

국내 콩 품종 형질전환기술개발  
Development of *Agrobacterium*-mediated  
transformation of Korean soybean cultivars

동아대학교 생명자원과학대학

과 학 기 술 부

## 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “국내공품중 형질전환기술개발에 관한 연구”과제 (세부과제 “국내공품중 형질전환기술개발에 관한 연구에 관한 연구”) 의 보고서로 제출합니다.

2004. 8.

주관연구기관명 : 동아대학교

주관연구책임자 : 정 영 수

연 구 원 : 서 진 경

” : 이 기 정

” : 신 상 현

## 보고서 초록

과제관리번호	CG2122	해당단계 연구기간	2001.9.1 - 2004.6.30	단계 구분	1단계 / 3단계
연구사업명	중 사업명	21세기프론티어연구개발사업			
	세부사업명	작물유전체기능연구사업			
연구과제명	중 과제명	국내 콩 품종 형질전환 기술개발			
	세부(단위)과제명	국내 콩 품종 형질전환 기술개발			
연구책임자	정 영 수	해당단계 참여연구원수	총 : 5 명 내부 : 1 명 외부 : 4 명	해당단계 연구비	정부: 150,000 천원 기업: 천원 계: 150,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	동아대학교 생명자원과학대학		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	53p
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 콩 품종에 대한 효율적인 형질전환체계를 확립하기 위하여 실험을 수행하였다.</li> <li>- 아그로박테리움 감염에 순응적인 품종을 선발하기 위하여 31개의 국내 콩 장력품종을 스크린 하여 일품검정콩, 만리콩, 은하콩, 대원콩등 14개의 순응형 품종을 스크린 하였다.</li> <li>- 효율적인 형질전환을 위하여 제균제로는 timentin이 선택되었고, 효율적인 선발을 위하여 선발 항생제로서 하이그로마이신이 선택되었다.</li> <li>- 하이그로마이신 농도는 10ppm에서 15ppm이 효율적이었고, 절편체의 치상방향은 adaxial side 를 down하여 치상하였을 때가 높은 GUS positive 빈도를 나타냈고, 상처방법은 매스보다 침 을 사용하였을 때, 훨씬 높게 나타났다.</li> <li>- 고효율 형질전환 체계 확립을 위하여 호르몬 전처리를 한 결과, BA 5ppm과 10ppm을 처리하였을 때, 후기 선발에서 높은 생존율을 보였고, 전처리후에 액체배지에서 선발을 하였을 때 escape의 빈도를 크게 낮출 수 있었다.</li> <li>- 공배양중에 황화합물을 첨가하였을 때, 신초발생이 크게 증가하였으며, 하이그로마이신 선발배 지에서 왕성한 생육을 나타내었다.</li> <li>- GUS분석과 PCR을 통하여 도입유전자를 확인하였으며, 현재 종자확보를 위하여 부리형성이 유도되고 있다.</li> </ul>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	콩 형질전환, 하이그로마이신, 아그로박테리움, GUS, PCR			
	영 어	soybean transformation, Hygromycin, Agrobacterium, GUS, PCR			

## 요 약 문

### I. 제 목

국내 콩 품종 형질전환기술개발

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구과제의 최종 개발목표는 1) 국내 콩 품종 가운데 형질전환에 순응적인 genotype을 선별하고, 2) 또 현재 국내에서 사용하고 있는 콩 형질전환기술이 대부분이 외국에서 개발되어 특허기술로 보호되고 있다는 점을 고려해 새로운 콩 형질전환기술개발을 발굴하는데 있다. 향후 3년 간, 국내 유망 콩 품종 중 형질전환에 순응적인 10개 이상의 유전자형을 발굴하고 이들에 대한 형질전환체계를 확립하며, 기존의 방법과 다른 콩 형질전환 신기술개발을 모색하고자 한다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

구 분	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2001)	-형질전환 순응형 유전자형 선별 (5개/년) -새로운 콩 형질전환 기초기술 개발; 전처리기술을 이용한 효율 증대
2차년도 (2002)	-형질전환 순응형 유전자형 선별 (5개/년) -새로운 고효율 콩 형질전환 기초 기술 개발; 전처리기술을 이용한 효율 증대 (5%이상) -형질전환체 분석 및 후대 검정 -형태적, 생리적, 생화학적 변이 관찰
3차년도 (2003)	-형질전환 순응형 유전자형 선별 (5개/년) -새로운 고효율 콩 형질전환 기초기술개발; 전처리기술을 이용한 효율 증대(5%이상) -형질전환체 분석 및 후대 검정 -형태적, 생리적, 생화학적 변이 관찰

### IV. 연구개발결과

국내 콩 품종에 대한 효율적인 형질전환체계를 확립하기 위하여 실험을 수행하였다. 아그로박테리움 감염에 순응적인 품종을 선별하기 위하여 31개의 국내 콩 장려품종을 스크린하여 일품검정콩, 만리콩, 은하콩, 대원콩등 14개의 순응형 품종을 스크린 하였으며, 효율적인 형질전환을 위하여 재균제로는 timentin이 선택되었고, 효율적인 선발을 위하여 선발항생제로서 하이그로마이신이 선택되었다. 하이그로마이신 농도는 10ppm에서 15ppm이 효율적이었고, 절편체의 치상방향은 adaxial side를 down하여 치상하였을 때가

높은 GUS positive 빈도를 나타냈고, 상처방법은 매스보다 칩을 사용하였을 때, 훨씬 높게 나타났다. 고효율 형질전환 체계 확립을 위하여 호르몬 전처리를 한 결과, BA 5ppm 과 10ppm을 처리하였을 때, 후기 선발에서 높은 생존율을 보였고, 전처리후에 액체배지에서 선발을 하였을 때 escape의 빈도를 크게 낮출 수 있었다. 또한 공배양중에 황화합물을 첨가하였을 때, 신초발생이 크게 증가하였으며, 하이그로마이신 선발배지에서 왕성한 생육을 나타내었다. GUS분석과 PCR을 통하여 도입유전자를 확인하였으며, 현재 종자확보를 위하여 뿌리형성이 유도되고 있다.

#### V. 연구개발결과의 활용계획

본 실험을 통한 콩 형질전환 기술개발은 프론티어 사업의 유전자 탐색분야의 연구결과, 다양하고 농업적, 산업적으로 유용한 유전자가 많이 확보되었을 때, 본 실험조건을 통하여 형질전환을 함으로써 유용한 형질전환체 및 분자육종에 큰 기여를 할 것으로 생각된다. 호르몬 전처리 기술과 액체선발배지를 이용한 고효율의 형질전환기술은 앞으로 다양하고 많은 고부가가치의 유용유전자를 콩에 도입하여, 고부가가치의 형질전환 콩을 생산하고, 콩 유전체 기능 연구 등에 매우 중요한 기초기술로 활용가능하다.

## S U M M A R Y

In order to achieve highly efficient soybean transformation method, genotype screen of Korean soybean cultivars for amenability to *Agro*-infection and diverse experimental trials have been introduced in the current study such as hormone pre-culture and various selection techniques. The active genome projects from several academically and economically important plants have provided sequence data of many genes and accumulated in Gene Bank data base promptly. Some of those genes reported have high potentials to improve plant quality in agronomical and industrial uses. However, difficulties to achieve the successful introduction of those valuable genes into plant can be found in recalcitrant genetic transformation procedure of some agriculturally important crops. Especially none of research group in Korea have succeeded to report any formal results on the production of genetically engineered soybean variety or research publication, even though there have been several GMO soybean varieties released from abroad soybean seed companies. To achieve long term goal for producing high-value soybean variety by genetic transformation, there are couple of procedures to be improved. First, genotype screen of Korean soybean varieties whether they are amenable to *Agro*-infection and tissue culture responsive has to be done. Second, efficiency for genetic transformation has to be increased. In this study various experiments have been carried to achieve both proposed goals.

To determine the amenability of Korean soybean cultivars to *Agrobacterium* infection most commonly grown 31 Korean cultivars were used for genetic transformation. Cotyledonary node was used as a explant and inoculated with *Agrobacterium* strain LBA4404 harboring pTOK233, super binary vector. After placement on selection media containing 10ppm of hygromycin, 4 to 6 week old shoots(0.5 - 1cm) were stained with GUS solution. Shoot formation rates were high in Muhankong(12%), Manrikong(10%), Eunhakomg(19%), Daewonkomg(23%), and high frequency of GUS positives were observed in Ilpункumjeongkong, Muhankong, Eunhakomg, Daewonkomg. In addition that, strong GUS expression was found in Jangmikong and Baekwunkong.

A series of experiments were carried to determine optimal condition for soybean transformation. For washing reagent, timentin had chosen because of its positive effect on regeneration and clear removal of *Agrobacterium* over cefotaxime. Hygromycin was used as a selection agent. The result indicated that best concentration of hygromycin was 30ppm in shoot induction media and 10 or 15ppm in shoot elongation media. In another experiment, three different agar concentrations(0.4, 0.6, 0.8%) were tested. Among three tested, high shoot formation was observed in 0.6% and 0.8%, and overall transformation was great in 0.8% agar concentration. For better selection of transformants at the early stage, orientation of placement(flat side up or down) was investigated. The GUS result showed that higher

transformation rate was obtained when flat side(adaxial) was placed down by directly contacting Agro-infected area on the selection media. In two different wounding methods, either using scalpel or using a bundle of needles, wounding by needles gave high frequency of GUS positive.

To increase transformation frequency hormone pre-culture during co-cultivation was applied. In shoot formation, the highest rate was observed from the non-treated(18%) and BA(6-benzylaminopurine) 5ppm(13%) and BA 10ppm(11%) followed, unexpectedly. And no clear difference in GUS positive ratio was confirmed among three treatments. However, strong GUS staining was found in hormone treated ones as well as better survival of transformed shoots in later shoot elongation(SE) media. No survival of shoots was observed in non-treated ones. After introducing hormone pre-culture during co-cultivation, hygromycin concentration for optimal selection was reestablished. Hygromycin 5 & 10ppm were effective for shoot formation and emergency of GUS positives than hygromycin 20ppm. Like the previous result, all the shoots from the non-treated ones died during later selection in SE media. In the experiment to determine proper orientation of placement, higher GUS positive were observed in the placement of flat side down direction. The results of hormone pre-culture during co-cultivation indicated that high frequency of early shoot formation did not always lead to high frequency of genetic transformation, as shown in non-treated shoots; high frequency of shoot formation but no survival in later selection. Therefore, much effective selection method to minimize early escapes was searched. We introduced liquid selection instead of selection in solid media with limited contact. The result showed that GUS positive ratio was nearly double in the hormone treated(80%) after liquid selection than in the non-treated(44%). And survival rate of transformed shoots was also high in the hormone treated(33%) than in the non-treated(10%).

