



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

들깨의 고효율 재분화 및 형질전환 체계 확립

Establishment of a highly efficient plant regeneration and
transformation system in Korean perilla

XU RUYUE

제주대학교 대학원

분자생명공학과

2024년 2월



들깨의 고효율 재분화 및 형질전환 체계 확립

이 논문을 생명공학 석사 학위논문으로 제출함

서여월

제주대학교 대학원

분자생명공학과

지도교수 이효연

서여월의 생명공학 석사 학위논문을 인준함

2024년 2월

심사위원장 인

위 원 인

위 원 인



목 차

요약	1
Abstract	3
표 차례	5
그림 차례	6
I. 서론	10
II. 재료 및 방법	13
1. 들깨 품종 및 시료의 무균 처리	13
2. 들깨 켈러스 유도 및 재분화	13
2-1. 들깨 켈러스 및 재분화 유도	13
2-2. 뿌리 유도 및 식물 순화	14
3. 형질전환 vector 구축 및 Agrobacterium 형질전환.....	14
3-1. pKHG1125-OSISAP1 클로닝	14
3-2. Binary vector 제조 및 Agrobacterium tumefaciens transformation	16
4. 다유들깨 감염 및 형질전환체 선발	16
4-1. <i>A. tumefaciens</i> 균배양	16
4-2. <i>A. tumefaciens</i> 감염 및 공동배양	17
4-3. 재분화 유도 및 선발	17
5. 형질전환 다유들깨의 유전자 도입 확인	18

5-1. PAT 단백질의 발현 확인	18
5-2. Genomic DNA 추출 및 PCR 분석	18
III. 결과 및 고찰	21
1. 조직배양	21
1-1. 자엽, 하배측과 잎의 캘러스유도	21
1-2. 암/장일조건에 캘러스유도	22
1-3. 건강한 신초의 재분화 조건 확립	24
1-4. 뿌리유도	24
2.형질전환 다유들깨의 선발 및 유전자 도입 확인	24
2-1. 하배측 통해 감염된 형질전환 다유들깨의 선발	25
2-2. 형질전환 식물체의 유전자 도입 확인	26
IV. 종합 고찰	43
V. 인용문헌	45

들깨의 고효율 재분화 및 형질전환 체계 확립

서여월

제주대학교 대학원 분자생명공학과

요약

본 연구는 들깨의 유식물체에서 캘러스 유도를 통한 고효율의 재분화 및 형질전환 체계를 구축하기 위해 연구를 진행하였다. 캘러스는 잎, 자엽, 하배축 중 0.1 mg/L NAA 와 0.5 mg/L BA 가 첨가된 배지에서 배양된 다유들깨의 하배축에서 가장 건강한 캘러스가 형성되었다. 암상태와 장일조건에서 각각 캘러스를 유도한 후 신초 재분화를 유도했을 때 모든 조건에서 남천들깨보다 다유들깨가 재분화율이 월등하게 높았다. 가장 높게 나타난 0.1 mg/L NAA 와 0.5 mg/L BA 배지의 암상태와 장일조건에서 다유들깨 하배축의 신초 재분화율은 각각 86.7%와 84.4%로 두 조건 간 차이는 낮은 것으로 조사되었다. 본 연구에서 다유들깨의 하배축으로부터 고효율의 재분화 조건을 확립하기 위해 다양한 식물생장호르몬 조합실험을 수행한 결과 NAA 없이 0.5 mg/L BA 만 첨가된 배지에서 가장 높은 90%의 재분화율을 보여 주었으며 이 중 정상적인 식물체가 70.5%, 비정상적인 식물체가 19.3%로 조사되었고 NAA 가 첨가되거나 농도가 높아질수록 비정상 식물체의 출현율이 높아졌다. 정상적으로 재분화된 신초는 1/2 MS 배지로 옮긴 후 10-15 일 후에 뿌리가 관찰되었고 30 일 후에는 완전한 식물체로 성장하였다. 치상된 다유들깨 하배축은 $OD_{600}=0.5\sim0.6$ 의 Agrobacterium 균액에서 감염하였고 500 mg/L cefotaxime 과 0.5 mg/L PPT 가 함유된 Selection

medium 에서 선발한 28 개의 후보 형질전환체 중 4 개가 유전자가 도입되었음을 확인하였다. 본 연구에서 확립된 다유들깨 하배축을 이용한 재분화 체계는 지금까지 보고된 다른 들깨 품종들의 재분화 체계에 비해 재분화 효율이 높았으며, 이 고효율 재분화 체계를 이용하여 들깨의 형질전환 제조 체계를 확립하였다. 앞으로 들깨에서 조직배양과 형질전환에 의존하는 유전자편집 등의 분자유종 분야에 유용하게 이용하면 높은 경제적 가치를 가져오는 들깨 품종을 효율적으로 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

Establishment of a highly efficient plant regeneration and transformation system in Korean perilla

XU RUYUE

Department of Biotechnology

Jeju National University

Abstract

This study was conducted to establish a highly efficient plant regeneration and transformation system in *Perilla frutescence* L. The healthiest callus was formed on the hypocotyl cultured in a medium containing 0.1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA, outperforming the leaf and cotyledon samples. In both dark and long-day conditions, Dayu consistently exhibited significantly higher shoot regeneration rates compared to Namcheon. The highest shoot regeneration rate in Dayu was observed at the hypocotyl under the conditions of 0.1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA media, with shoot regeneration rates in Dayu hypocotyl reaching 84.4% and 86.7% under dark and long-day conditions, respectively. This study tested various combinations of plant growth regulators to establish an optimal shoot regeneration condition from Dayu's hypocotyl. The results demonstrated that the highest shoot regeneration rate, at 90%, was achieved when only 0.5 mg/L of BA was added to the medium without NAA. Among the regenerated shoots, 70.5% were normal plants, while 19.3% were abnormal. The addition of NAA or an increase in its concentration

led to a higher occurrence of abnormal plants. After the regenerated shoots were transferred to 1/2 MS medium, roots were observed within 10–15 days. By the 30th day, they had developed into complete plants. Hypocotyl of Dayu infected with *Agrobacterium* infection medium of $OD_{600}=0.5\sim0.6$. Four out of 28 candidate plants selected from Selection medium containing 500 mg/L cefotaxime and 0.5 mg/L PPT were identified for genotyping. The results obtained from the hypocotyl of Dayu, a Korean perilla variety, has higher regeneration efficiency than other perilla varieties reported at present, and the efficient transformation system of Perilla was established by using this efficient regeneration system. The results obtained from the hypocotyl of Dayu, a Korean perilla variety, would contribute high economic value in efficient tissue culture system and transformation system.

표 차례

Table 1. Composition of the medium used for transformation of perilla

Table 2. Shoot regeneration rates from cotyledon, hypocotyl, and leaf explants of ‘Namcheon’ and ‘Dayu’ under various combinations of BA, BA/NAA or BA/IAA

Table 3. Shoot regeneration rate from hypocotyl of ‘Dayu’ under dark and long-day conditions

Table 4. Frequency of normal plant regeneration from ‘Dayu’ callus according to changes in NAA concentrations

그림 차례

Figure 1. Plant tissue culture process

Figure 2. The callus of cotyledon, hypocotyl and leaf of *P. frutescens* L. var 'Dayu' and var 'Namcheon' cultured on medium containing 0.1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA under long-day condition after 2 weeks

Figure 3. The callus cultured on the MS medium containing different concentrations (mg/L) of combined plant growth regulators from cotyledon of perilla c.v. 'Namcheon' and c.v. 'Dayu' after 5 weeks

Figure 4. The callus cultured on the MS medium containing different concentrations (mg/L) of combined plant growth regulators from hypocotyl of perilla c.v. 'Namcheon' and c.v. 'Dayu' after 5 weeks

Figure 5. The callus cultured on the MS medium containing different concentrations (mg/L) of combined plant growth regulators from leaf of perilla c.v. 'Namcheon' and c.v. 'Dayu' after 5 weeks

Figure 6. The calli from the hypocotyl of *P. frutescens* var. Dayu cultured on MS medium with various concentration combinations (mg/L) of NAA and BA under dark or long-day conditions. Scale bars are 2 mm

Figure 7. The callus of *Perilla frutescens*. cultivar 'Dayu' cultured on MS medium with different concentration combinations of NAA and BA

Figure 8. The callus of *Perilla frutescens*. cultivar 'Namcheon' cultured on MS medium with different concentration combinations of NAA and BA

Figure 9. Plant regeneration efficiency of explants at different positions along hypocotyl of Dayu variety. (a) Four explants of the hypocotyl, including the apical end, top, middle, and bottom in the Dayu seedling (b) Shoot regenerations from apical end, top, middle, and bottom explants (c) Shoot regeneration rate of each explant. The vertical bars indicate the standard deviations

Figure 10. The comprehensive experimental process from hypocotyl explant to shoot and root regeneration *via* callus in Dayu variety. (a) Explant on callus induction medium. (b) Callus induction, cultured for 15 days on 0.1 NAA and 0.5BA (mg/L). (c) Shoot formation, cultured for 20 days after transferring

the callus from (b) into 0.5BA (mg/L) without NAA. (d) Rooting for 15 days and (e) entire plant regeneration. The shoot from (c) was transferred to 1/2MS medium without NAA and BA to induce roots

Figure 11. Efficiency of plant regeneration from callus tissue of perilla under different selection medium. (a) Callus from perilla hypocotyl after 4 weeks of culture on different combinations of selected media. Percentage of callus formation (b) and regenerating callus (c) after 4 weeks of culture on different combinations of selected media. Selected media = MS + 0.1 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA + 250 or 500 mg/L cefotaxime + 0~2 mg/L PPT

Figure 12. Plant regeneration from infected hypocotyl of perilla under selection medium. **A** Callus clumps cultured on selection medium after 6 weeks with 0.5 or 1 mg/L PPT from hypocotyl infected by different concentration of Agrobacterium liquid. **B** Callus survival rate after 6 weeks of culture on selection medium with 0.5 or 1 mg/L PPT from hypocotyl infected by different concentration of Agrobacterium liquid. **C** Co-cultured hypocotyl transferred on the selection I medium (a) and cultured on the selection II medium for 2 weeks (b) after transferring the 2 weeks-old callus from selection I medium. (c) Shoot formation after cultured on selection II medium for 4 weeks. (d) Root formation after cultured on

selection III medium for 15 days. The vertical bars indicate the standard deviations

Figure 13. PAT protein detection and PCR analysis of OSISAP1 gene and BAR gene in transgenic *Perilla frutescence* cultivar Dayu. (a) PAT protein detection of wide-type and 5 selected PPT resistant plants. (b) Genomic-PCR analysis of putative transgenic perilla. WT, wild type plant; L1-L5, transgenic plants

I. 서론

들깨(*Perilla frutescens*)는 꿀풀과(Lamiaceae)의 한해살이 식물로, 중국, 인도, 한국, 일본, 베트남 및 기타 아시아 지역에서 식품(Asif et al. 2010, Heci 2001) 또는 약용식물(Ahmed et al. 2018)로 널리 재배되어 왔다. 들깨 종자에서 추출된 기름은 특별한 향을 가지고 있어서 소스(sauce), 과자, 치약 등의 향료로 이용되고 또한 강한 방부력을 가지고 있어 향곰팡이 재료로도 이용되고 있다(Hong YP et al. 1986). 들깨의 종자는 40~50%의 지방을 가지고 있고 그 중 90% 이상이 올레산(18:1), 리놀레산(18:2), 리놀렌산(18:3) 등의 불포화 지방산이 차지하고 있다 (Kim et al. 2019). 특히 들깨 지방산의 60% 이상을 차지하고 있는 리놀렌산(α -linolenic, ALA)은 심장질환 예방, 알레르기 치료, 암예방 등에 효과가 있어 널리 연구되고 있으며 그 경제적 가치는 매우 높다(Huang et al. 2023, Kaur N et al. 2014, Pressi et al. 2023).

