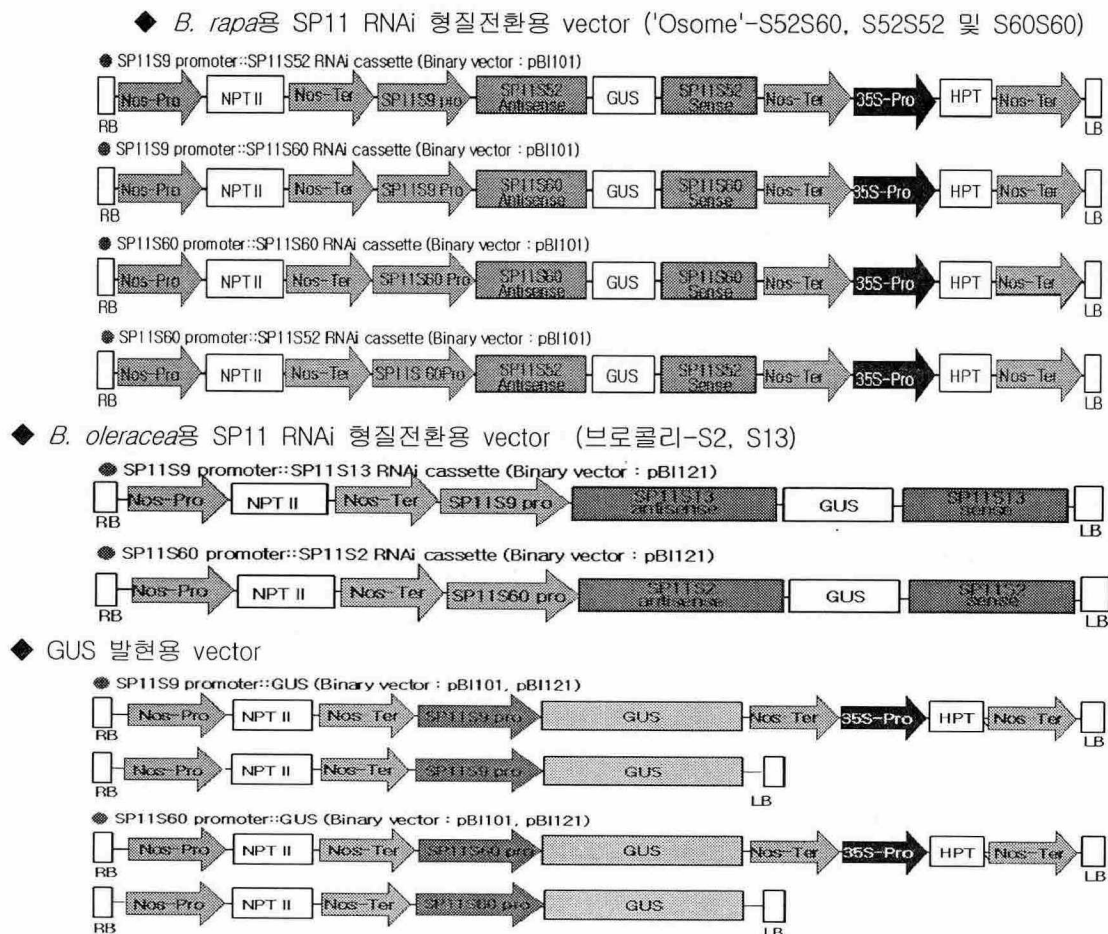


Fig. 2. Structures of constructed vector

3. GUS 발현 분석

형질전환체의 GUS 발현 분석을 위하여 핵 단계별로 GUS 활성을 조사하였다. 1핵기의 약 조직에서는 tapetum 세포에서만 활성을 보였고, 약 발육이 종료한 2핵기 및 3핵기에서는 화분립에서 활성을 나타냈다(Fig. 3).

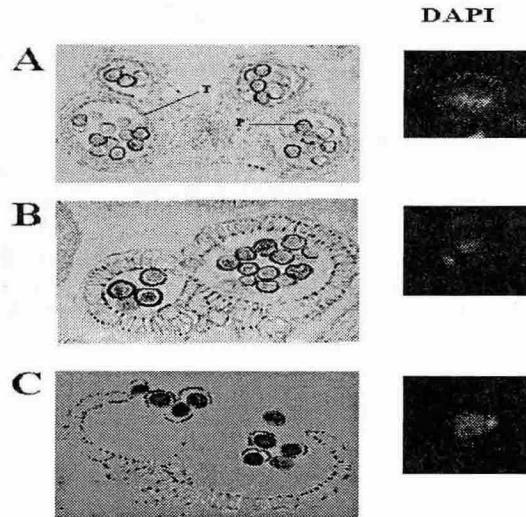


Fig. 3. GUS expression analysis in transgenic plants. Cross-section of anther stages was uni-(A), bi-(B), and tricellular microspores after anther dehiscence(C). GUS activity at nuicellular microspore stages was only observed in the tapetum(A). GUS activity at bi- and tricellular microspore stages after anther development was detected in pollen grains(B, C). T; Tapetum, P; Pollen grain