Recent reports on soybean transformation revealed that addition of thiol compounds, L-cystein, dithiothreitol(DTT), and sodium thiosulfate, improved T-DNA delivery by inhibiting the activity of plant pathogen- and wound-response enzymes, such as peroxidases (PODs) and polyphenol oxidases (PPOs). We compared regeneration frequency of shoots with or without thiol compounds addition to co-cultivation media. The efficiency of regeneration significantly increased from an average of 14.7% to 23%. We also observed much higher survival of transformed shoots in long-lasting selection on hygromycin-containing media and enhanced proliferation of multiple shoots.

## C O N T E N T S

Chapter 1. Summary of research .....	9
Chapter 2. Current status of research area .....	12
Chapter 3. Results .....	13
Chapter 4. Achievements and contributions of results .....	48
Chapter 5. Application of results .....	51
Chapter 6. Scientific information from foreign research .....	52
Chapter 7. References .....	53



## 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	9
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	12
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	13
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	48
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	51
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	52
제 7 장 참고문헌 .....	53

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

\* 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술

### 제 1 절 연구개발의 목적

국내 콩 품종을 재료로 하여 형질전환에 순응적인 genotype을 선별하고 높은 빈도의 형질전환체계를 확립할 경우, 본 작물 유전체 기능 사업을 통하여 농업적, 산업적으로 유용한 유전자가 발굴되었을 때, 이들 유전자들을 형질전환하여 농업적, 산업적으로 유용한 고부가가치의 식물과 작물을 생산하여, 국내 콩과 관련된 농업계와 산업에 상당한 파급효과를 미칠 것으로 예상된다.

본 연구과제의 최종 개발목표는 1) 국내 콩 품종 가운데 형질전환에 순응적인 genotype을 선별하고, 2) 또 현재 국내에서 사용하고 있는 콩 형질전환기술이 대부분이 외국에서 개발되어 특허기술로 보호되고 있다는 점을 고려해 새로운 콩 형질전환기술개발을 발굴하는데 있다. 향후 3년 간, 국내 유망 콩 품종 중 형질전환에 순응적인 10개 이상의 유전자형을 발굴하고 이들에 대한 형질전환체계를 확립하며, 기존의 방법과 다른 콩 형질전환 신기술개발을 모색하고자 한다.

### 제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

#### 1. 연구개발 필요성

- 지놈 프로젝트와 같은 유전체 연구의 활성화로 인해 많은 유전자의 염기서열이 밝혀지고 유전자 은행 등과 같은 데이터 베이스에 다량의 유전자가 빠른 속도로 축적되고 있다.
- 이들 유전자중에 특정작물에 도입될 경우, 중요한 농업 및 산업적 고부가가치 형질을 추가시켜 품종의 가치를 크게 증가시킬 가능성을 가진 유전자들이 점점 많아지는 추세이다.
- 그러나, 국내 농업에 매우 중요한 위치를 차지하는 특정 작물 중에, 형질전환의 효율이 매우 낮아, 형질전환을 통한 유전자의 도입이 매우 어려운 작물이 많은 것이

현실임. 본 프론티어 사업의 주 작물인 벼, 고추, 콩 중에서도 벼를 제외하고는 형질 전환이 잘 안되고 있는 실정이다.

특히 콩의 경우, 외국의 경우는 제초제 저항성과 내 바이러스, 내충성 유전자를 포함한 형질전환체가 생산되어 품종화 되었으나, 아직도 매우 낮은 형질전환효율 때문에 많은 유전자의 도입에 어려움을 겪고 있고, 최근에도 고효율의 형질전환기술을 개발하기 위한 연구가 미국과 캐나다등에서 계속 수행되고 논문이 보고되고 있다.(Plant Cell reports 2000, 19:485-490; Plant Cell reports 2000, 19:1090-1097; Plant Cell reports 2000, 19:478-484)

국내에서는 농촌진흥청 산하 농업과학기술원과 호남시험장, 그리고 동아대학교 본인의 실험실에서 각각 자엽과 캘러스를 이용한 형질전환을 수행하고 있으며, 본 프론티어 사업의 단장인 서울대학교 최 양도 교수시험실에서 한방침을 이용한 독특한 형질전환기술을 개발한 바 있으나, 어느 연구팀에 의해서도 공식적인 논문이나 결과가 아직 발표되지는 않은 상태이다.

따라서 본 연구과제에서는 이미 지난 1년간 국내 콩 품종을 대상으로 형질전환실험을 수행한 결과를 기초로 연구내용을 확충 및 보강하여 국내 콩 품종가운데 형질전환에 순응적인 genotype을 선별하고, 또 현재 국내에서 사용하고 있는 콩 형질전환기술이 대부분이 외국에서 개발되어 특허기술로 보호되고 있다는 점을 고려해 새로운 콩 형질전환기술개발을 모색하고자 수행되었다.

## 2. 연구개발 범위

본 연구의 성공적 연구결과의 확보를 위하여 수행된 연구개발의 범위는 아래의 표와 같다.

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	예상 결과물
1차년 도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶국내 콩 형질전환 순응형 유전자형 스크린</li> <li>▶새로운 고효율 콩 형질전환 기초 기술 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-형질전환 순응형 유전자형 선발 (5개/년)</li> <li>-새로운 콩 형질전환 기초기술 개발; 전처리기술을 이용한 효율 증대</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-형질전환순응 품종선발 (5개이상)</li> <li>-고효율형질전환기초기술</li> </ul>
2차년 도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶국내 콩 형질전환 순응형 유전자형 스크린</li> <li>▶새로운 고효율 콩 형질전환 기술 개발</li> <li>▶형질전환체 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-형질전환 순응형 유전자형 선발 (5개/년)</li> <li>-새로운 고효율 콩 형질전환 기초 기술 개발; 전처리기술을 이용한 효율 증대 (5%이상)</li> <li>-형질전환체 분석 및 후대 검정</li> <li>-형태적, 생리적, 생화학적 변이 관찰</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-형질전환순응 품종선발 (5개이상)</li> <li>-고효율 형질전환기술개발 (5%)</li> <li>-형질전환체(50계통 이상)</li> <li>-논문발표</li> </ul>
3차년 도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶국내 콩 형질전환 순응형 유전자형 스크린</li> <li>▶새로운 고효율 콩 형질전환 기술 개발</li> <li>▶형질전환효율 비교 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-형질전환 순응형 유전자형 선발 (5개/년)</li> <li>-새로운 고효율 콩 형질전환 기초 기술 개발; 전처리기술을 이용한 효율 증대(5%이상)</li> <li>-형질전환체 분석 및 후대 검정</li> <li>-형태적, 생리적, 생화학적 변이 관찰</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-형질전환순응 품종선발 (5개 이상)</li> <li>-고효율 형질전환기술개발 (5%)</li> <li>-논문발표 및 특허등록</li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

콩 형질전환체 생산의 연구는 외국의 경우 연구가 매우 활성화되어 이미 유전자 조작에 의해 생산된 형질전환 콩 품종이 시장에 나와 있는 실정이다. 일찍이 Monsanto에 의해 만들어진 제초제 저항성과 내 바이러스, 내충성 유전자를 포함한 형질전환체가 생산되어 품종화 되었고, Dupont사에 의해서는 이소플라본이 증가된 콩이 생산되어 보고 되기도 하였다. 형질전환방법에 대한 연구도 많은 대학과 연구소에서 수행되어 새롭고 고효율의 형질전환방법의 확립이 모색되고 있다. 이미 생산된 형질전환 콩들의 경우 거의가 미성숙배를 이용하여 체세포배를 만든 후, 유전자총을 이용하여 형질전환을 하고 재분화하여 만든 것에 반하여 현재 많은 미국의 대학들은 아그로박테리움을 이용하여 성체종자의 cotyledonary node에 직접 형질전환하는 방법을 많이 사용하고 있다. 이와 같은 방법으로 직접 생산된 콩품종은 아직 보고 되지 않았으나, 이 방법의 효율성 때문에 많은 연구 논문이 발표되고 있다. 예를 들면 유전자총을 이용한 형질전환의 경우, 유전자의 multiple copy 도입에 의한 gene silencing 이 크게 문제되는데, 아그로박테리움을 이용하여 형질전환을 할 경우, 대부분 유전자가 1-2개만 세포 안으로 도입이 되기 때문에 이와 같은 문제를 쉽게 해결할 수 있다. 이러한 이유로 본 과제에서도 유전자의 안정적인 도입을 위하여 cotyledonary node에 직접 형질전환하는 방법을 선택하여 사용하였다. 현재 국내에서는 몇 개의 실험실에서 콩형질전환을 수행하고 있다. 농촌진흥청에서는 농업생명공학연구원과 작물시험장 생명공학과, 그리고 호남농업연구소에서 콩형질전환을 수행하였거나 현재 수행하고 있다. 대학에서는 본 연구과제가 수행되고 있는 동아대와 서울대에서 수행하고 있고 기업 중에서는 대전의 유진텍에서 콩형질전환 연구를 수행하고 있다. 그러나 현재 어느 연구진에서도 성공적이고 안정적인 형질전환 성공사례를 발표하지 못하였고 논문이 발표된 경우도 없는 실정이다. 본 연구에서는 지난 3년간 한국 콩 품종을 가지고 형질전환 순응형 스크린을 하였으며 그 결과 높은 재분화 효율과 아그로박테리움의 감염에 순응적인 품종을 찾아낼 수 있었다. 이들 품종을 재료로 하여 초기 형질전환의 효율을 높이기 위한 전처리 조건의 확립과 최적의 선발조건을 확립하였다. 이제까지의 연구결과 초기형질전환의 효율을 10% 후반대로 끌어올리는데 성공하였으며 연구결과 확보된 형질전환 shoot를 이용하여 현재 rooting과 종자확보를 위한 실험을 수행하고 있다. 현재의 실험목표는 올해 안에 형질전환체 들로부터 종자를 확보하고 유전자의 도입을 확인하는데 있다.

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 국내 콩 품종 형질전환 순응형 genotype 스크린

#### 1. 실험목적

국내에서 재배되고 있는 콩 장려품종가운데 아그로박테리움 감염에 순응적이고 형질전환 효율이 높아 형질전환재료로 사용될 유전자형을 찾아내는데 실험 목적이 있다.

#### 2. 재료

검정콩 1호, 검정콩 2호, 진품종, 무한콩, 소담콩, 진품종 2호, 선흑콩, 푸른콩, 단백콩, 장엽콩, 광안콩, 황금콩, 보광콩, 만리콩, 소명콩, 장수콩, 백운콩, 대황콩, 소백나물콩, 장미콩, 금강콩, 일품검정콩, 은하콩, 일미콩, 새울콩, 큰울콩, 새알콩, 대원콩, 다원콩, 태광콩, 신탄콩, PI 416937을 재료로 사용하였다.

#### 3. 방법

##### 가) 파종

종자는 70% ethanol에 30초간 담궈 1차 표면살균을 하고 1% sodium hypochloride에 30분간 shaking 하면서 소독한 후, 10분 간격으로 멸균수로 3회 수세하였다. Petri-dish에 파종 후 24℃ 배양실에서 16시간 광조건과 8시간 암조건으로 5일간 발아시켰다.