한국에서 재배되는 주요 들깨 품종에는 남천, 다유, 동글2호, 늘보라, 일엽, 보라, 새엽실 들깨 등이 있다. 엽채용으로 많이 재배되고 있는 남천들깨의 잎에는 비타민 E 와 칼슘의 함량이 높고 종자에는 스쿠알렌의 함량이 높다 (Um et al. 2013, Han et al. 2004, Jung et al. 1998). 종유용(seed oil)으로 육성된 다유들깨(Dayu)는 표준품종인 새엽실들깨보다 기름함량이 높고 리놀렌산 또한 높은 함량을 가지고 있어서(Lee et al. 2011) 최근에는 다유가 많이 연구되고 있다 (Kim et al. 2022, Ha et al. 2012).

식물의 퀘러스 유도과 재분화는 식물재료의 유전형 및 절편체의 종류에 따라 식물생장호르몬의 구성에 차이가 있고 또한 연구자에 따라 다르게 보고되기도

한다 (Kim et al. 1993, Kim and Lee 2007, Lee et al. 1994, Moon et al. 2002,). 들깨의 경우 약(anther)은 NAA 와 kinetin 의 조성(Lee et al. 2003)이 재분화 효율이 좋았고 자엽과 하배축은 BA 와 NAA 의 조성이 효과적이었다 (Kim and Lee 2007, Jung 1999). 현대식물생명공학의 연구는 형질전환기술과 유전자재조합기술을 기반으로 하는 과발현 혹은 유전자편집을 통해 이루어지고 있으며 형질전환의 효율은 대부분의 식물에서 조직배양체계의 확립과 식물 재분화 효율이 매우 중요하게 작용한다.

여러 들깨품종에서 엽실(Yeopsil)들깨와 만백(Manbeak) 들깨에서 유전자 과발현 또는 유전자편집을 이용한 Knock-out 논문이 보고된 바 있다 (Kim et al. 2004, Lee et al. 2019, Yamazaki et al. 1997, Yun et al. 2023). *Agrobacterium* 법(Chai et al. 2003)을 사용하여 들깨에 특정 유전자가 포함된 vector 를 도입하였고, 지방산 생산, 병저항성, 산패방지 등의 여러 가지의 좋은형질을 향상시켰다.

본 연구에서는 다유들깨를 가지고 하배축, 자엽, 본엽의 절편체를 재료로 조직배양을 시도하였고 다양한 조합의 식물생장호르몬이 배합된 배지 실험을 통해 고효율의 재분화시스템을 확립하였으며 확립된 고효율 조직배양체계를 기반으로 들깨형질전환 체계를 확립하였다.

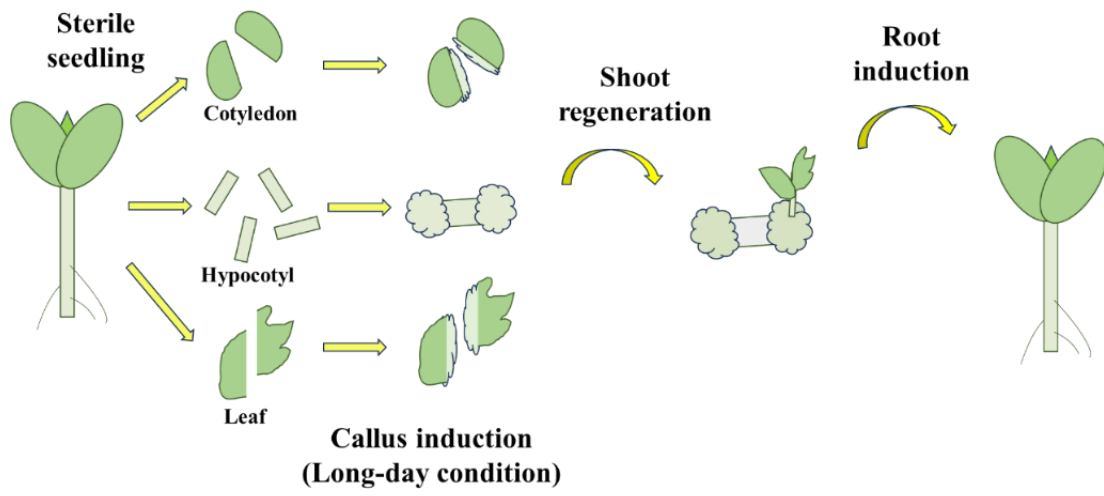


Figure 1 Plant tissue culture process.

II. 재료 및 방법

1. 들깨 품종 및 시료의 무균 처리

본 연구에 사용된 두 가지 들깨 품종, ‘다유들깨’ (*Perilla frutescens* L. cultivar Dayu)와 ‘남천들깨’ (*P. frutescens* L. cultivar Namcheon)의 종자는 농촌진흥청 국립식량과학원 남부작물부에서 제공받았다. 들깨 종자는 70% 에탄올에서 1 분간 혼든 후 0.03% Tween20 이 첨가된 1% NaClO 용액에서 30 분간 소독 후, 멸균수로 5 회 세척하였다 (Kim and Lee 2007). 표면 살균소독한 남천과 다유들깨의 종자를 MS 배지(Murashige and Skoog 1962)에 각각 파종하여 발아 후 성장한 10~15 일된 유식물의 자엽, 하배축, 본엽을 각각 절취하여 실험에 이용하였다. 자엽과 본엽 절편의 길이는 모두 0.5 cm x 0.5 cm 이고, 하배축의 길이는 1 cm 이다.

2. 들깨 캘러스 유도 및 재분화

2-1. 들깨 캘러스 및 재분화 유도

조직배양의 기본배지는 MS 배지를 사용하였다. 최적의 캘러스 및 재분화를 위해서 이미 발표된 들깨 조직배양 논문을 참고하여 오옥신은 1-Naphthaleneacetic acid(NAA) 또는 Indole-3-acetic acid(IAA), 시토키닌은 6-benzylaminopurin(BA)을 선택하였다 (Kim and Lee 2007, Lee et al. 2003,

Hou and Jia 2005, Tariq Hossain et al. 2010, Zhang 2007,). 캘러스의 유도는 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 암조건과 장일조건(조명 1600~2000 lux, 명 16 시간/암 8 시간)에서 2 주 동안 하였고, 재분화유도는 캘러스가 유도된 식물 절편체를 재분화를 위한 배지로 옮긴 후 장일조건 환경에서 진행하였다. 각각의 실험에서 적용된 식물생장호르몬의 조합과 농도는 Table 2, 3, 4 에 제시하였다. 캘러스의 유도는 치상 후 2 주 후에 조사하였고, 신초의 형태 및 재분화율의 분석은 재분화배지로 옮긴 후 4 주 혹은 5 주 후에 조사하였다.

2-2. 뿌리 유도 및 식물 순화

식물생장호르몬을 첨가하지 않은 1/2 MS 배지에서 유도하였고 (Kim et al. 2004, Hou et al. 2005, Zhang et al. 2005), 들깨 뿌리를 배양 15 일 후 관찰하였다. 뿌리는 기내에서 정상적인 줄기와 잎과 뿌리로 자란 식물체는 상토와 모래를 1:1 로 섞은 화분으로 옮겨 온실에서 순화시켰다.

3. 형질전환 vector 구축 및 Agrobacterium 형질전환

3-1. pKHG1125-OSISAP1 클로닝

벼 유래의 SAP 유전자와 선발마커인 비선택성 제초제 내성유전자인 BAR 유전자(bialaphos resistance gene)를 pKHG1125 vector 으로 도입하였다. 물에서 발아한 후 15 일간 성장된 벼 유식물 잎의 RNA 는 TRIzol 시약 (invitrogen, USA)을 이용하여 추출하였다. First-stand cDNA 합성에 M-MLV

reverse transcriptase(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였다. 특이적 primer 세트는 GenBank(AC108756)에 OSISAP1 의 ORF 서열을 이용하여 디자인되었다. Forward primer 는 5' -ATGGCGCAGCGCGACAA-3' 를 사용하였고, reverse primer 는 5' -CTATTCCTTTTCCACCA-3' 를 사용하였다. PCR 는 95℃에서 5 분간 pre-denaturation 한 다음에, 95℃에서 30 초, 57℃에서 30 초, 72℃에서 30 초간 반응시키는 것을 30cycle 수행하였고 72℃에서 post elongation 을 7 분간 수행하였다. PCR 산물은 1.0% agarose gel(TAE buffer 50ml, agarose 0.5g, EtBr 1 μ l)에서 전기영동 하여 밴드를 확인하였다.

밴드를 GeneAll® Exprep™ Gel SV, 200p kit(Geneall, M102074H, Korea)로 정화하여 pGEM®-T Easy Vector(Promega, Madison, WI, USA)에 도입하였다. PCR fragment 과 T-Vector 는 4℃에서 12 시간 배양한 후, 벡터에 의해 Escherichia coli DH5alpha competent cell 에 형질도입하고 100 mg/L Ampicillin 을 함유한 Luria broth(LB) plate 에 선발하였다. Ampicillin 내성균주는 100 mg/L Ampicillin 첨가된 LB 액체배지에서 37℃, 12 시간 진탕배양 후 glycerol 50%용액과 1:1 로 혼합하여 -70℃에 보관하였다. 균주 plasmid DNA 를 GeneAll® Exprep™ Plasmid mini, 200p kit(Geneall, M101108H, Korea)로 추출하여 염기서열을 확인하였다.