4. 형질전환체 획득 및 확인

Agrobacterium 매개법을 이용하여 'Osome'(B. rapa, S⁶⁰/S⁵²) 및 서울배추에 RNAi vector를 도입하였다. 그 결과 Osome' 270개체와 'Seoulbaechu' 2개체의 형질전환체를 획득하였다. 획득된 형질전환체에 RNAi vector가 도입되었는지를 확인하기 위하여 gDNA를 추출 후 NPTII 영역의 primer 및 각각의 promoter영역과 GUS 영역에서 primer를 합성하여 PCR 증폭에 의해 형질전환체임을 확인하였다(Fig. 4).

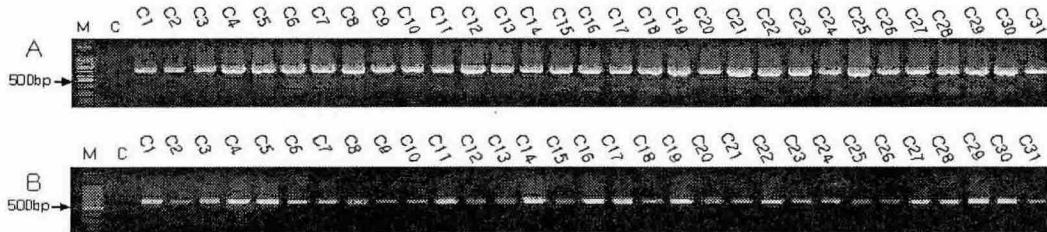


Fig. 4. PCR analysis of the NPTII gene and specific primer in transgenic plants. SP11S9 promoter::SP11S52 RNAi cassette A: NPTII primer, B : specific primer(M-marker, C-wild type)

5. SP11의 발현 및 기능

형질전환체는 5°C 인큐베이터에서 40일 이상 춘화처리 후 개화를 유도하였다. 형질전환체의 SP11 유전자의 발현양상을 분석하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 SP11S9 promoter::SP11S52 RNAi cassette 및 SP11S60 promoter::SP11S60 RNAi cassette가 도입된 형질전환체에서 SP11 유전자가 발현되지 않았으며(Fig. 5), 이들 형질전환체들의 화분관 검경결과 자가화합성으로 표현형이 변경된 개체가 5개체 확인되었으나, 자식 분리세대의 검토가 요망된다. 또한 도입된 RNAi cassette의 homo-event화를 위하여 자식종자(T₁)를 83개체(SP11S9

promoter:: SP11S60 RNAi cassette, 17개체; SP11S60 promoter:: SP11S60 RNAi cassette, 18개체('Seoulbaechu' 1개체 포함); SP11S9 promoter::SP11S52 RNAi cassette, 6개체('Seoulbaechu' 1개체 포함); SP11S60 promoter::SP11S52 RNAi cassette, 42개체)를 획득하였다.

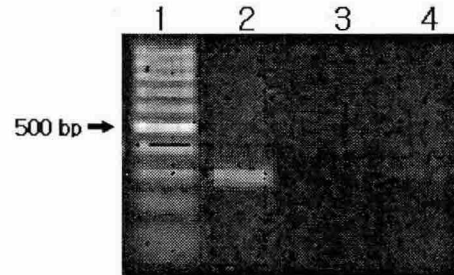


Fig 5. RT-PCR analysis of the SP11 gene in transgenic plants. Lane 1: molecular weight Marker (100 bp DNA ladder); Lane 2: DNA from wild-type plants; Lane 3: DNA from transgenic plants(SP11S9 promoter::SP11S52 RNAi cassette); Lane 4: DNA from transgenic plants(SP11S60 promoter::SP11S60 RNAi cassette)

6. 금후의 연구

- 'Osome'의 분리세대 $S^{52}S^{52}$ - 및 $S^{60}S^{60}$ -호모접합체에 RNAi vector를 도입할것임.
- GUS 발현 vector(4종)을 이용한 형질전환체('Osome')를 작제하여 promoter의 기능을 상세히 분석할 것임.
- 양배추에 SP11S60 promoter::SP11S2(class II용) 및 SP11S9 promoter::SP11S13 (class I용) RNAi cassette를 도입 할 것임.
- 형질전환체의 자식(T1)세대를 전개하여 homo-event화 할 것임.
- 형질전환체의 small RNA를 검출(Northern blot)하고, SP11 silencing 분석(RT-PCR, Real time PCR)을 실시 할 것임.
- S^{52} disruption 형질전환체에 있어서 S^{60} 의 mRNA 발현 유무를 검토(Northern blot) 할 것임.

*연락처 : 노일섭, 전화 061-750-3249, E-mail : nis@sunchon.ac.kr(구두 발표)