##### 나) *Agrobacterium* preparation

콩의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 supervector pTOK233을 가지고 있는 LBA4404를 사용하였다. *Agrobacterium*은 형질전환 3일 전 hygromycin 50mg/l이 포함된 고체 YEP 배지(yeast 5g/l, pepton 5g/l, NaCl 2.5g/l, pH 7.0)에 streaking 한 후, 28℃ incubator에서 3일간 배양하였다.

##### 다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

콩배양 배지로는 100μM의 acetosyringone이 포함된 AAM 배지(AAM salts and amino acids(Toriyama and Hinata, 1985), MS vitamins(Murashigs and Skoog, 1962), casamino acid 0.5g/l, sucrose 68.5g/l, glucose 36g/l, pH 5.2)를 사용하였다. 형질전환 당일 왕성히 자란 *Agrobacterium*을 50ml 코닝튜브에 AAM 액체배

지를 30ml 채운 후 spatula를 이용하여 OD값 0.5정도의 혼탁액이 되도록 풀어 넣었다. 발아한 식물체의 hypocotyl을 떡잎 밑 약 1cm되는 곳에서 자른 후 양 떡잎 사이로 메스를 넣어 하배측까지 수직으로 자르고 새로 나온 본엽을 제거하였다. 떡잎 기부에서 위로 약 0.5cm와 아래 하배측쪽으로 약 0.1cm 이내의 부위를 scalpel을 이용하여 7-12회 반복하여 상처 내었다. *Agrobacterium*을 희석시킨 AAM 배지에 상처를 낸 떡잎을 20분간 접종시킨 후 flat side를 배지쪽으로 치상하여 3일 간 24°C에서 암배양시켰다.

#### 라) Wash-out and shoot induction

3일간 공배양 후 *Agrobacterium*의 제균을 위하여 멸균수로 2회 세척한 후 500mg/l의 cefotaxime과 0.05%의 Triton X-100이 포함된 멸균수로 5회 세척하였다. 30ml의 세척 용액을 넣은 50ml 코닝 튜브에 떡잎을 넣었으며, mini 3D-shaker를 이용하여 매회 20분간 상하로 shaking 하였다. 5회 세척된 떡잎은 SI(shoot induction; B5 salt 3.16g/l, BAP 1.67mg/l, sucrose 3%, Agar 0.6%)-①(cefotaxime 500mg/l, hygromycin 30mg/l) 배지에 치상하여 24°C 배양실에서 신초발생을 관찰하였다. 그 후 2주 간격으로 SI-②(cefotaxime 200mg/l, hygromycin 10mg/l), SI-③(cefotaxime 100mg/l, hygromycine 10mg/l)로 옮겨 치상하면서 관찰하였다.

#### 마) GUS expression assay

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronic acid (X-Gluc)을 150 $\mu$ l dimethyl formamide에 녹인 후, 850 $\mu$ l의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. SI 배지 치상 후 0.5cm 크기로 자란 shoot 및 callus는 절단하여 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37°C incubator에서 overnight 처리 하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4°C에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

## 4. 결과

형질전환 순응형 genotype 스크린을 위해 실험에 이용된 국내 콩 32개 품종의 발아율은 각 품종간 큰 차이를 보였다. 무한콩, 은하콩, 소백나물콩등은 발아율이 80%이상으로 양호하였으나 장엽콩, 선흑콩, 진품종 2호 등은 0~40%로 아주 낮은 발아율을 보였다. 종자

의 순도가 균일하지 않아 발아는 하였으나 무르거나 쪼개져 실험을 할 수 없는 경우도 빈번하였다. Hygromycin이 첨가된 SI 배지에서 shoot 발생은 발아율과 크게 관여하지는 않았으나 무한콩(12%), 만리콩(10%), 은하콩(19%), 대원콩(23%)은 높은 발아율과 관여하여 shoot 발생율도 양호하였다. 단백콩, 황금콩, 새알콩 등은 높은 발아율을 보인 반면 shoot 발생율은 낮았으며, 진품종 2호, 대황콩, 일품검정콩 등은 발아율은 낮았으나 shoot 발생율은 다소 높았다. Shoot 발생율과 관련하여 일품검정콩, 은하콩, 무한콩, 대원콩에서 높은 GUS positive를 보였고 장미콩과 백운콩에서는 강한 GUS유전자발현을 관찰할 수 있었다. 발아율과 shoot 발생율, GUS positive를 모두 고려하여 4품종(무한콩, 백운콩, 소백나물콩, 은하콩)을 선발하여 이후 형질전환효율을 높이기 위한 실험을 수행하였다.

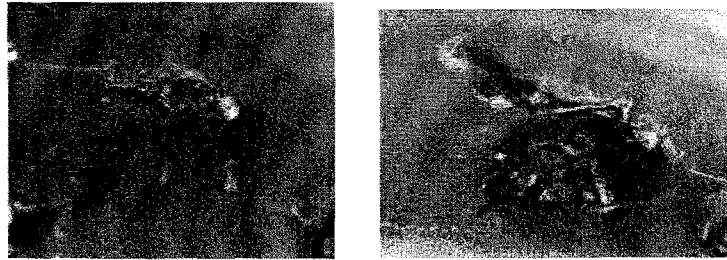


표 1. 국내 콩 품종 형질전환 순응형 genotype 스크린

번호	품종	품종별 발아율(%)	shoot 발생율(%)	Gus positive <sup>†</sup> (%)
1	검정콩 1호	64	9	5
2	검정콩 2호	85	10	1
3	진 품종	53	0	0
4	무한콩	88	12	5
5	소담콩	76	1	6
6	진품종 2호	40	4	4
7	선흑콩	13	0	3
8	푸른콩	86	0	0
9	단백콩	94	1	3
10	장엽콩	0	0	0
11	광안콩	100	2	0
12	황금콩	90	0	0
13	보광콩	60	6	6
14	만리콩	82	10	4
15	소명콩	93	1	5
16	장수콩	68	3	3
17	백운콩	79	5	1
18	대황콩	50	7	0
19	소백나물콩	98	6	5
20	장미콩	82	1	1
21	금강콩	79	1	1
22	일품검정콩	66	18	10
23	은하콩	98	19	8
24	일미콩	73	9	5
25	새울콩	91	5	5
26	큰울콩	63	8	3
27	새알콩	97	0	0
28	대원콩	96	23	9
29	다원콩	75	5	1
30	태광콩	97	16	2
31	신팔달콩	92	5	1
32	PI 416937	100	2	0

<sup>†</sup>치상된 cotyledonary hypocotyl에서 발생한 shoot나 callus중에서 부분적인 GUS 유전자의 발현이라도 확인된 개체는 모두 포함하여 계산한 수치임.

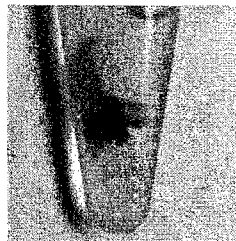
(그림) 형질전환 후 shoot 발생



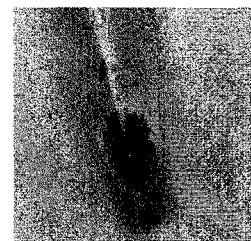
(그림) 품종별 GUS 발현



<장미콩>



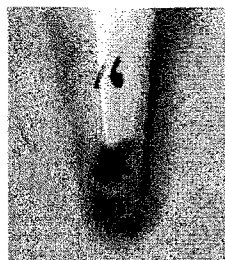
<백운콩>



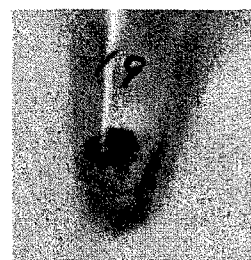
<검정콩 1호>



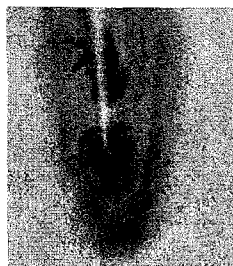
<보광콩>



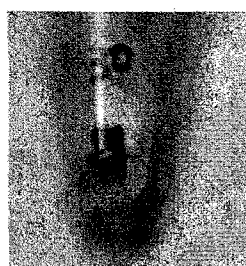
<장수콩>



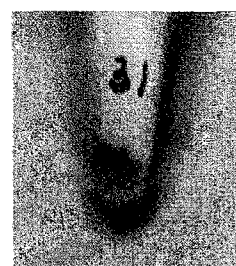
<소백나물콩>



<은하콩>



<태광콩>



<신팔달콩>

## 제 2 절 hygromycin 농도가 형질전환체 선발 및 재분화에 미치는 영향

### 1. 목적

새로운 고효율의 형질전환기술개발을 위한 다양한 처리조건 확립을 위하여 선발과정 중, 효율적인 선발과 높은 형질전환 빈도를 주는 hygromycin의 적정농도를 규명하는데 실험 목적이 있다.

### 2. 재료

이 실험을 위하여 소백나물콩, 은하콩, 무한콩, 백운콩의 떡잎을 재료로 형질전환을 수행하였다.

### 3. 방법

#### 가) 파종

종자는 70% ethanol에 30초간 담궈 1차 표면살균을 하고 1% sodium hypochloride에 30분간 shaking 하면서 소독한 후, 10분 간격으로 멸균수로 3회 수세하였다. Petri-dish에 파종 후 24℃ 배양실에서 16시간 광조건과 8시간 암조건으로 5일간 발아시켰다.

#### 나) *Agrobacterium* preparation

콩의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 supervector pTOK233을 가지고 있는 LBA4404를 사용하였다. *Agrobacterium*은 형질전환 3일 전 hygromycin 50mg/l이 포함된 고체 YEP 배지(yeast 5g/l, pepton 5g/l, NaCl 2.5g/l, pH 7.0)에 streaking 한 후, 28℃ incubator에서 3일간 배양하였다.

#### 다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

공배양 배지로는 100μM의 acetosyringone이 포함된 AAM 배지{AAM salts and amino acids(Toriyama and Hinata, 1985), MS vitamins(Murashigs and Skoog, 1962), casamino acid 0.5g/l, sucrose 68.5g/l, glucose 36g/l, pH 5.2}를 사용하였다. 형질전환 당일 왕성히 자란 *Agrobacterium*을 50ml 코닝튜브에 AAM 액체배지를 30ml 채운 후 spatula를 이용하여 OD값 0.5정도의 혼탁액이 되도록 풀어 넣었다. 발아한 식물체의 hypocotyl을 떡잎 밑 약 1cm되는 곳에서 자른 후 양 떡잎 사이로 메스를 넣어 하배축까지 수직으로 자르고 새로 나온 본엽을 제거하였다. 떡잎 기부에서 위로 약 0.5cm와 아래 하배축쪽으로 약 0.1cm 이내의 부위를 scalpel을 이

용하여 7-12회 반복하여 상처 내었다. *Agrobacterium*을 희석시킨 AAM 배지에 상처를 낸 떡잎을 20분간 접종시킨 후 flat side를 배지쪽으로 치상하여 3일 간 24°C에서 암배양시켰다.