3-2. Binary vector 제조 및 *Agrobacterium tumefaciens* transformation

형질전환된 T-vector 는 제한효소 digestion(소화)부위 포함된 forward primer(5' -G GaagcttATGGCGCAGCGGACAA-3' , Hind III 제한효소)와 reverse primer(5' -CCc gatcgCTATTCCTTTTCCACCA-3' , Pvu I 제한효소)를 이용하여 PCR 을 수행하였다. PCR 산물과 pKHG1125 vector 는 Hind III(Takara, 1060A, Japan) 및 Pvu I (Takara, 1242A, Japan)로 소화하였다. GeneAll® Expin™ Gel SV, 200p Kit(Geneall, M102074H, Korea)로 정화한 fragment 는 T4 DNA Ligase(Takara, K6501DA, Japan)로 이용하여 연결하였다. *A.tumefaciens* EHA105 로 연결된 binary vector pKHG1125-OSISAP DNA 를 도입하기 위하여 freeze-thaw 방법을 사용하였다 (An G. 1987). 형질전환된 균주는 50 mg/L Kanamycin 과 25 mg/L Rifampicin 를 첨가한 YEP 액체배지에서 28℃, 48 시간 진탕배양 후 glycerol 50%용액과 1:1 로 혼합하여 -70℃에 보관하였다. 균주 plasmid DNA 를 GeneAll® Exprep™ Plasmid mini, 200p kit(Geneall, M101108H, Korea)로 추출하여 염기서열을 확인하였다.

4. 다우들께 감염 및 형질전환체 선발

4-1. *A. tumefaciens* 균배양

-70℃에 보관한 pKHG1125-OSISAP 형질전환된 *A.tumefaciens* 은 2ml 항생물질(Kanamycin 50 mg/L, Rifampicin 25 mg/L)이 포함된 YEP

액체배지에서 적합하여 28℃, 16 시간 진탕배양한 후, 50ml 항생물질을 있는 YEP 액체배지에 같은 조건에서 다시 배양하였다. 배양액을 3,000rpm 으로 15 분간 원심분리하였고 상청액이 버려, MS 액체로 현탁배양하여 균농도가 600nm 에서 다른 흡광도(OD₆₀₀ 0.5/0.6/0.7) 되도록 희석하였다.

4-2. *A. tumefaciens* 감염 및 공동배양

10~15 일간 발아한 종자는 하배축의 길이 1cm 로 준비하였다. 하배축 절편체를 *A. tumefaciens* 감염액에 넣어 암환경에서 25℃, 80rpm, 30 분간 감염하였다. 그 후 감염한 하배축 절편체는 300 mg/L cefotaxime 을 첨가된 SDW 에서 5분간 washing 하고 멸균한 filter paper 에서 3분간 건조한후 MS 배지로 옮겼다. 그 후 호일로 petri dish 의 빛을 차단하여 25℃, 암조건에서 3 일간 공동배양하였다.

4-3. 재분화 유도 및 선발

공동배양된 하배축은 Selection I medium(Callus 유도 및 선발배지, Table 1)에서 2 주일간 캘러스를 유도한 후, 유도된 캘러스를 Selection II medium(Shoot 유도 및 선발배지, Table 1)로 옮겨 4-6 주일간 유도하였다. 배양한 시료를 2 주일마다 새 배지로 계대배양하였다. 3 차 선발, 즉 6 주일간 유도된 재생조직의 생존율을 기록하였다. 선발한 shoot 는 Selection III medium(Root 유도 및 선발배지, Table 1)로 옮겨 식물체를 배양하였다.

5. 형질전환 다유들개의 유전자 도입 확인

5-1. PAT 단백질의 발현 확인

Trait LL Test Strips 는 형질전환된 식물조직내의 PAT 단백질을 확인할 수 있는 kit 이다. Strip membrane 아래에는 PAT 단백질 특이적인 항체와 붉은색의 색소를 연결된 항체-색소 복합체가 있다. 항체-색소 복합체는 PAT 단백질과 결합하여 붉은색의 밴드를 형성된다. Strip membrane 에서 두 개 capture zone 는 control line 하고 PAT 단백질과 결합하면 붉은색이 되는 PAT test line 가 있다. 그래서 이 strip test BAR 유전자 없는 야생형 다유들개의 식물조직 추출물에서 넣으면 하나의 붉은색의 밴드가 형성되는데, BAR 유전자가 도입된 형질전환-식물조직 추출물에 넣으면 붉은색의 밴드가 두 개 형성된다. 약 0.2 g 의 야생형과 형질전환 다유들개의 잎을 200 μ l SDW 와 1.5ml 튜브에서 PELLET PESTLE (Sigma, USA)을 이용하여 파쇄하였다. PAT test strip 을 각각 샘플의 잎 조직 추출물에서 넣어 5 분간 반응한 후 PAT 단백질의 발현을 확인하였다.

5-2. Genomic DNA 추출 및 PCR 분석

야생형 및 형질전환 다유들개 잎은 CTAB 법(Murray and Thomson, 1980)을 이용하여 genomic DNA 를 추출하였다. OSISAP 와 BAR 유전자를 도입되는지 확인하기 위해 Figure 6 과 같은 방법으로 genomic-PCR 분석을 수행하였다. 665bp 크기의 OSISAP 유전자와 443bp 크기의 BAR 유전자를 증폭하기 위한

OSISAP1(Forward primer, 5' -ATGGCGCAGCGCGACAA-3' ; reverse primer, 5' -CTATTCCTTTTCCACCA-3')와 BAR 유전자(Forward primer, 5' -AAGTCCAGCTGCCAGAAACCCAC-3' ; reverse primer, 5' -GTCTGCACCATCGTCAACCACTA-3')의 primer 를 사용하였다. PCR 산물은 EtBr 을 첨가한 1.0% agarose gel 에서 전기영동 하여 밴드를 확인하였다.

Table1 Composition of the medium used for transformation of perilla.

Medium name	Composition
MS medium	MS salt, 100 mg/L myo-inositol, 3 g/L gelrite
Infection medium	MS salt, 100 mg/L myo-inositol, 3 g/L gelrite, 100 μ m acerosyngone
Co-cultivation medium	MS salt, 100 mg/L myo-inositol, 3 g/L gelrite
Selection I medium (Callus induction and selection medium)	MS salt, 100 mg/L myo-inositol, 3 g/L gelrite, 0.1 mg/L NAA, 0.5 mg/L BA, 500 mg/L cefotaxime, 0.5 mg/L PPT
Selection II medium (Shoot induction and selection medium)	MS salt, 100 mg/L myo-inositol, 3 g/L gelrite, 0.5 mg/L BA, 500 mg/L cefotaxime, 0.5 mg/L PPT
Selection III medium (Root induction and selection medium)	MS salt, 100 mg/L myo-inositol, 3 g/L gelrite, 500 mg/L cefotaxime, 0.5 mg/L PPT

III. 결과 및 고찰

1. 조직배양

1-1. 자엽, 하배측과 잎의 캘러스유도

재분화율이 높은 다유들깨(중유용)의 식물조직배양체계를 확립하기 위해서 종자에서 발아된 유식물체를 잎, 자엽, 하배측으로 구분하여 캘러스 유도 및 재분화 실험을 수행하였다. 효율적인 캘러스 유도와 식물재분화 환경을 조성하기 위한 중요한 요소 중 하나는 옥신과 시토키닌의 종류와 적정 농도의 선택이다. 본 연구에서는 이전에 발표된 들깨품종들의 조직배양 연구를 바탕으로 옥신으로 NAA 와 IAA, 시토키닌으로 BA 를 선택하였다 (Lee JY et al. 2003, Lee and Kim 2007, Yun et al. 2023, Zhang 2007).

재분화 잘 된 캘러스를 위해서 남천들깨와 다유들깨의 자엽, 하배측과 잎은 3 가지 절편체는 달리 농도(mg/L)의 NAA(0.1, 0.5, 1)와 BA(0.1, 0.5)를 조합하여 장일 조건에서 2 주간 유도하였다. 실험 결과, 7 일 지났을 때 절단면에서 캘러스의 형성이 육안으로 관찰되기 시작하였다. 치상 후 14 일에 남천 하배측으로 유도된 캘러스에서 싹초가 보였고 다유는 마찬가지로 하배측과 잎의 캘러스에서 싹초가 관찰되었다 (Figure 2). 싹초가 재분화되는 캘러스를 잘 조사하기 위해, 같은 조건에서 3 주간 계속 배양한 후 남천과 다유 자엽으로 유도된 캘러스는 형성 상태가 비슷하고 (Figure 3), 잎(Figure 5)도 마찬가지로 큰 차이를 볼 수가 없었지만 하배측은 남천들깨보다 다유들깨에서 싹초가

형성된 캘러스를 잘 볼 수 있다 (Figure 4). 총 5 주간 배양하여 신초가 형성된 캘러스비율을 조사한 결과, 고 농도(1 mg/L)의 Auxin(NAA, IAA)로 유도된 캘러스에서는 신초가 형성되지 않았다. 다유는 남천보다 신초가 형성된 캘러스의 비율이 더 높았고, 다유의 하배축은 다른 절편체보다 신초가 형성된 캘러스의 비율이 0.1 mg/L NAA 와 0.5 mg/L BA 를 첨가된 배지에서 더 높았다 (Table 1).

또한 다유 하배축의 재분화 능력을 상세하게 보기 위해서, 하배축 정단부, 상부, 중간부, 기부의 4 부분으로 절단하여 하배축의 위치 별로 재분화율을 조사하였다. 실험 결과, 정단부에서 재분화율이 가장 높았으며(97.6%) 기부(92.3%), 중간부(79.8%), 상부(70.8%)의 순서로 조금씩 낮아지는 것으로 조사되었다 (Figure 9). Tariq Hossain 등(2010)은 본 실험결과와 마찬가지로 하배축의 정단부에서 64.3%로 가장 재분화율이 높게 나왔다고 보고하였다. 그러나 본 실험의 결과와는 달리 기부에서 가장 낮은 1.33%의 재분화율을 보였고 상부에서 15.6%, 중간부에서 4%의 재분화율을 보였다고 보고하였다.

1-2. 암/장일조건에 캘러스유도

일반적으로 식물조직배양의 캘러스 유도 단계에서 빛은 식물의 재분화에 부정적인 영향을 주지만 식물에 따라서 재분화를 촉진하는 경우도 있다 (Long et al. 2022). 그러므로 암조건과 장일조건에서 유도된 각각의 캘러스 중 어느 쪽이 재분화율이 높은 지 알기 위해 Table 2 에 제시된 NAA/BA 조합의 배지에서 2 주간 재분화율 실험을 진행하였다. 실험결과, 0.1 mg/L NAA 와 0.5

mg/L BA 조합에서 배양된 하배측에서 육안으로 가장 건강한 캘러스가 형성되었고, 0.5 mg/L NAA 에서는 0.1 mg/L NAA 에서보다 조금 더 어두운 색조의 캘러스가 형성되었다 (Figure 6). 또한 암조건과 장일조건 모두 건강한 캘러스가 형성되었지만 장일조건에서 조금 더 밝은 색조의 캘러스가 형성되었다 (Figure 6). 암조건과 장일 조건에서 2 주간 유도된 캘러스를 장일조건에서 4 주간 배양한 후 재분화가 유도된 캘러스비율을 조사한 결과는 전체적으로 모든 농도조합에서 암조건보다 장일조건에서 유도된 캘러스에서 재분화 빈도가 높은 것으로 조사되었다 (Table 2). 암조건과 장일조건 모두 0.1 mg/L NAA+0.5 mg/L BA 의 배지에서 재분화율이 가장 높았으며 장일조건에서 86.7%, 암조건에서 84.4%로 장일조건에서 조금 높게 조사되었다 (Table 2). 일반적으로 빛에 의해 체세포배아(somatic embryos)의 형성이 방해받아 재분화율이 낮아지는 경우가 많으므로 많은 식물에서 암조건에서 캘러스를 유도한다 (Batia and Bera 2015, Long et al. 2022, Zenser et al. 2001). 그러나 오히려 빛에 의해 체세포배아의 형성이 촉진되어 재분화율이 높아지는 식물들도 보고되었다 (Siddique and Islam 2018, Yu et al. 2019). 본 연구에서 다유들개의 경우, 캘러스 유도 단계에서 암조건보다 빛이 있는 장일조건에서 캘러스를 유도했을 때 재분화가 촉진되는 결과를 얻었다.

또한 NAA 없이 0.1 mg/L 또는 0.5 mg/L BA 만 첨가된 배지에서는 건강한 캘러스가 유도되지 않았고, 재분화 배지로 옮겼을 때 싹(shoot)가 유도되지 않았다 (Table 2). 따라서 다유들개의 하배측에서 재분화 가능한 캘러스가 유도되기 위해서는 적정농도의 NAA 와 BA 가 요구된다.

1-3. 건강한 신초의 재분화 조건 확립

고농도의 옥신은 신초가 자라는 대신 캘러스를 촉진시키고 (Skoog and Miller 1965), 소량의 옥신을 첨가하면 비정상적인 신초가 자라는 것을 감소시키는 효과가 있다 (Lee et al. 2003). 본 실험에서도 재분화된 신초 중에는 정상적인 식물체로 자라지 못하는 비정상 신초들이 많이 포함되어 있었으므로 사용된 모든 시료 중 가장 재분화율이 높았던 다유들개의 하배축을 가지고 몇 가지 농도의 식물생장호르몬 조합에서 정상식물체와 비정상식물체를 구분하여 재분화율을 조사하였다. 실험 결과, 정상적인 식물체의 재분화를 위해서는 NAA 농도 조절이 매우 중요하며 NAA 없이 0.5 BA 만 첨가했을 때 정상 식물체의 출현율이 가장 높았고(70.5%) NAA 의 농도가 높아질수록 비정상 식물체의 출현율이 높아지는 경향을 보였다 (Table 3).

1-4. 뿌리유도

들개의 조직배양에서 뿌리의 유도는 식물생장호르몬의 첨가 없이 MS 기본배지만으로 충분한 것으로 보고되었다 (Kim et al. 2004, Hou et al. 2005, Zhang et al. 2005). 따라서 본 실험에서도 식물생장호르몬의 추가 없이 1/2 MS 기본배지만으로 뿌리를 유도하였으며, 1/2 MS 배지로 옮긴 신초는 10-15 일 후에 뿌리가 관찰되었고 30 일 후에는 대부분의 신초가 완전한 식물체로 성장하였다 (Figure 10).

2. 형질전환 다유들개의 선발 및 유전자 도입 확인

2-1. 하배축 통해 감염된 형질전환 다유들개의 선발

효율적인 형질전환 체계를 확립하기 위해 다유들개 하배축의 고효율 재분화 방법으로 형질전환 다유들개를 선발하였다. 치상한 시료를 감염한 후 *Agrobacterium* 의 over-growing 을 방지하기 위해 Selection medium 에 최대적인 cefotaxime 농도를 확인하였다. 감염된 하배축은 250 mg/L 나 500 mg/L cefotaxime 를 첨가된 다른 농도(0, 0.5, 1, 2)의 PPT 가 포함된 Callus 유도배지에서 4 주일간 배양하여, callus 생존율 및 신초 형성된 캘러스 비율을 조사하였다. 그 결과는 250 mg/L 와 500 mg/L cefotaxime 이 첨가된 배지에서 유도한 캘러스의 생존율 및 재분화 비율이 차이가 없었지만 *Agrobacterium* 이 지속적인 증식으로 선발배지의 cefotaxime 농도를 500 mg/L 를 선택하였다.

본 연구는 PAT strip test 및 계능수준에서 유전자도입 유무를 확인함으로써 *Agrobacterium* OD₆₀₀ 에서의 흡광도 및 PPT 농도가 형질전환 효율에 미치는 영향을 평가하였다. OD₆₀₀ 값이 높거나 낮으면 형질전환 효율이 떨어진다고 (Liu et al. 2020). 들개 하배축 절편체에게 *Agrobacterium* 농도가 OD₆₀₀=0.6 의 감염액으로 감염하고 3 회 선발하여, 즉 6 주간 배양한 callus 의 생존율이 OD₆₀₀=0.5 또는 0.7 보다는 높았다 (Figure 12). *Agrobacterium* 밀도가 OD₆₀₀=0.6 일 때 0.5 mg/L PPT 를 포함한 Selection medium 에서 선발한 callus 의 생존율이 35%로 가장 높고, OD₆₀₀=0.5 일 때 0.5 mg/L PPT 에서 25.6%, OD₆₀₀=0.6 일 때 1 mg/L PPT 에서 21.7% 순서로 떨어지고 다른 조합에 배양한 callus 생존율은 훨씬 낮았다.

따라서 본 연구에서는 치상한 하배축을 *Agrobacterium* 농도 $OD_{600}=0.5\sim0.6$ 에서 감염하여 500 mg/L cefotaxime 과 0.5 mg/L PPT 가 첨가된 Selection medium 에서 선발하였다. 3 일간 공동배양한 절편체는 Selection I medium 에서 2 주간 배양한 후, 유도된 callus 를 Selection II medium 로 옮겨 4~6 주간 배양하고 shoot 를 생산하였다. 유도된 shoot 는 Selection II medium 에서 15~20 일간에 뿌리가 유도되었다 (Figure 12c).

2-2. 형질전환 식물체의 유전자 도입 확인

PPT-선발배지에서 선발한 28 개 식물체를 중 PAT-항체 strip test 를 한 결과 10 개에서 PAT 양성반응을 보였다 (Figure 13a). PAT test strip 을 이용하여 확인된 형질전환 식물에서 5 개를 선택하여 OSISAP1 과 BAR 유전자가 도입되었는지를 genomic-PCR 을 이용하여 확인한 결과, 야생형 식물에서는 어떠한 증폭산물도 확인되지 않았지만, 선발한 5 개체 형질전환 라인에서는 OSISAP1 과 BAR 유전자 특이적 증폭산물이 확인되었다 (Figure 13b).

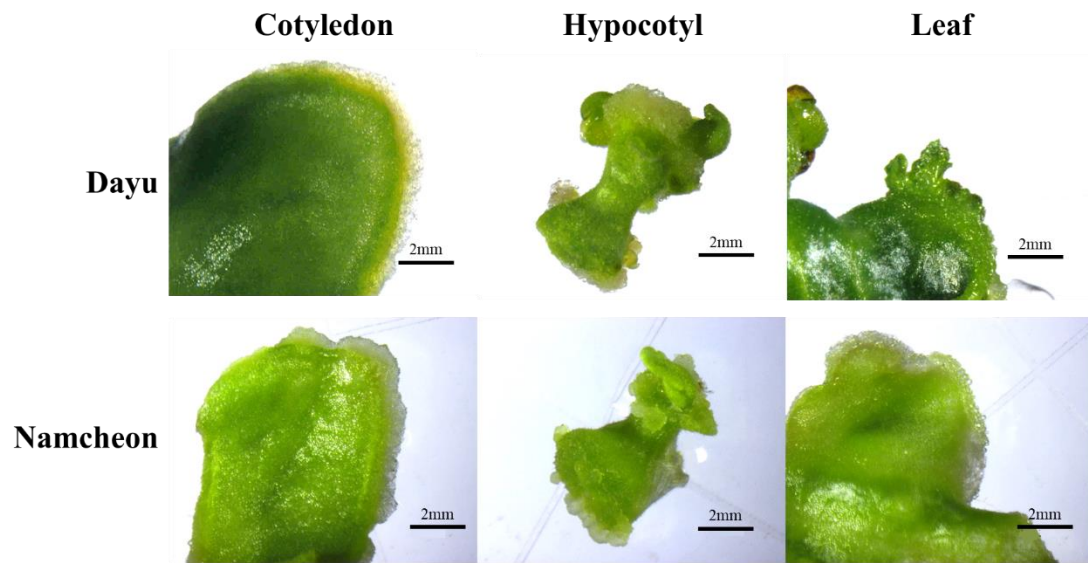


Figure 2 The callus of cotyledon, hypocotyl and leaf of *P. frutescens* L. var 'Dayu' and var 'Namcheon' cultured on medium containing 0.1 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA under long-day condition after 2 weeks.

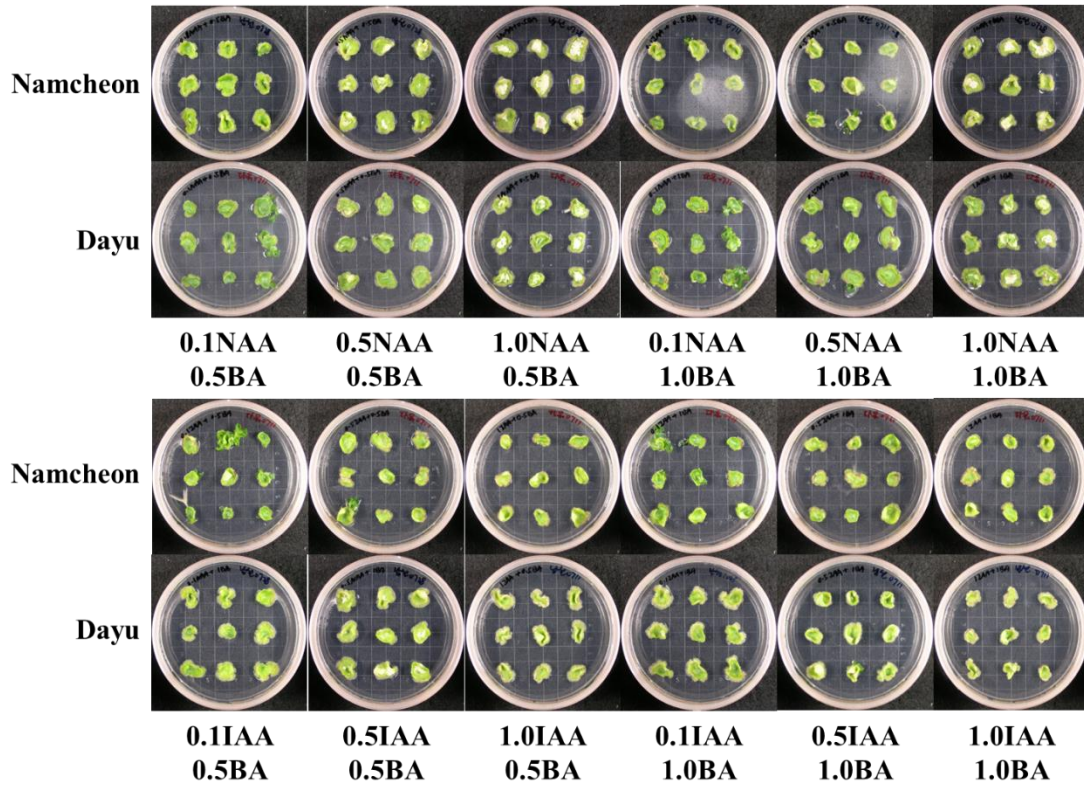


Figure 3 The callus cultured on the MS medium containing different concentrations (mg/L) of combined plant growth regulators from cotyledon of perilla c.v. ‘Namcheon’ and c.v. ‘Dayu’ after 5 weeks.