#### 라) Wash-out and shoot induction

3일간 공배양 후 *Agrobacterium*의 제균을 위하여 멸균수로 2회 세척한 후 500mg/l의 cefotaxime과 0.05%의 Triton X-100이 포함된 멸균수로 5회 세척하였다. 30ml의 세척 용액을 넣은 50ml 코닝 튜브에 떡잎을 넣었으며, mini 3D-shaker를 이용하여 매회 20분간 상하로 shaking 하였다. 5회 세척된 떡잎은 SI(shoot induction; B5 salt 3.16g/l, BAP 1.67mg/l, sucrose 3%, Agar 0.6%)-①(cefotaxime 500mg/l, hygromycin 30mg/l) 배지에 치상하여 24°C 배양실에서 신초발생을 관찰하였다. 그 후 2주 간격으로 SI-②(cefotaxime 200mg/l, hygromycin 10mg/l), SI-③(cefotaxime 100mg/l, hygromycin 10mg/l)로 옮겨 치상하면서 관찰하였다.

#### 마) GUS expression assay

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronide (X-Gluc)을 150 $\mu$ l dimethyl formamide에 녹인 후, 850 $\mu$ l의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. SI 배지 치상 후 0.5cm 크기로 자란 shoot 및 callus는 절단하여 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37°C incubator에서 overnight 처리 하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4°C에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

## 4. 결과

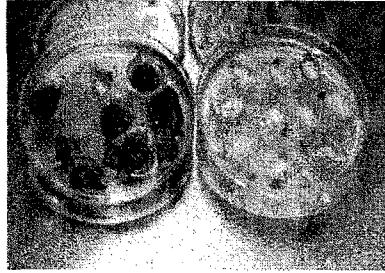
4품종에 있어서의 발아율은 38%(백운콩)에서 89%(소백나물콩)로 품종간 큰 차이를 보였다. 제균 항생제 Cefotaxime과 Timentin이 각각 첨가된 SI배지 비교 실험에서는 품종간 차이 없이 Timentin 첨가배지에서 백화현상을 보였으며, Cefotaxime이 첨가된 배지에서는 별다른 해가 나타나지 않았다. 이와 관련하여 Timentin이 첨가된 배지에서 Shoot 및 Callus 발생율(0~7%)이 현저히 낮았으며, Cefotaxime이 첨가된 배지에서의 Shoot 및 Callus 발생율(6~18%)이 높았다. Cefotaxime 첨가 SI 배지의 Hygromycin 첨가 농도별 비교 실험에서 hygromycin 첨가 농도에 따른 Shoot 발생은 무한콩을 제외하고 30mg/l의 고농도에서 shoot가 발생하지 않고 15와 10mg/l 두 농도에서는 농도의 차이 없이

shoot가 발생하였다. Callus 발생율은 hygromycin 10ppm의 저농도에서 4~18%로 높았다. 4품종에 있어서 Shoot와 Callus의 발생은 hygromycin 저농도에서 양호하였다. 발생한 대부분의 Shoot 및 Callus에서 GUS positive를 관찰할 수 있었는데, 무한콩이 저농도의 하이그로마이신에서 비교적 높은 GUS positive를 나타냈고, 소백나물콩과 은하콩은 약간 낮은 수치를 나타내었다. Callus에 있어서는 은하콩이 저농도의 하이그로마이신에서 높은 GUS발현양상을 나타냈다. Timentin을 이용한 실험은 제균 후에, 극심한 백화현상을 보여 실험을 중간에 중단하였다.

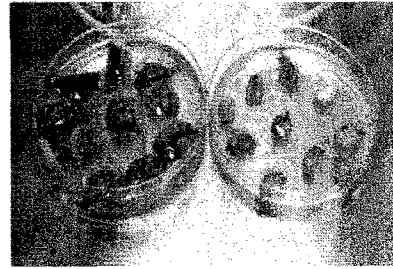
표 2. 제균항생제 비교 및 적정 hygromycin 선발 농도의 비교

		Cefotaxime				Timentin			
		Shoot(%)		Callus(%)		Shoot(%)		Callus(%)	
		Shoot 발생율	GUS positive	Callus 발생율	GUS positive	Shoot 발생율	GUS positive	Callus 발생율	GUS positive
소 백 나 물 콩	hygro. 30	0/199 (0%)	0/199 (0%)	0/199 (0%)	0/199 (0%)	0/32 (0%)	0/32 (0%)	0/32 (0%)	0/32 (0%)
	hygro. 15	5/205 (2%)	4/205 (2%)	3/205 (1%)	2/205 (1%)	1/33 (3%)	0/33 (0%)	0/33 (0%)	0/33 (0%)
	hygro. 10	5/247 (2%)	5/247 (2%)	10/247 (4%)	10/247 (4%)	0/32 (0%)	0/32 (0%)	2/32 (6%)	0/32 (0%)
은 하 콩	hygro. 30	0/146 (0%)	0/146 (0%)	1/146 (1%)	0/146 (0%)	0/33 (0%)	0/33 (0%)	2/33 (6%)	0/33 (0%)
	hygro. 15	1/137 (1%)	1/137 (1%)	9/137 (7%)	8/137 (6%)	1/33 (3%)	0/33 (0%)	0/33 (0%)	0/33 (0%)
	hygro. 10	3/124 (2%)	3/124 (2%)	16/124 (13%)	14/124 (11%)	3/32 (9%)	1/32 (3%)	1/32 (3%)	1/32 (3%)
무 한 콩	hygro. 30	3/58 (5%)	3/58 (5%)	1/58 (2%)	1/58 (2%)	0/29 (0%)	0/29 (0%)	1/29 (3%)	1/29 (3%)
	hygro. 15	4/68 (6%)	3/68 (4%)	0/68 (0%)	0/68 (0%)	0/29 (0%)	0/29 (0%)	0/29 (0%)	0/29 (0%)
	hygro. 10	3/71 (4%)	2/71 (3%)	13/71 (18%)	7/71 (10%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)
백 운 콩	hygro. 30	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	1/15 (7%)	1/15 (7%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
	hygro. 15	1/25 (4%)	1/25 (4%)	0/25 (0%)	0/25 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	1/16 (6%)	0/16 (0%)
	hygro. 10	0/25 (0%)	0/25 (0%)	1/25 (4%)	1/25 (4%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	1/16 (6%)	0/16 (0%)

(그림) 제균항생제 비교 실험



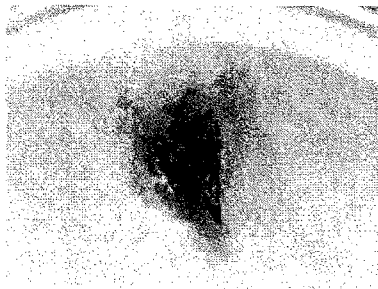
<무한공>



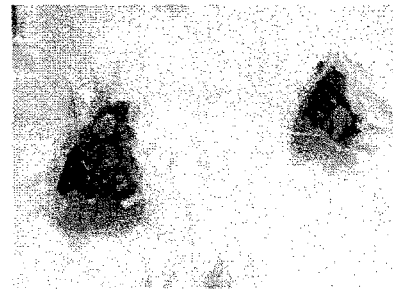
<소백나물공>

각그림 좌: cefotaxime 포함배지, 우 timentin 포함배지

(그림) 형질전환 후 callus 발생( hygromycin 10mg/L 첨가 배지)



<무한공>



<소백나물공>

## 제 3 절 Agar 농도, 치상방향, 상처방법이 형질전환체 선발효율에 미치는 영향

### 1. 목적

새로운 고효율의 형질전환기술개발을 위한 다양한 처리조건 확립을 위하여 solidifying agent인 agar의 농도와 치상 방향, 상처방법이 선발효율과 형질전환빈도에 미치는 영향을 규명하는데 실험의 목적이 있다.

### 2. 재료

본 실험을 위하여 소백나물콩, 은하콩을 형질전환재료로 사용하였다.

### 3. 방법

#### 가) 파종

종자는 70% ethanol에 30초간 담궈 1차 표면살균을 하고 1% sodium hypochloride에 30분간 shaking 하면서 소독한 후, 10분 간격으로 멸균수로 3회 수세하였다. Petri-dish에 파종 후 24℃ 배양실에서 16시간 광조건과 8시간 암조건으로 5일간 발아시켰다.

#### 나) *Agrobacterium* preparation

콩의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 supervector pTOK233을 가지고 있는 LBA4404를 사용하였다. *Agrobacterium*은 형질전환 3일 전 hygromycin 50mg/l이 포함된 고체 YEP 배지(yeast 5g/l, pepton 5g/l, NaCl 2.5g/l, pH 7.0)에 streaking 한 후, 28℃ incubator에서 3일간 배양하였다.

#### 다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

공배양 배지로는 100μM의 acetosyringone이 포함된 AAM 배지{AAM salts and amino acids(Toriyama and Hinata, 1985), MS vitamins(Murashigs and Skoog, 1962), casamino acid 0.5g/l, sucrose 68.5g/l, glucose 36g/l, pH 5.2}를 사용하였다. 형질전환 당일 왕성히 자란 *Agrobacterium*을 50ml 코닝튜브에 AAM 액체배지를 30ml 채운 후 spatula를 이용하여 OD값 0.5정도의 혼탁액이 되도록 풀어 넣었다. 발아한 식물체의 hypocotyl을 떡잎 밑 약 1cm되는 곳에서 자른 후 양 떡잎 사이로 메스를 넣어 하배측까지 수직으로 자르고 새로 나온 본엽을 제거하였다. 떡잎 기부에서 위로 약 0.5cm와 아래 하배측쪽으로 약 0.1cm 이내의 부위를 scalpel을 이용하여 7-12회 반복하여 상처 내었다. *Agrobacterium*을 희석시킨 AAM 배지에 상

처를 낸 떡잎을 20분간 접종시킨 후 flat side를 배지쪽으로 치상하여 3일 간 24℃에서 암배양시켰다.

#### 라) Wash-out and shoot induction

3일간 공배양 후 *Agrobacterium*의 제균을 위하여 멸균수로 2회 세척한 후 500mg/ℓ의 cefotaxime과 0.05%의 Triton X-100이 포함된 멸균수로 5회 세척하였다. 30ml의 세척 용액을 넣은 50ml 코닝 튜브에 떡잎을 넣었으며, mini 3D-shaker를 이용하여 매회 20분간 상하로 shaking 하였다. 5회 세척된 떡잎은 SI(shoot induction; B5 salt 3.16g/ℓ, BAP 1.67mg/ℓ, sucrose 3%, Agar 0.6%) - ①(cefotaxime 500mg/ℓ, hygromycin 30mg/ℓ) 배지에 치상하여 24℃ 배양실에서 신초발생을 관찰하였다. 그 후 2주 간격으로 SI-②(cefotaxime 200mg/ℓ, hygromycin 10mg/ℓ), SI-③(cefotaxime 100mg/ℓ, hygromycine 10mg/ℓ)로 옮겨 치상하면서 관찰하였다.