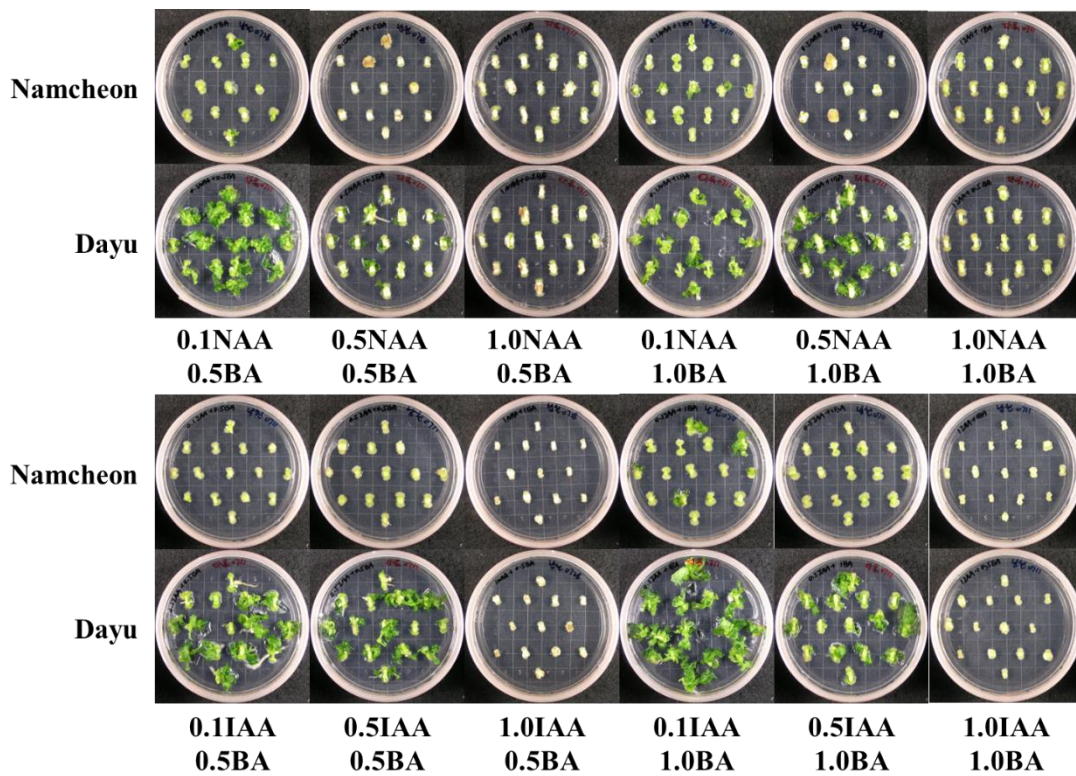


Figure 4 The callus cultured on the MS medium containing different concentrations (mg/L) of combined plant growth regulators from hypocotyl of perilla c.v. ‘Namcheon’ and c.v. ‘Dayu’ after 5 weeks.

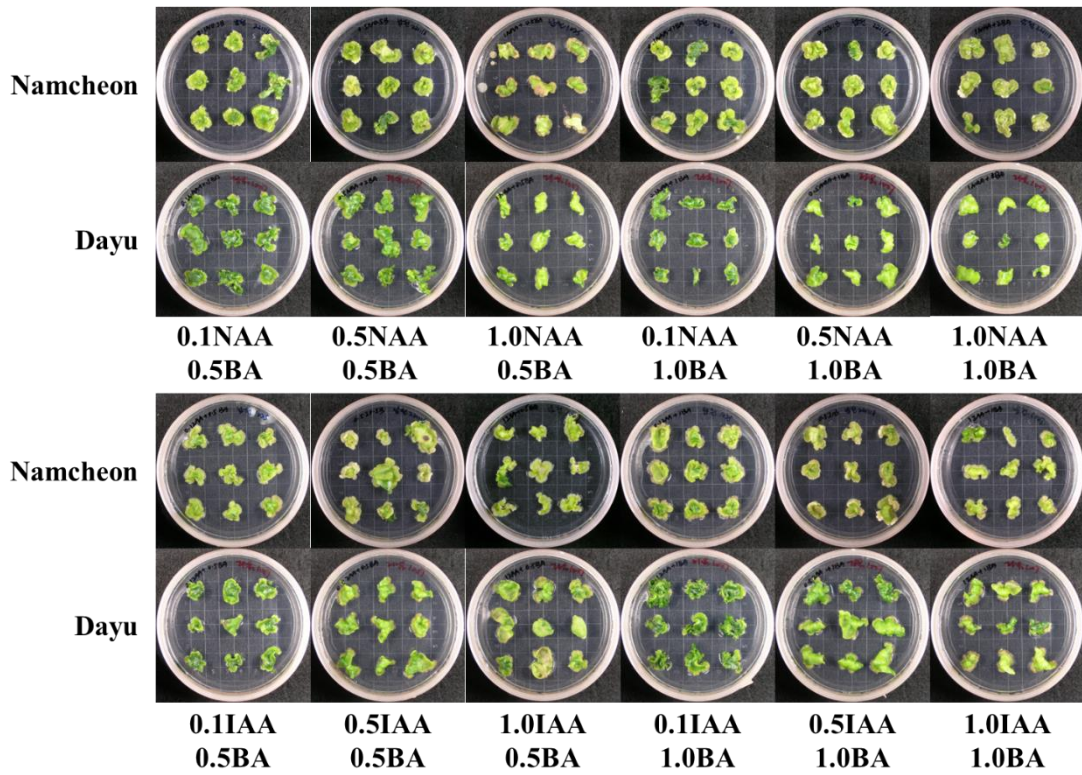


Figure 5 The callus cultured on the MS medium containing different concentrations (mg/L) of combined plant growth regulators from leaf of perilla c.v. ‘Namcheon’ and c.v. ‘Dayu’ after 5 weeks.

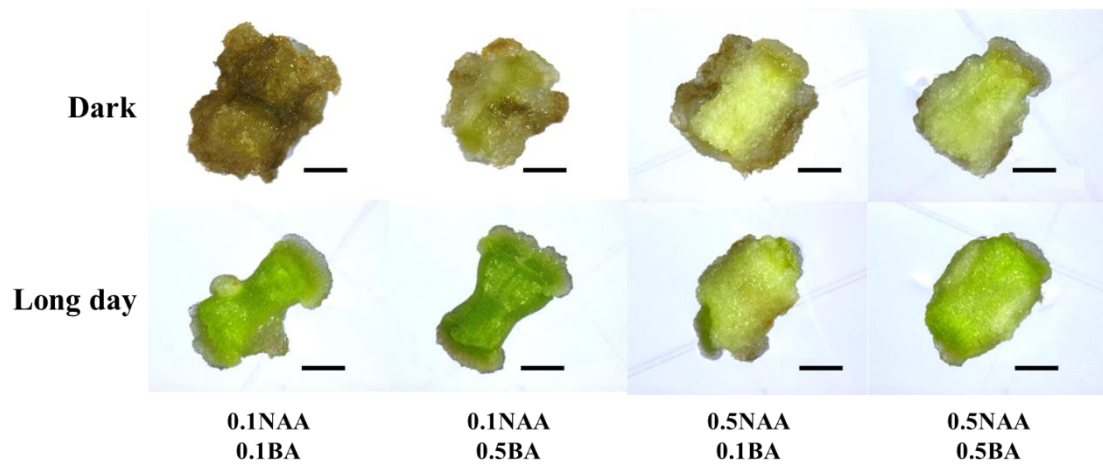


Figure 6 The calli from the hypocotyl of *P. frutescens* var. Dayu cultured on MS medium with various concentration combinations (mg/L) of NAA and BA under dark or long-day conditions. Scale bars are 2 mm.

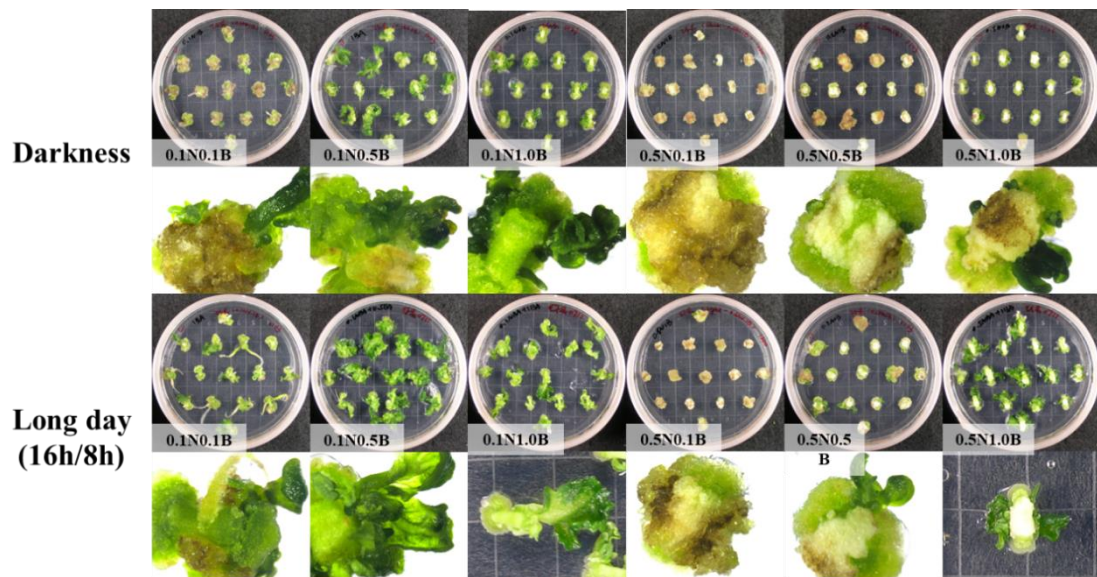


Figure 7 The callus of *Perilla frutescens*, cultivar 'Dayu' cultured on MS medium with different concentration combinations of NAA and BA.

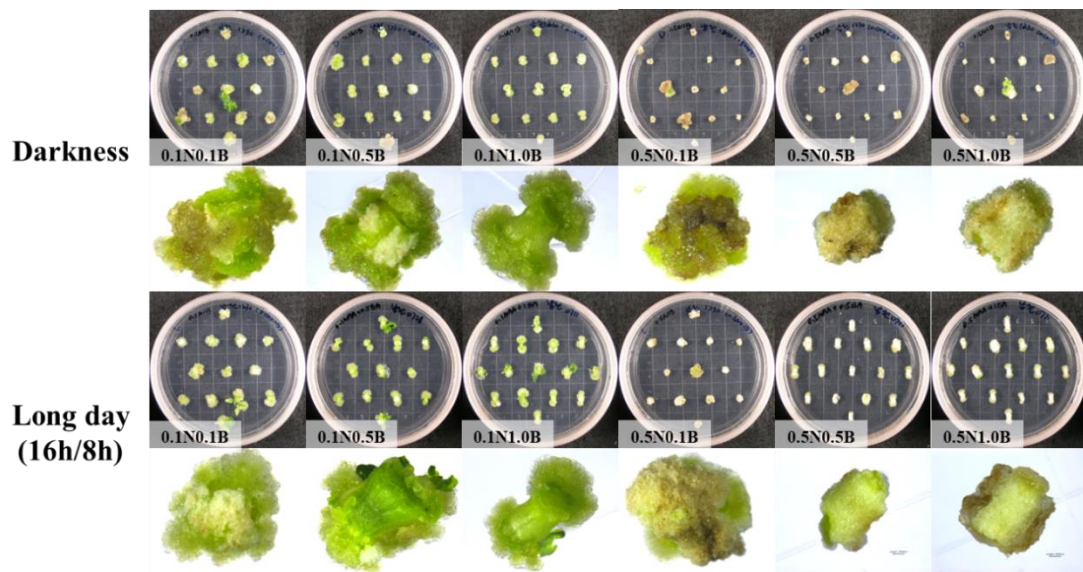


Figure 8 The callus of *Perilla frutescens*. cultivar 'Namcheon' cultured on MS medium with different concentration combinations of NAA and BA.

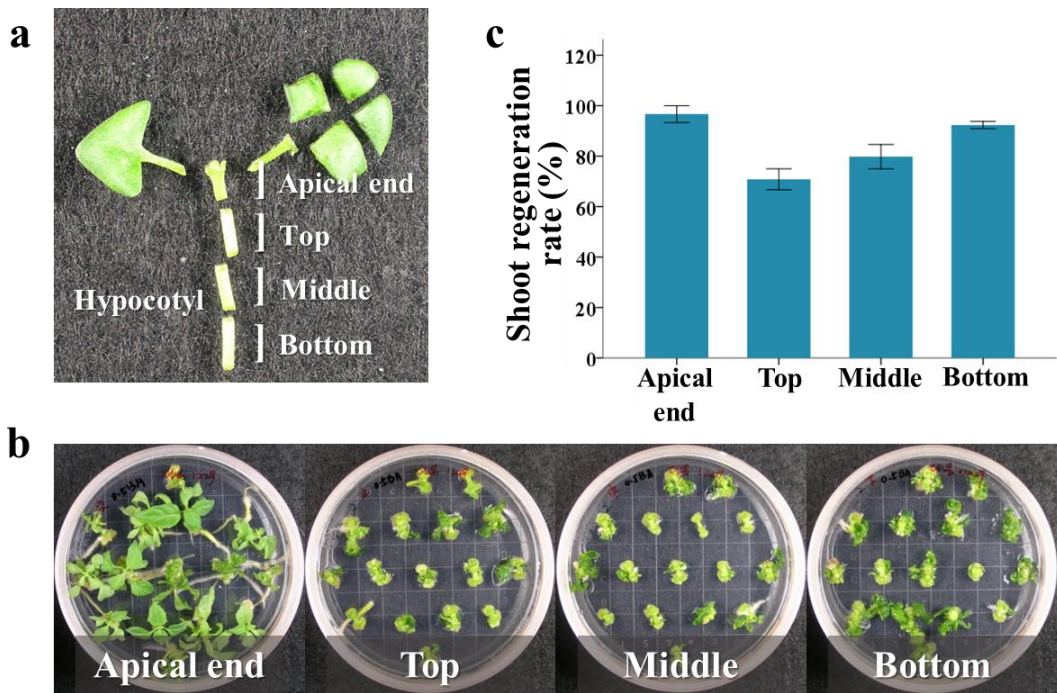


Figure 9 Plant regeneration efficiency of explants at different positions along hypocotyl of Dayu variety. (a) Four explants of the hypocotyl, including the apical end, top, middle, and bottom in the Dayu seedling (b) Shoot regenerations from apical end, top, middle, and bottom explants (c) Shoot regeneration rate of each explant. The vertical bars indicate the standard deviations.

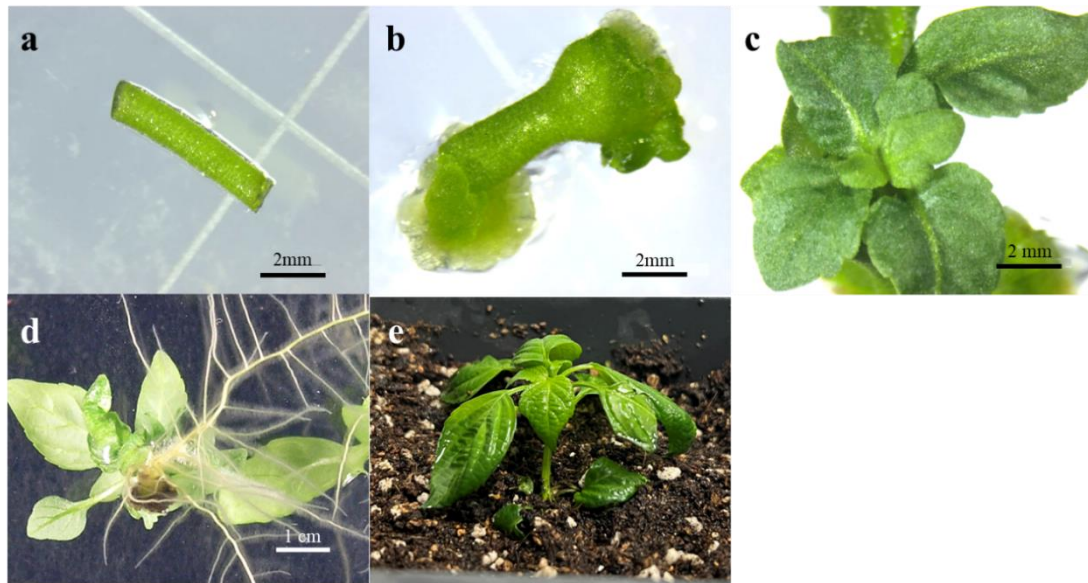


Figure 10 The comprehensive experimental process from hypocotyl explant to shoot and root regeneration *via* callus in Dayu variety. (a) Explant on callus induction medium. (b) Callus induction, cultured for 15 days on 0.1 NAA and 0.5BA (mg/L). (c) Shoot formation, cultured for 20 days after transferring the callus from (b) into 0.5BA (mg/L) without NAA. (d) Rooting for 15 days, the shoot from (c) was transferred to 1/2MS medium without NAA and BA to induce roots. (e) Plant acclimation.

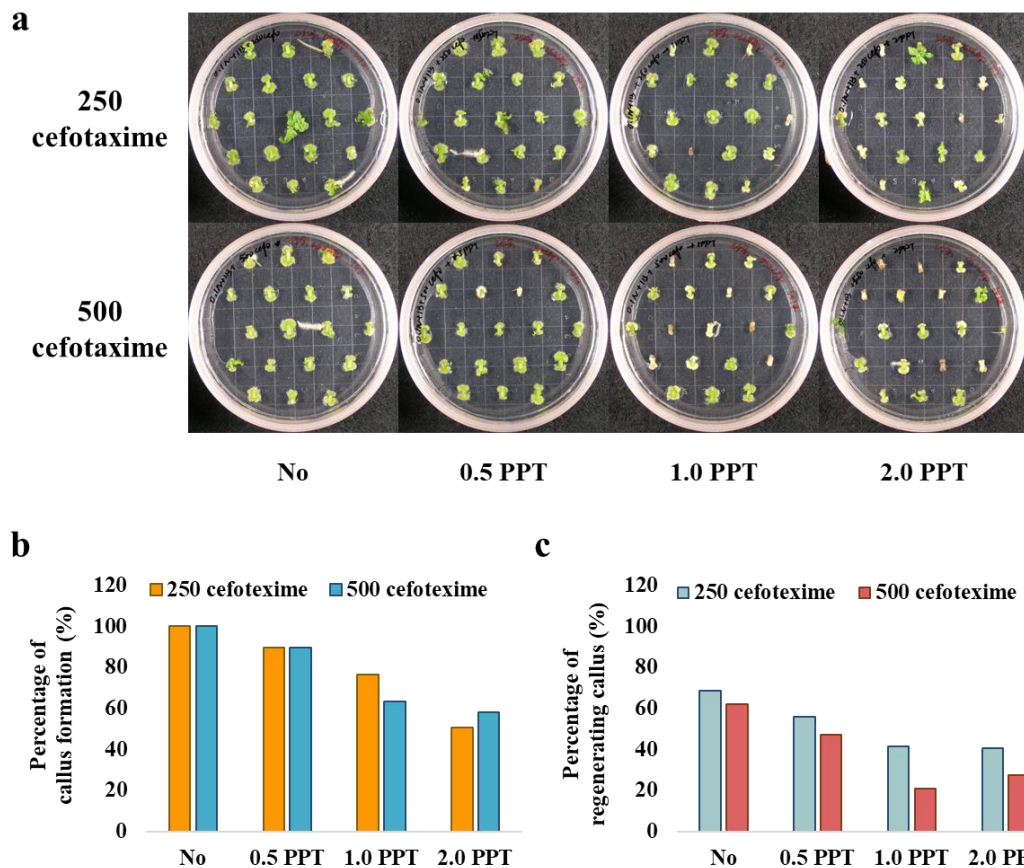


Figure 11 Efficiency of plant regeneration from callus tissue of perilla under different selection medium. (a) Callus from perilla hypocotyl after 4 weeks of culture on different combinations of selected media. Percentage of callus formation (b) and regenerating callus (c) after 4 weeks of culture on different combinations of selected media. Selected media = MS + 0.1 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA + 250 or 500 mg/L cefotaxime + 0~2 mg/L PPT.