#### 마) GUS expression assay

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronie (X-Gluc)을 150μℓ dimethyl formamide에 녹인 후, 850μℓ의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. SI 배지 치상 후 0.5cm 크기로 자란 shoot 및 callus는 절단하여 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37℃ incubator에서 overnight 처리 하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4℃에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

## 4. 결과

각기 다른 세 농도의 agar 배지에 따른 shoot 및 callus 발생은 0.4% 보다는 0.6, 0.8% 농도의 agar 배지에서 높았다. Shoot와 callus의 발생은 두 품종 모두 0.8% 농도의 agar 배지가 가장 효율적이었다. flat side up과 flat side down으로 나누어 SI 배지에 치상한 경우 flat side가 배지에 묻히도록 치상한 경우(down) 떡잎이 위로 향하도록 치상한 경우(up)보다 효율적이었다. 형질전환 효율을 올리기 위해 scalpel과 침(needle)의 비교 실험에서는 shoot발생율에서는 침을 사용한 경우가 좋았고, callus 발생율에서는 scalpel을 사용한 경우가 높았다. Shoot에서의 GUS유전자의 발현율은 은하콩을 재료로 침을 사용하여 flat side를 down으로 치상하였을 때가 가장 높게 나타났고, 그 다음이 소백나물콩을 침



을 가지고 flat side를 down하여 치상하였을 때였다. Callus에서의 GUS유전자의 발현율은 은하콩을 재료로 칩을 사용하여 flat side를 down으로 치상하였을 때, 0.6% agar농도 조건에서 가장 높게 나왔으나, 칩을 사용하였을때에는 그의 조건에서는 전혀 반응을 볼 수 없었고, 품종간에도 차이를 보여, 소백나물콩에서는 2-3개의 조건을 제외하고는 반응을 전혀 보이지 않았다, 전반적으로는 은하콩을 재료로 flat side를 down하여 저농도의 agar 농도에 치상하였을 때 높게 나타났다.

표 3. Agar 농도별 shoot 및 callus 발생수

	0.4%		0.6%		0.8%		Total	
	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus
소백나물콩	0/269 (0.0%)	0/269 (0.0%)	7/608 (1.1%)	2/608 (0.3%)	40/742 (5.4%)	5/742 (0.6%)	47/1619 (2.9%)	7/1619 (0.4%)
은하콩	0/229 (0.0%)	4/229 (1.7%)	11/577 (1.9%)	16/577 (2.7%)	20/537 (3.7%)	5/537 (0.9%)	31/1343 (2.3%)	25/1343 (1.9%)
Total	0/498 (0.0%)	4/498 (0.8%)	18/1185 (1.5%)	18/1185 (1.5%)	60/1279 (4.7%)	10/1279 (0.7%)	78/2962 (2.6%)	32/2962 (1.0%)

표 4. flat side 치상방향 별 shoot 및 callus 발생수

	소백나물콩				은하콩				Total			
	up		down		up		down		up		down	
	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus
0.4%	0/187 (0%)	0/187 (0%)	0/82 (0%)	0/82 (0%)	0/156 (0%)	2/156 (1.3%)	0/83 (0.0%)	2/83 (2.4%)	0/343 (0.0%)	2/343 (0.5%)	0/165 (0.0%)	2/165 (1.2%)
0.6%	0/356 (0%)	0/356 (0%)	7/252 (2.8%)	2/252 (0.7%)	0/331 (0%)	0/331 (0.0%)	11/246 (4.5%)	16/246 (6.5%)	0/687 (0.0%)	0/687 (0.0%)	18/498 (3.6%)	18/498 (3.6%)
0.8%	26/394 (6.6%)	0/394 (0%)	14/348 (4%)	5/348 (1.4%)	8/277 (2.9%)	0/277 (0.0%)	12/260 (4.6%)	5/260 (1.9%)	34/671 (5.1%)	0/671 (0.0%)	26/608 (4.3%)	10/608 (1.6%)
Total	26/937 (2.8%)	0/937 (0%)	21/682 (3.1%)	7/682 (1.0%)	8/764 (1.0%)	2/764 (0.3%)	23/589 (3.9%)	23/586 (3.9%)	34/1701 (2.0%)	2/1701 (0.1%)	44/1271 (3.5%)	30/1271 (2.4%)

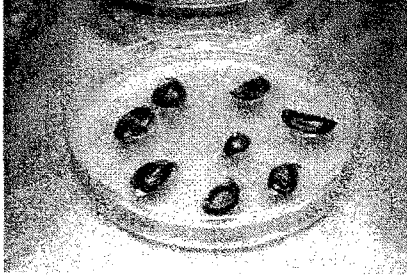
표 5. 상처방법에 따른 shoot 및 callus 발생수

	소백나물콩				은하콩				Total			
	scalpel		needle		scalpel		needle		scalpel		needle	
	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus
0.4%	0/215 (0.0%)	0/215 (0.0%)	0/54 (0.0%)	0/54 (0.0%)	0/177 (0.0%)	4/177 (2.3%)	0/52 (0.0%)	0/52 (0.0%)	0/392 (0.0%)	4/392 (1.0%)	0/106 (0.0%)	0/106 (0.0%)
0.6%	2/382 (0.5%)	2/382 (0.5%)	5/226 (2.2%)	0/226 (0.0%)	5/398 (1.3%)	9/398 (2.3%)	6/178 (3.4%)	7/178 (3.9%)	7/780 (0.9%)	11/780 (1.4%)	11/404 (2.7%)	7/404 (1.7%)
0.8%	19/420 (4.5%)	4/420 (0.9%)	21/322 (6.5%)	1/322 (0.3%)	5/348 (1.4%)	5/348 (1.4%)	15/205 (7.3%)	0/205 (0%)	24/768 (3.1%)	9/768 (1.1%)	36/527 (6.8%)	1/527 (0.2%)
Total	21/1017 (2.1%)	6/1017 (0.6%)	26/602 (4.3%)	1/602 (0.2%)	10/923 (1.1%)	18/923 (2.0%)	21/435 (4.8%)	7/435 (1.6%)	31/1940 (1.6%)	24/1940 (1.2%)	47/1037 (4.5%)	8/1037 (0.8%)

표6. Agar 농도, 치상방향, 상처방법이 shoot, callus, 형질전환효율에 미치는 영향

	scalpel								needle								
	up				down				up				down				
	shoot		callus		shoot		callus		shoot		callus		shoot		callus		
	shoot 발생율	GUS positive	callus 발생율	GUS positive	shoot 발생율	GUS positive	callus 발생율	GUS positive	shoot 발생율	GUS positive	callus 발생율	GUS positive	shoot 발생율	GUS positive	callus 발생율	GUS positiv e	
소 백 나 물 콩	0.4%	0/170 (0%)	0/170 (0%)	0/170 (0%)	0/170 (0%)	0/55 (0%)	0/55 (0%)	0/55 (0%)	0/55 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	
	0.6%	0/243 (0%)	0/243 (0%)	0/243 (0%)	0/243 (0%)	2/139 (%)	2/139 (1%)	2/139 (1%)	2/139 (1%)	0/113 (0%)	0/113 (0%)	0/113 (0%)	0/113 (0%)	5/113 (4%)	5/113 (4%)	0/113 (0%)	0/113 (0%)
	0.8%	15/228 (6%)	1/228 (0%)	0/228 (0%)	0/228 (0%)	4/182 (2%)	2/182 (1%)	4/182 (2%)	2/182 (1%)	11/156 (7%)	3/156 (2%)	0/156 (0%)	0/156 (0%)	10/166 (6%)	1/166 (1%)	1/166 (1%)	1/166 (1%)
은 하 콩	0.4%	0/120 (0%)	0/120 (0%)	2/120 (2%)	2/120 (2%)	0/57 (0%)	0/57 (0%)	2/57 (4%)	2/57 (4%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)
	0.6%	0/242 (0%)	0/242 (0%)	0/242 (0%)	0/242 (0%)	5/156 (3%)	5/156 (3%)	9/156 (6%)	7/156 (4%)	0/89 (0%)	0/89 (0%)	0/89 (0%)	0/89 (0%)	6/89 (7%)	6/89 (0%)	7/89 (8%)	5/89 (6%)
	0.8%	3/174 (2%)	3/174 (2%)	0/174 (0%)	0/174 (0%)	2/158 (1%)	2/158 (1%)	5/158 (3%)	0/158 (0%)	5/103 (5%)	3/103 (3%)	0/103 (0%)	0/103 (0%)	10/102 (10%)	10/102 (10%)	0/102 (0%)	0/102 (0%)

(그림) 치상방향에 따른 재분화 모습

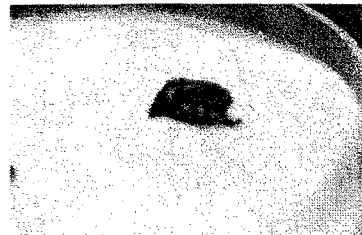
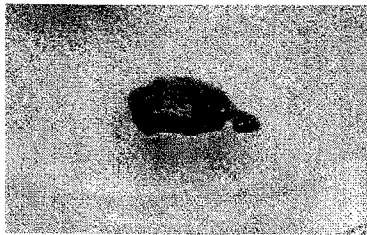


<flat side down>



<flat side up>

(그림) flat side down 에서의 shoot 발생



## 제 4 절 유전자총을 이용한 콩 종자배축(embryonic axes) 형질전환

### 1. 목적

최근 외국에서 지속적인 기술개발로 고빈도의 형질전환효율을 주는 유전자총을 이용한 형질전환 기술개발이 이 실험의 주된 목표이다.

### 2. 재료

본 실험을 위하여 은하콩을 재료로 사용하였다.

### 3. 방법

#### 가) 파종 및 재료준비

종자살균은 앞 실험과 동일하게 준비되었다. 살균된 종자는 50ml falcon tube안에 sterile ddH<sub>2</sub>O에 soaking된 상태로 24시간 보관되었다. 24시간 soaking된 종자들은 clean bench에서 scalpel과 forcep을 사용하여 배축(embryonic axes; 0.5cm in length)이 절단되었고, 절단된 배축은 apical region이 위를 향하도록 MS고체배지에 치상되었다

#### 나) Bombardment preparation

두 개의 plasmid, pCAMBIA1301 과 sGFP DNA를 miniprep kit를 이용하여 추출하였다. 추출한 DNA는 5ug/5ul의 농도로 농축되어 gold particle을 coating하는데 사용되었다. 각각의 DNA를 50ul의 0.6um 크기의 gold particle이 들어있는 0.5ml microfuge tube에 넣은 후, 약 5분간 voltex를 하였다. 또 다른 microfuge tube에 50ul의 2.5M cac<sub>2</sub> 와 20ul의 0.1M spermidine(base-free)을 넣어서 같은 시간동안 voltex를 하다가, 두 tube의 내용물을 mix하여 3-4분간 추가로 voltex를 하였다. 혼합된 시료는 10,000rpm에서 약 10초간 spin down한 후에 상등액을 제거하고, 250ul의 100% ethanol을 첨가하여 particle을 dissolve하였다. 다시 같은 조건으로 원심분리를 한 후에, 상등액을 제거하고, 100ul의 100% ethanol을 첨가하여 particle을 다시 dissolve하였다. 한번의 bombardment를 위하여 10ul의 coating된 particle용액을 macrocarrier에 drop하여 사용하였다.