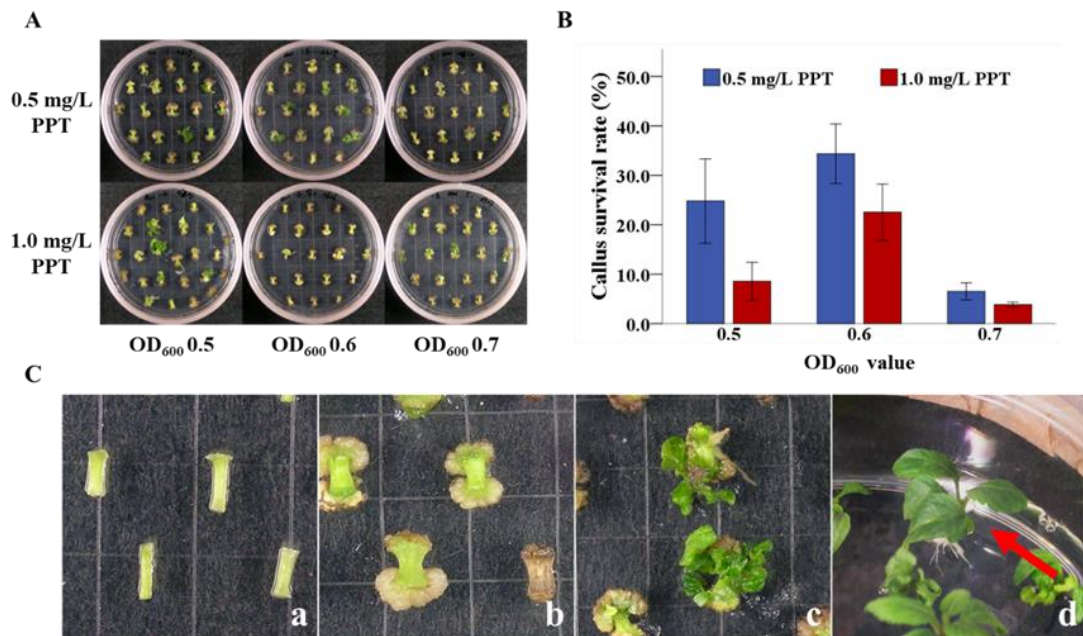


Figure 12 Plant regeneration from infected hypocotyl of perilla under selection medium. **A** Callus clumps cultured on selection medium after 6 weeks with 0.5 or 1 mg/L PPT from hypocotyl infected by different concentration of Agrobacterium liquid. **B** Callus survival rate after 6 weeks of culture on selection medium with 0.5 or 1 mg/L PPT from hypocotyl infected by different concentration of Agrobacterium liquid. **C** Co-cultured hypocotyl transferred on the selection I medium (a) and cultured on the selection II medium for 2 weeks (b) after transferring the 2 weeks-old callus from selection I medium. (c) Shoot formation after cultured on selection II medium for 4 weeks. (d) Root formation after cultured on selection III medium for 15 days. The vertical bars indicate the standard deviations.

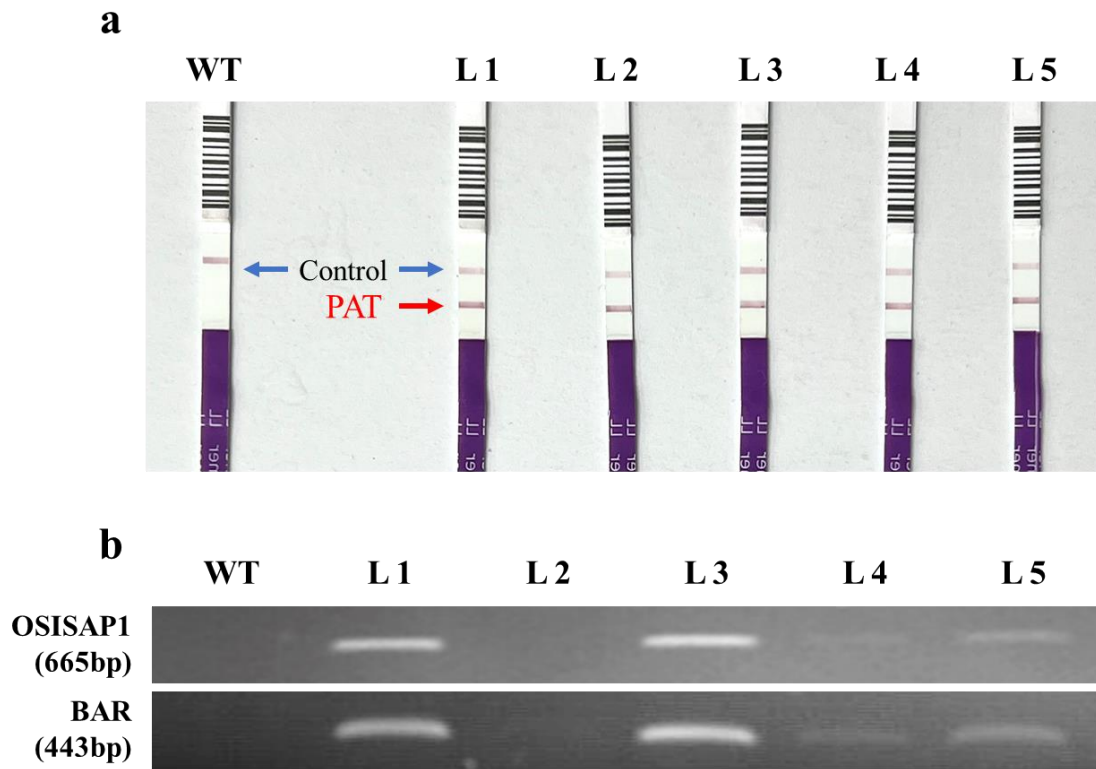


Figure 13 PAT protein detection and PCR analysis of OSISAP1 gene and BAR gene in transgenic *Perilla frutescens* cultivar Dayu. (a) PAT protein detection of wild-type and 5 selected PPT resistant plants. (b) Genomic-PCR analysis of putative transgenic perilla. WT, wild type plant; L1–L5, transgenic plants.

Table 1 Shoot regeneration rates from cotyledon, hypocotyl, and leaf explants of ‘Namcheon’ and ‘Dayu’ under various combinations of BA, BA/NAA or BA/IAA.

PGR (mg/L)			Shoot forming callus ratio (%)					
BA	NAA	IAA	Cotyledon		Hypocotyl		Leaf	
			Namcheon	Dayu	Namcheon	Dayu	Namcheon	Dayu
0.5	0.1	no	33.3±3.3	11.1±0.4	0	88.3±2.7	13.9±1.1	61.1±7.2
	0.5	no	13.9±1.3	0	0	50.0±7.1	22.2±5.4	22.2±4.8
	no	0.1	0	27.8±7.8	13.3±3.3	81.7±10.9	6.3±2.5	27.8±1.7
	no	0.5	0	5.6±1.1	13.3±0.4	55.2±6.5	12.5±3.5	11.1±2.2
1.0	0.1	no	0	16.7±7.8	68.0±8.5	84.8±0.4	5.6±3.5	16.7±1.3
	0.5	no	0	0	10.0±3.6	76.7±3.3	0	0
	no	0.1	0	44.4±9.3	33.3±3.3	87.8±5.9	0	72.1±4.9
	no	0.5	19.1±4.1	5.6±0.8	10.0±2.5	35.0±4.2	5.6±0.8	50.0±4.1

PGR: plant growth regulator, NT: not tried, no: not added

Table 2 Shoot regeneration rate from hypocotyl of ‘Dayu’ under dark and long-day conditions.

Plant growth hormone (mg/L)		Shoot regeneration rate (%)	
		Dark	Long-day
0.0 NAA	0.1 BA	0	0
	0.5 BA	0	0
	1.0 BA	0	0
0.1 NAA	0.1 BA	26.7 ± 9.4	56.7 ± 14.1
	0.5 BA	84.4 ± 9.4	86.7 ± 8.5
	1.0 BA	0	83.7 ± 9.3
0.5 NAA	0.1 BA	0	0
	0.5 BA	6.7 ± 1.4	46.7 ± 9.6
	1.0 BA	0	76.7 ± 9.8

Table 3 Frequency of normal plant regeneration from ‘Dayu’ callus according to changes in NAA concentrations.

Plant growth hormone (mg/L)		Plant regeneration (%)	
		Normal	Abnormal
0.5 BA	no	70.5 ± 3.2	19.3 ± 8.0
	0.01 NAA	42.1 ± 8.1	42.3 ± 4.5
	0.1 NAA	25.0 ± 2.4	60.0 ± 9.4
1.0 BA	no	51.1 ± 1.5	37.8 ± 4.3
	0.01 NAA	31.8 ± 6.4	48.9 ± 1.6
	0.1 NAA	33.3 ± 4.7	48.3 ± 7.1

no: not added

Table 4 The callus survival rate of perilla c.v. ‘Dayu’ hypocotyl after selected 3 times.

OD600 value	Conc. PPT (mg/L)	No. of callus Infected (A)	Resistant callus	
			after III selection (B)	Callus survival rate (%)
0.5	0.5	745	191	25.6
	1.0	778	66	8.5
0.6	0.5	790	277	35.0
	1.0	925	201	21.7
0.7	0.5	635	45	7.1
	1.0	634	25	3.9

Conc: concentrate, Callus survival rate (%) = B/A × 100

IV. 종합 고찰

중유용 ‘다유들깨’는 높은 리놀렌산(ALA)을 가지고 있고 최근에 많이 연구하고 있다(Ha et al. 2012, Yun et al. 2023). 본 연구에서 형질전환 다유들깨 식물체를 효율적으로 얻기 위해서 고효율 식물재분화 체계 및 형질전환 체계를 연구하였다. 들깨 자엽, 하배축과 잎으로 유도된 캘러스를 NAA와 BA, IAA와 BA 조합한 배지에서, 5주간 배양한 신초유도된 캘러스비율을 조사하였고, 그 결과는 남천과 다유 자엽, 잎의 유도된 캘러스 상태가 비슷하지만 하배축은 남천보다 다유에서 신초가 형성된 캘러스비율을 더 높다. Auxin 농도는 1 mg/L로 유도된 캘러스에서는 신초가 형성되지 않았지만 다유의 하배축은 0.1 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA를 있는 배지에서 신초가 형성된 캘러스비율이 88.3%로 가장 높게 조사하였다. 그리고 다유 하배축에서 4가지 부위의 재분화되는 캘러스비율을 조사하였으며 정단부 97.6%로 가장 높았고 기부(92.3%), 중간부(79.8%), 상부(70.8%)의 순서로 조금씩 낮아지는 결과를 나타냈다. 다유 하배축 4가지 부위는 모두 높은 재분화율을 보여서 전체 하배축으로 이용하였다. 암/장일조건에서 캘러스가 다 형성되었지만 암조건보다 장일조건에서 유도된 캘러스가 재분화 잘 되고 0.1mg/L NAA와 0.5 mg/L BA 조건에서 신초가 형성된 캘러스 비율이 86.7%로 가장 높게 조사하였다. 하배축은 0.1NAA와 0.5BA 첨가된 배지에서 신초가 유도는 되지만 NAA가 없는 0.5 mg/L BA 단독 처리가 정상적인 신초 형성율이 70.5%로 가장 높게 조사되었다. 유도된 정상적인 신초가 1/2 MS에서 30일간 완전한 다유들깨 식물체가 받고 화분으로 순화되었다.