#### 다) Microprojectile bombardment(PDS1000)

MS고체배지에 치상된 배축에 bombardment를 수행하였다. 준비된 10ul의 coating 된 particle 용액을 macrocarrier에 drop하여 1회 bombardment에 사용하였다. Bombardment의 강도는 1350psi의 rupture disk를 이용하였고, 시료당 2회의 bombardment를 수행하였다. 배축은 chamber내 가장 위칸에 위치시켜 방사각의 최소화와 bombardment의 집중화를 유도하였다.

#### 라) Shoot induction

유전자총을 이용하여 bombardment된 배축들은 24시간동안 배양실에 방치한 후, 하이그로마리신 선발배지(MS배지, hyg 15ppm)에 치상하여 선발 및 재분화를 유도하였다.

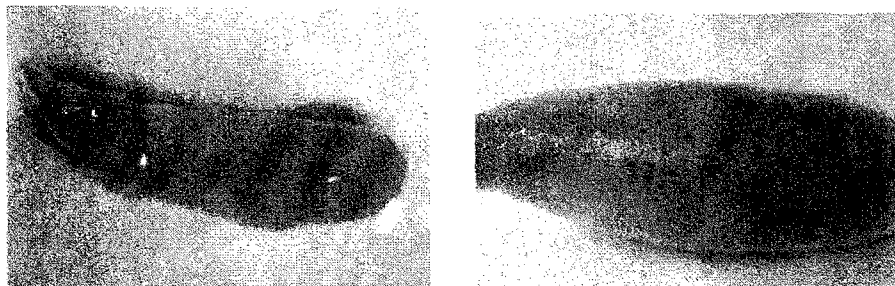
#### 마) GUS 및 GFP expression assay

앞 실험과 동일하게 진행하였으며, bombardment 후, 72시간이 경과된 시료의 일부를 채취하여 도입유전자의 발현분석과 사진촬영을 하였다.

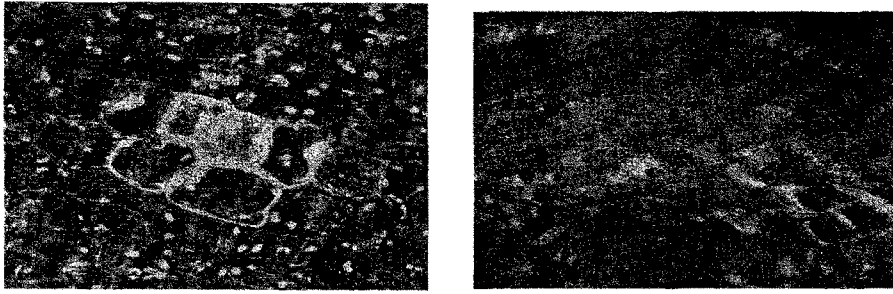
### 4. 결과

도입된 유전자의 발현관찰을 수행하였다. GUS 유전자 발현의 경우, staining 후에 실체현미경을 이용하여 관찰하였고, GFP유전자 발현 확인을 위하여서는 실체현미경과 confocal microscope를 이용하여 유전자의 도입과 형질전환빈도를 조사하였다(아래 그림 참조). 도입 유전자가 확인된 배축들은 재분화배지(MS배지, hyg 15ppm)에 치상하여 현재 식물 재분화를 유도하였으나 식물체를 얻지 못하였다.

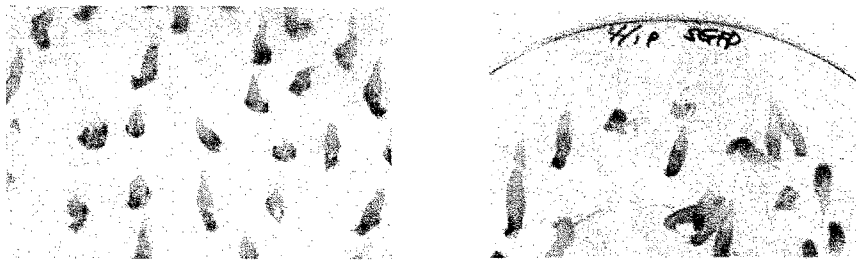
(그림) 콩 배축 GUS 유전자 발현 확인



(그림) 콩 배축 GFP 유전자 발현 확인



(그림) 형질전환 후 재분화 배지 치상



## 제 5 절 호르몬 BA (6-Benzylaminopurin) 전처리가 형질 전환 효율증대에 미치는 영향 (고체선발배지사용)

### 1. 목적

본 실험에 앞서 진행된 실험의 콩 형질전환 최적 조건(선발 항생제 hygromycin 농도:10ppm, agar 농도: 0.4%, 침을 이용한 상처방법 등)을 바탕으로 하여 호르몬(BA)의 전처리가 형질전환 효율증대에 미치는 영향을 알아보려고 실험이 진행되었다.

### 2. 재료

본 실험을 위하여서 식물재료로는 은하콩을 사용하였고 아그로박테리움 : pTOK233/LBA4404를 사용하였다.

### 3. 방법

#### 가) 파종

종자는 70% ethanol에 30초간 담궈 1차 표면살균을 하고 1% sodium hypochloride에 30분간 shaking 하면서 소독한 후, 10분 간격으로 멸균수로 3회 수세하였다. 멸균된 Petri-dish에 파종 후 24℃ 배양실에서 16시간 광조건과 8시간 암조건으로 5일간 발아시켰다.

#### 나) *Agrobacterium* preparation

콩의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 supervector pTOK233을 가지고 있는 LBA4404를 사용하였다. *Agrobacterium*은 형질전환 3일 전 hygromycin 50mg/l이 포함된 고체 YEP 배지(yeast 5g/l, pepton 5g/l, NaCl 2.5g/l, pH 7.0)에 streaking 한 후, 28℃ incubator에서 3일간 배양하였다.

#### 다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

공배양 배지로는 100μM의 acetosyringone이 포함된 AAM 배지{AAM salts and amino acids(Toriyama and Hinata, 1985), MS vitamins(Murashigs and Skoog, 1962), casamino acid 0.5g/l, sucrose 68.5g/l, glucose 36g/l, pH 5.2}를 사용하였다. 전처리를 위한 호르몬은 준비된 AAM 배지에 BA 5, 10ppm, TDZ 2, 5ppm의 농도로 첨가되었다. 형질전환 당일 왕성히 자란 *Agrobacterium*을 50ml 코닝튜브에 호르몬이 든 AAM 액체배지를 30ml 채운 후 spatula를 이용하여 OD값 0.5정도의 혼탁액이 되도록 풀어 넣었다. *Agrobacterium*이 고르게 풀어지면 멸균 petri-여노에 10ml의 양을 부어 petri-dish에 얇게 깔리도록 준비해 두었다. 발아한 식물체의

hypocotyl을 떡잎 밑 약 1cm되는 곳에서 자른 후 양 떡잎 사이로 메스를 넣어 하배축까지 수직으로 자르고 새로 나온 본엽을 제거하였다. 떡잎 기부에서 위로 약 0.5 cm와 아래 하배축쪽으로 약 0.1cm 이내의 부위를 needle을 이용하여 7-12회 반복하여 상처 내었다. *Agrobacterium*을 희석시킨 AAM 배지에 상처를 낸 떡잎을 flat side를 배지쪽으로 치상하여 3일 간 24℃에서 암배양시켰다.

#### 라) Wash-out and shoot induction

3일간 공배양 후 *Agrobacterium*의 제균을 위하여 멸균수로 2회 세척한 후 500mg/ℓ의 Timentin과 0.05%의 Triton X-100이 포함된 멸균수로 5-6회 세척하였다. 30 ml의 세척 용액을 넣은 50ml 코닝 튜브에 떡잎을 넣었으며, mini 3D-shaker를 이용하여 매회 20분간 상하로 shaking 하였다. 5회 세척된 떡잎은 SI(shoot induction; B5 salt 3.16g/ℓ, BAP 1.67mg/ℓ, sucrose 3%, Agar 0.6%)-①(cefotaxime 500mg/ℓ, hygromycin 10mg/ℓ) 배지에 치상하여 24℃ 배양실에서 신초발생을 관찰하였다. 그후 2주 간격으로 SI-②(cefotaxime 200mg/ℓ, hygromycin 10mg/ℓ), SI-③(cefotaxime 100mg/ℓ, hygromycine 10mg/ℓ)로 옮겨 치상하면서 관찰하였다.

#### 마) GUS expression assay

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronie (X-Gluc)을 150 $\mu$ l dimethyl formamide에 녹인 후, 850 $\mu$ l의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. SI 배지 치상 후 0.5cm 크기로 자란 shoot 및 callus는 절단하여 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37℃ incubator에서 overnight 처리 하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4℃에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

## 4. 결과

호르몬 전처리 후 shoot의 발생율은 BA 5, 10ppm의 농도 중 BA 10ppm의 농도에서 더 양호한 결과를 보였다. 이와 관련하여 GUS positive 역시 BA 10ppm의 호르몬 농도에서 9.9%로 BA 5ppm의 농도보다 양호하였다. 호르몬을 처리하지 않은 control구와 비교 결과에 있어서는 호르몬을 처리하지 않은 경우 shoot 발생 및 GUS positive 의 퍼센트가 높은 것을 알 수 있다. 그러나 GUS의 발현정도가 호르몬 처리에 비해 아주 약하게 나타



났고 후에 shoot elongation 배지에서 모두 고사하는 경향을 보였다(아래 그림 참조).

표1. 고체배지선발배지에서의 호르몬(BA)처리가 신초형성 및 형질전환에 미치는 영향

Eunha	BA 0	BA 5ppm	BA 10ppm
Shoot Formation	268/1472 (18.2%)	174/1505 (11.6)	211/1554 (13.6%)
GUS positive/Shoot	191/268 (71.3%)	127/174 (73.0%)	154/211 (73.0%)
GUS/Total	191/1472 (13%)	127/1505 (8.4%)	154/1554 (10%)



(1)

(2)

(3)

(4)

그림1. 무처리 및 호르몬 처리 후의 GUS 발현 비교;(1), (2) 무처리의 GUS발현;(3) 호르몬 처리 후의 GUS발현;(4) 무처리와 호르몬 처리의 비교

## 제 6 절 호르몬 BA (*6-Benzylaminopurin*) 전처리 후, hygromycin 농도가 형질전환 효율에 미치는 영향 (고체선택 배지사용)

### 1. 목적

호르몬 전처리 후, SI 배지(고체배지)에 선발 항생제 hygromycin의 농도를 각기 달리 하여 선발항생제 농도에 따른 형질전환 효율증대를 알아보하고자 실험이 진행되었다.

### 2. 재료

식물재료로는 은하콩이 사용되었으며 아그로박테리움은 pTOK233/LBA4404가 사용되었다.

### 3. 방법

#### 가) 파종

앞 실험과 동일함

#### 나) *Agrobacterium* preparation

앞 실험과 동일함

#### 다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

앞 실험과 동일함

#### 라) Wash-out and shoot induction

세척의 방법은 앞 실험과 동일하며, SI 배지에 각각 hygromycin 농도(5, 10, 20ppm)를 각각 달리 첨가하여 3종류의 SI 배지를 준비하였다. SI-① 배지에 치상한 후, 2주간격으로 hygromycin 농도를 5, 10, 20ppm으로 달리한 SI-②와 SI-③배지에 옮겨주어 호르몬 전처리 후 hygromycin의 최적농도를 규명하였다.

#### 마) GUS expression assay

앞 실험과 동일함

### 4. 결과

#### 가) 형질전환 후shoot 및 callus 발생

형질전환 후 hygromycin 농도에 따른 shoot 발생은 BA 전처리 후 hygromycin 5ppm 첨가 배지에서 양호하였다. BA 전처리와 무관하여 hygromycin 20ppm의 고농도에서의 shoot 발생율은 2.3-0.0%로 매우 낮았다. BA 10ppm 전처리의 경우 hygromycin 5, 10ppm 두 농도에 따른 shoot 발생율(10.4-20.0%)은 BA 5ppm 처리

의 경우(10.6-16.3%)보다 확연한 차이를 보였는데, hygromycin 10ppm 첨가배지에서 shoot발생이 2배로 매우 양호하였다. 은하콩 형질전환 후 hygromycin 농도에 따른 callus 발생은 hygromycin 농도가 낮은 5ppm에서 가장 양호하였고, BA 전처리 후 hygromycin 20ppm의 농도에서는 callus가 전혀 발생치 않았다. Callus 발생의 경우 역시 shoot 발생과 관련하여 BA 10ppm 전처리의 경우가 양호하였다. BA 5ppm 전처리 후 callus 발생은 전처리 후 hygromycin 농도별 차이가 크지 않았으나 BA 10ppm 전처리 후 hygromycin 농도별 callus 발생은 확연한 차이가 있었다.

나) BA 전처리 후 은하콩의 형질전환 빈도 측정(GUS분석)

BA 전처리후 hygromycin 농도별 GUS 발현은 shoot 발생율과 관련하여 shoot 발생율이 양호한 hygromycin 5ppm 농도에서 높은 빈도의 GUS 발현을 보였다. BA 전처리 농도별 GUS 발현은 BA 10ppm 전처리의 경우 GUS 발현율이 높았다.

다) 발생한 shoot 중 GUS 발현의 빈도

발생한 shoot 중 GUS 발현(GUS 발현/shoot 발생)의 빈도는 BA 5ppm의 경우가 가장 균등하게 나타남을 볼 수 있다. 가장 형질전환의 효율이 높은 처리구는 BA 10ppm 처리 후 hygromycin 10ppm의 배지에 치상한 경우가 77.3%로 나타났다. shoot 발생의 경우는 hygromycin 5ppm 농도의 배지에서 가장 효율이 높았으나 control구를 비롯하여 호르몬 처리구 모두에서 형질전환 효율은 선발항생제 적정농도인 hygromycin 10ppm의 농도임이 밝혀졌다. 호르몬 무처리구의 경우, 첫 번째 실험에서처럼 GUS발현정도가 매우 약하게 나타났고, 하이그로마이신 10ppm을 포함한 shoot elongation 배지에서 모두 고사하는 경향을 보였다.

표1. 고체선발배지에서 호르몬 BA (6-Bensylaminopurin) 전처리 후, hygromycin 농도가 형질전환 효율에 미치는 영향

		(단위:ppm)								
		BA 0			BA 5			BA 10		
		hyg5	hyg10	hyg20	hyg5	hyg10	hyg20	hyg5	hyg10	hyg20
Shoot	Formation	160/614 (26.0%)	108/628 (17.2%)	0/230 (0.0%)	106/653 (16.2%)	67/633 (10.6%)	1/219 (0.5%)	140/699 (20.0%)	66/637 (10.4%)	5/218 (2.3%)
GUS	pos/Shoot	109/160 (68.1%)	82/108 (75.9%)	0/0 (0.0%)	78/106 (73.6%)	51/67 (76.1%)	1/1 (100%)	96/140 (69%)	53/66 (80%)	5/5 (100%)

## 제 7 절 호르몬 BA(6-Benzylaminopurin) 전처리 후 치상방향에 따른 형질전환 효율비교 (고체선택배지사용)

### 1. 목적

호르몬 전처리 후 SI 배지에 치상 할 경우 flat side를 up 또는 down으로 나누어 치상했을 경우 shoot의 발생 및 효율증대에 관하여 알아보하고자 수행하였다.

### 2. 재료

본 실험을 위하여 식물재료는 은하콩을 사용하였고 아그로박테리움은 pTOK233/LBA4404를 사용하였다.

### 3. 방법

#### 가) 파종

앞 실험과 동일함

#### 나) *Agrobacterium* preparation

앞 실험과 동일함

#### 다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

앞 실험과 동일함

#### 라) Wash-out and shoot induction

세척의 방법은 앞 실험과 동일하며, SI-① 배지에 flat side를 up과 down으로 나누어 치상한 후 2주간격으로 SI-②와 SI-③배지에 옮겨주어 호르몬 전처리 후 치상방향방향에 따른 생육정도를 비교하고자 하였다.

#### 마) GUS expression assay

앞 실험과 동일함

### 4. 결과

BA 호르몬 전처리 후 치상 방향별 shoot의 발생율은 BA 10ppm 처리의 경우를 제외하고 flat side를 up으로 치상한 경우가 down으로 치상한 경우보다 양호하였다. BA 10ppm 처리 후의 shoot 발생은 다른 두 경우와 다른 양상을 보였는데 flat side를 down으로 치상한 경우 더 발생이 양호하였다. Shoot 발생과 관련하여 GUS 발현 역시 flat side를 up

으로 치상한 경우 양호하였는데 BA 10ppm 처리의 경우만 반대의 양상을 보였다. 발생한 shoot 중 GUS 발현율을 비교해 보면 모든 처리구의 경우 flat side down으로 치상한 경우가 양호하여 flat side down의 치상방법이 호르몬 전처리 후에도 형질전환 효율증대에 효과가 있음을 보여주었다. GUS발현의 세기와 생존율에 있어서는 앞의 두 실험결과와 마찬가지로 무처리구에서는 약한 발현과 생존율 0을 나타내어 호르몬 처리가 형질전환의 장기적 선발에 큰 영향을 미침을 알 수 있었다.

표1. 호르몬 전처리후, 치상방향이 형질전환에 미치는 영향 (단위:ppm)

	BA 0		BA 5		BA 10	
	flat side up	flat side down	flat side up	flat side down	flat side up	flat side down
shoot formation	130/503 (25.8%)	138/739 (18.7%)	102/536 (19.0%)	71/759 (9.4%)	88/635 (13.9%)	118/701 (16.8%)
GUS positive/Shoot	87/130 (66.9%)	104/138 (75.4%)	72/102 (70.6%)	54/71 (76.1%)	58/88 (65.9%)	91/118 (77.1%)

## 제 8 절 호르몬 전처리 후 액체배양의 선발효과

### 1. 목적

전처리 후 액체 진탕 배양이 형질전환체 선발에 보다 효과가 있을 것으로 판단하여 호르몬 전처리 후 액체 배양의 선발 효과를 알아보려고 실험이 진행되었다.

### 2. 재료

본 연구를 위하여 식물재료는 은하콩을 사용하였고 아그로박테리움은 pH11/EHA105를 사용하였다.

### 3. 방법

#### 가) 파종

앞 실험과 동일함

#### 나) *Agrobacterium* preparation

준비된 *Agrobacterium*을 형질전환 3일전 kanamycin75mg/L+rifampicin 25mg/L이 포함된 고체 YEP 배지에 streaking 한 후 28℃ incubator에서 3일간 배양하였다.

#### 다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

공배양 배지는 100μM acetosyringone이 포함된 AAM배지, AAM+BA 5ppm, AAM+BA 10ppm, AAM+TDZ 2ppm, AAM+TDZ 5ppm의 배지를 준비하였다.

공배양 배지외의 실험방법은 앞 실험과 동일함

#### 라) Wash-out and shoot induction

멸균수로 2회 세척한 후 500ml/L의 Timentin과 0.05%의 Triton X-100이 포함된 멸균수로 20분 간격으로 5회 세척하였다. Liquid 선발배지인 Shoot induction 배지는 SI-①(SI+cefotaxime 100ppm+timentin 100ppm+hygromycin 10ppm), SI-②(SI+cefotaxime 100ppm+timentin 50ppm+hygromycin 10ppm)의 두종류 배지를 사용하였는데, liquid SI 배지는 100ml 삼각플라스크에 20ml씩 나누어 분주하여 사용하였다. 수세한 떡잎은 SI-① liquid배지에 10개씩 나누어 치상한 후 24℃ 배양실에서 110rpm으로 18시간 광조건과 8시간 암조건으로 생육시켰다. 2주 후 SI-② 배지로 이식하고 shoot는 SE배지로 이식하거나 GUS 분석하였다.