치상된 하배축 절편체가 OD600=0.5~0.6 의 Agrobacterium 균액에서 감염되면 500 mg/L cefotaxime, 0.5 mg/L PPT 가 함유된 Selection medium 에서 선발한 후보 형질전환체를 가장 많이 얻을 수 있었다. 28 개의 후보 형질전환체 중 4 개가 PAT strip test 와 OSISAP1, BAR 유전자의 PCR 을 통해 확인되었다.

본 연구에서 확립된 다유들께 하배축을 이용한 재분화 체계는 지금까지 보고된 다른 들께 품종들의 재분화 체계에 비해 재분화 효율이 높았으며, 이 고효율 재분화 체계로 들개의 고효율의 형질전환 제조 체계를 확립했다. 앞으로 들께에서 조직배양과 형질전환에 의존하는 유전자편집 등의 분자유종 분야에 유용하게 이용하면서 높은 경제적 가치를 가져오는 들께 품종을 효율적으로 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

V. 인용문헌

An G (1987) Binary Ti Vectors for plant transformation and promoter analysis *Methods in Enzymology* 153:292–305

Ahmed HM (2018) Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological investigations of *Perilla frutescens* (L.) Britt. *Molecules* 24:102

Asif M (2012) Phytochemical study of polyphenols in *Perilla Frutescens* as an antioxidant. *Avicenna journal of phytomedicine* 2:169 - 178

Bhatia S, Bera T (2015) “Somatic embryogenesis and organogenesis,” in modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences. eds. Bhatia S, Sharma K, Dahiya R, Bera T (Boston: Academic Press) 209–230

Chai BF, Liang AH, Wang W, and Hu W (2003) *Agrobacterium*–mediated transformation of kentucky bluegrass *Acta Botanica sinica* 45:966–973

Ha TJ, Lee JH, Lee MH, Lee BW, Kwon HS, Park CH, Shim KB, Kim HT, Beak IY, Jang DS (2012) Isolation and identification of phenolic compounds from the seeds of *Perilla frutescens* (L.) and their inhibitory activities against α –glucosidase and aldose reductase. *Food Chemistry* 135:1397–1403

Han HS, Park JH, Choi HJ, Son JH, Kim YH, Kim S, & Choi C (2004) Biochemical analysis and physiological activity of perilla leaves. Journal of the Korean Society of Food Culture 19:94–105

Heci Y (2001) Valuable ingredients from herb perilla: A mini review. Innov Food Technol 29:32–33

Hossain HT, Kim YH, Lee YS (2010) The apical bud as a novel explant for high-frequency in vitro plantlet regeneration of *Perilla frutescens* L. Britton. Plant Biotech Rep 4:229–235

Hong YP, Kim SY, Choi WY (1986) Postharvest changes in quality and biochemical components of perilla leaves. Korean Society of Food Science and Technology 18:255–258

Hou SW, Jia JF (2005) In vitro regeneration of *Perilla frutescens* from hypocotyl and cotyledon explants. Biologia plantarum 49:129–132

Huang S, Nan Y, Chen G, Ning N, Du Y, Lu D, Yang Y, Meng F, Yuan L (2023) The role and mechanism of *Perilla frutescens* in cancer treatment. Molecules 28:5883

Jung CS, Kwon YC, Kim BJ, Han WY, Kwack YH, Lim MS (1998) A New vegetable perilla variety "Namcheondlkkae" characterized by short stem and middle-large leaf with high antioxidizing activity. Kor J Breed Sci 30:403-403

Jung SH (1999) Changes of RNA and protein during callus induction and plant regeneration from *Perilla frutescens*. J Life Sci 9:29-34

Kaur N, Chugh V, Gupta AK (2014) Essential fatty acids as functional components of foods—a review. J Food Sci Tech 51:2289-2303

Kim HU, Lee KR, Jeon I, Jung HE, Heo JB, Kim TY, Chen GQ (2019). Fatty acid composition and oil content of seeds from perilla (*Perilla frutescens* (L.) var. frutescens) germplasm of Republic of Korea. Genet Resources Crop Evol 66:1615 - 1624

Kim KH, Lee YH, Kim D, Park YH, Lee JY, Hwang YS, Kim YH (2004) Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. Plant Cell Rep 23: 386-390

Kim JA, Choi HJ, Park SK, Kim DU (1993) Callus induction and plant regeneration from leaf segments and cotyledonary explants of *Perilla frutescens*. J Plant Biotechnol 20:47–50

Kim KM, Lee HS (2007) High frequency plant regeneration from the cultures of cotyledon explants of perilla (*Perilla frutescens* L.). J Plant Biotechnol 34:69–73

Kim KH, Lee YH, Kim D, Park YH, Lee JY, Hwang YS, Kim YH (2004) Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. Plant Cell Reports 23:386–390

Kim MY, Kim JI, Kim SW, Kim S, Oh E, Lee J, Lee E, Lee, MH (2022) Changes in antioxidant compound and activities of perilla seed, flower and leaf (*Perilla frutescens*) according to extraction method and solvent. Kor Soc Food Sci Nutr. Proceedings: 547

Lee HS, Lee JI, Ryu SN, Hur HS (1994) Effect of low temperature and plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in anther culture of perilla. Kor J Breed Sci 26:345 - 352

Lee JY, Yu SH, Kim YH, Hur HS, Lee BK, Lee SC (2003) Efficient *in vitro* shoot regeneration of perilla (*Perilla frutescens*) from cotyledon, hypocotyl and leaf explants. Kor J Breed Sci 35:237–240

Lee KR., Kim KH., Kim JB., Hong SB., Jeon I., Kim HU., Lee MH & Kim JK (2019) High accumulation of γ -linolenic acid and Stearidonic acid in transgenic Perilla (*Perilla frutescens* var. *frutescens*) seeds. BMC plant biology, 19(1), 1–15.

Lee M, Jung C, Oh K, Park C, Kim D, Choi J, Nam S (2011) A new perilla cultivar for edible seed 'Dayu' with high oil content. Kor J Breed Sci 43:616–619

Liu S., Ma J., Liu H., Guo Y., Li W & Niu S (2020) An efficient system for Agrobacterium-mediated transient transformation in *Pinus tabuliformis*. Plant Methods, 16(1), 1–9.

Long Y, Yang Y, Pan G, Shen Y (2022) New insights into tissue culture plant-regeneration mechanisms. Frontiers in plant science, 13, 926752.

Mohammad A, Atul K (2010) Nutritional and functional characterizations of *Perilla frutescens* seed oil and evaluation of its effect on gastrointestinal motility. Malays J Pharm Sci 8:1–12

Moon JG, Choo BK, Doo HS, Kwon TH, Yanh MS, Ryu JH (2002) Effect of growth regulators on plant regeneration from the cotyledon explant in Oriental Melon (*Cucumis melo* L.). Kor J Plant Tiss Cult 27:1–6

Murray MG and Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA Nucleic Acids Research 8:4321–4325

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473–497

Pressi G, Rigillo G, Governa P, Borgonetti V, Bainsi G, Rizzi R, Guarnerio C, Bertaiola O, Frigo M, Merlin M, Paltrinieri S, Zambonin R, Pandolfo S, Biagi M (2023) A novel *Perilla frutescens* (L.) Britton cell-derived phytocomplex regulates keratinocytes inflammatory cascade and barrier function and preserves vaginal mucosal integrity *in vivo*. Pharmaceutics 15:240

Sun HJ, Kang HG, Bae TW, Cho TG, Kim JK, Lim PO, Riu KZ, and Lee HY (2010) Assessment of Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) degradation from transgenic zoysiagrass digested with Simulated Gastric Fluid (SGF) J. Plant Biol. 53:113–120

Tariq Hossain HMM, Kim YH, Lee YS (2010) The apical bud as a novel explant for high-frequency in vitro plantlet regeneration of *Perilla frutescens* L. Britton. Plant Biotech Rep 4: 229–235

Um S, Bhandari SR, Kim NH, Yang TJ, Lee JK, Lee YS (2010) Characterization of lipophilic nutraceutical compounds in seeds and leaves of *Perilla frutescens*. Horti Sci Technol 31:231 - 238

Siddique AB, Islam S (2018) Effect of light and dark on callus induction and regeneration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Bangladesh J Bot 44:643

Skoog F, Miller CO (1965) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultures in vitro. In Molecular and Cellular Aspects of Development (Bell, E., ed.). New York: Harper & Row, pp 481–494.

Wu X, Dong S, Chen H, Guo M, Sun Z, Luo H (2023) *Perilla frutescens*: A traditional medicine and food homologous plant. *Chin Herb Med* 15:369 - 375

Yun HR, Chen C, Kim JH, Kim HE, Karthik S, Kim HJ, Chung YS, Baek HS, Sung S, Kim HU, Heo JB (2023) Genome-edited *HEADING DATE* 3a knockout enhances leaf production in *Perilla frutescens* *Front Plant Sci* 14:1133518

Yamazaki M., Kobayashi M., & Saito, K. (1997) Transformation of *Perilla frutescens* var. *crispa* using an *Agrobacterium*-ri binary vector system. *Plant Biotechnology*, 14(3), 169-173.

Yun HR., Chen C., Kim JH., Kim HE., Karthik S., Kim HJ., Chung YS., Baek HS., Sbum Sung., Kim HU & Heo JB (2023) Genome-edited *HEADING DATE* 3a knockout enhances leaf production in *Perilla frutescens*. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1133518.

Yu Y, Qin W, Li Y, Zhang C, Wang Y, Yang Z, Ge Z, Li F (2019) Red light promotes cotton embryogenic callus formation by influencing endogenous hormones, polyamines and antioxidative enzyme activities. *Plant Growth Regul* 87:187-199

Zenser N, Ellsmore A, Leasure C, Callis J (2001) Auxin modulates the degradation rate of aux/Iaa proteins. Proc Natl Acad Sci 98:11795–11800

Zhang T, Wang XY, Cao ZY (2005) Plant regeneration in vitro directly from cotyledon and hypocotyl explants of *Perilla frutescens* and their morphological aspects. Biol Plant, 49:423–426

Zhang T (2007) *In vitro* flowering of *Perilla frutescens*. In Vitro Cell Dev Biol - Plant 43:91–94