#### 마) GUS expression assay

## 앞 실험과 동일함

### 4. 결과

BA, TDZ 전처리 후 shoot 및 callus 발생과 형질전환 빈도측정의 결과 BA, TDZ 전처리 후 shoot 발생은 BA 5ppm의 농도가 BA 10ppm의 농도보다 양호하였고 TDZ 역시 2ppm의 농도에서 TDZ 5ppm의 농도보다 shoot 발생이 양호하여 고농도의 호르몬 처리보다는 적정량의 호르몬 처리가 양호함을 보여주었다. BA, TDZ 전처리 후 callus 발생은 BA 5ppm의 농도에서는 비교적 양호하였으나 10ppm의 농도에서는 callus가 발생치 않았고, TDZ 처리에서는 두농도 모두에서 callus가 발생치 않아 BA 전처리의 결과와는 다소 차이를 보였다. BA와 TDZ 전처리 후 shoot 발생은 TDZ 2ppm의 농도에서 가장 양호하였고 callus는 BA 5ppm에서만 발생하였다. Shoot 발생은 호르몬을 처리하지 않은 경우 더 양호하였으나 callus의 발생은 호르몬 처리가 보다 양호하였고, 발생한 shoot의 size 및 상태가 호르몬의 처리에서 확연한 차이를 보이며 양호하였다. BA, TDZ 각 농도별 GUS 분석결과 shoot 발생과 연관하여 BA 5ppm, TDZ 2ppm 농도에서 GUS 발현이 양호하였고 BA 5ppm에서의 callus는 GUS 분석결과 발현빈도가 양호하였다. TDZ 2ppm의 농도에서 shoot 발생율은 가장 양호하였으나 GUS 발현의 경우 호르몬 전처리 모든 구에서 크게 차이를 보이지 않고 호르몬 처리의 결과 발생한 대부분의 shoot에서 GUS 발현을 보여 호르몬 전처리가 효과가 있음을 보여주었다. 발생한 shoot중 GUS 발현은 호르몬 처리의 경우가 양호하였으며 호르몬 처리의 결과 강한 GUS 발현을 보여 액체배양이 초기 선발에 효과가 있음을 나타내었다. 이 실험의 결과 호르몬 전처리 후에, 액체선발배지에서 선발을 할 경우 형질전환과 생존율을 크게 증가시키는 것에 착안하여 이 과정에 관한 특허가 출원중이다.

표1. 전처리 후 액체배양이 형질전환체 선발에 미치는 영향

Eunha	Cont	BA		TDZ		
		5ppm	10ppm	2ppm	5ppm	
Shoot	Formation	47/368 (12.8%)	20/350 (5.7%)	19/345 (5.5%)	23/384 (6.5%)	20/368 (5.4%)
	GUS positive	21/368 (5.0%)	16/350 (4.6%)	15/345 (4.3%)	18/348 (4.7%)	17/368 (4.6%)
GUS positive/Shoot		21/47 (44.0%)	16/20 (80%)	15/19 (78.0%)	18/23 (78.0%)	17/20 (85.0%)

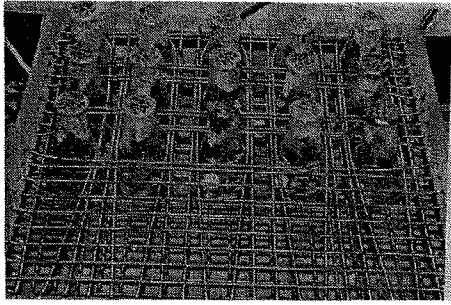


그림. 형질전환효율증진을 위한 액체배지 선발

## 제 9 절 호르몬 전처리 와 liquid배지 선발이 형질전환체의 생존율에 미치는 영향

### 1. 목적

호르몬 전처리와 liquid 배지에서의 선발이 형질전환체가 항생제배지에서 고사하지 않고 끝까지 생존하는데 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험을 수행하였다.

### 2. 재료

본 실험의 식물재료로는 은하콩을 사용하였으며 아그로박테리움은 pTOK233/LBA4404를 사용하였다.

### 3. 방법

#### 가) 파종

앞 실험과 동일함

#### 나) *Agrobacterium* preparation

앞 실험과 동일함

#### 다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

앞 실험과 동일함

#### 라) Wash-out and shoot induction

앞 실험과 동일함.



마) 생존율 분석

장기간 항생제 하이그로마이신 10ppm을 포함한 재분화배지에 형질전환 신초들을 치상하여 생존여부를 조사하였다.

4. 결과

이미 앞의 연속된 실험에서 설명한 바와 같이 식물체의 호르몬 처리는 선발초기에는 형질전환빈도에서 무처리와 별 차이가 없이 나타났으나 항생제 선발배지에서의 계속된 선발에는 무처리에 비해 월등히 높은 생존율을 나타내 보였다. 특히 호르몬 처리없이 액체 선발배지를 이용하여 4주간 선발을 하였을 때는 모두 고사함을 관찰하였다.

표1. 무처리와 호르몬 처리가 형질전환체 생존율에 미치는 영향

Control		hormone treated	
Agar	Liquid	Agar	Liquid
3/30	-	15/46	41/130
(10%)	(0%)	(33%)	(32%)

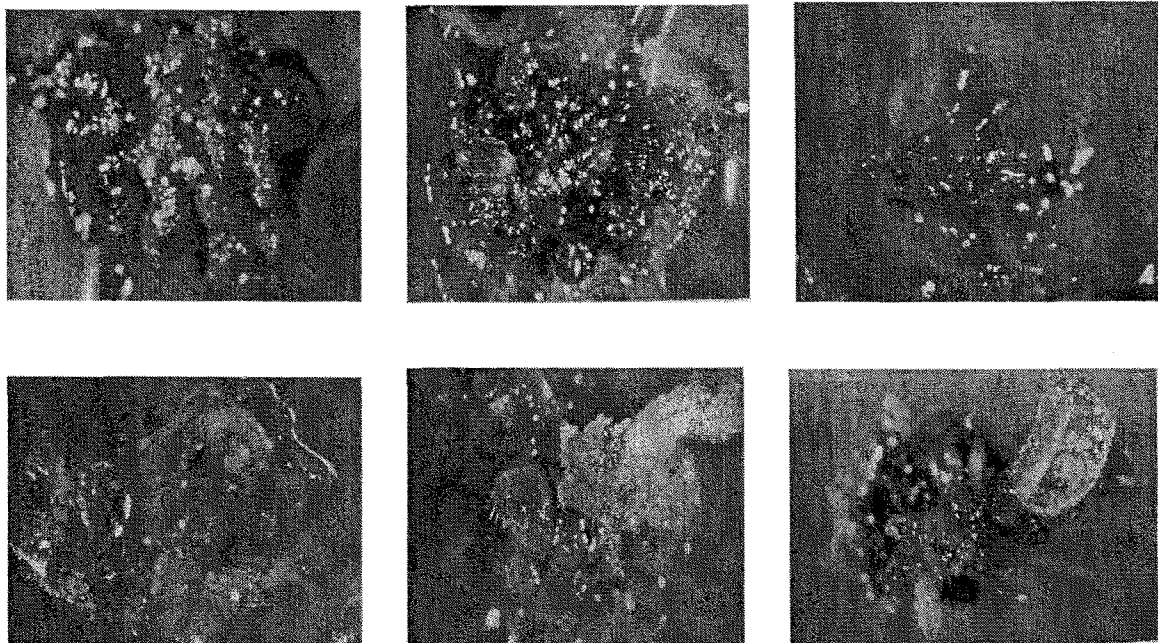


그림1. 호르몬처리와 액체항생제배지의 선발을 통해 살아남은 다양한 콩 형질전환계통들의 모습

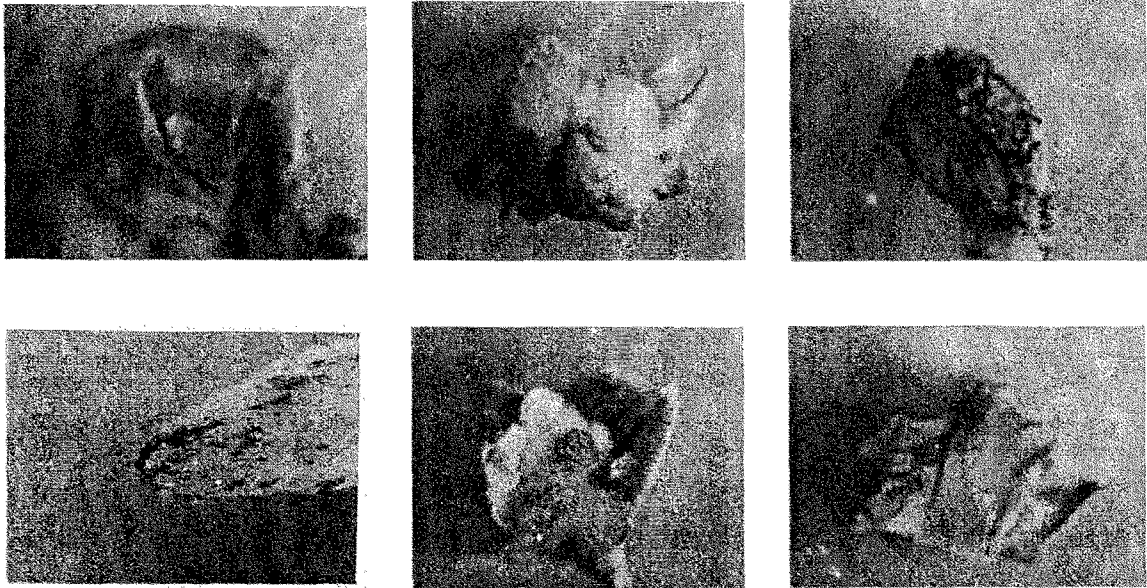


그림2. 호르몬처리 및 액체항생제배지 선발 후, 재분화체에 대한 GUS 분석

## 제 10 절 공배양시 황화합물첨가가 콩 형질전환에 미치는 영향

### 1. 목적

최근에 보고 된 황화물의 첨가가 초기 콩 형질전환에 미치는 영향에 대해 알아보고, 현재 까지 진행되어온 본 실험실의 콩 형질전환법과의 비교실험으로 보다 높은 고효율의 형질 전환체 선발방법을 구명하고자 본 실험을 수행하였다.

### 2. 재료

본 연구를 위하여 식물재료로는 은하콩을 사용하였고 아그로박테리움은 pTOK233/LBA4404를 사용하였다.

### 3. 방법

#### 가) 파종

70% ethanol 표면살균 후 12N HCl 3.5ml과 5.25% sodium hypochlorite 100ml의 혼용액이 든 데시게이터에 24시간 소독한 후 멸균된 petri-dish에 파종 후 24℃ 배양실에서 16시간 광조건과 8시간 암조건으로 생육시켰다.

#### 나) *Agrobacterium* preparation

앞 실험과 동일함

#### 다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

형질전환 당일 왕성히 자란 *Agrobacterium*을 공배양 배지가 첨가된 50ml 코닝튜브에 OD값 0.5정도의 혼탁액이 되도록 풀어 준비한 뒤 위 실험과 동일한 방법으로 접종 한 뒤 *Agrobacterium*을 희석시킨 AAM 배지에 상처낸 떡잎을 넣고 3D-shaker를 이용하여 상하로 20분간 shaking 한 후 고체 CCM 배지에 flat side를 아래로 하여 3일간 24℃에서 암배양하였다(Co-cultivation medium: 배지조성표 참고).

#### 라) Wash-out and shoot induction

o 실험실방법

전 실험에서 언급된 것과 같이 수행되었다.

o 미네소타 대학 방법

수세한 떡잎은 hygromycin이 첨가되지 않은 SI-①배지에 10개씩 나누어 flat side up으로 치상한 후 24℃ 배양실에서 18시간 광조건과 8시간 암조건으로 14일간 생육시켰다. 2주 후 hygromycin 5ppm이 첨가된 SI-②배지로 hypocotyl을 제거하여 이식한 후 SI-①배지에서의 생육조건과 동일하게 14일간 생육시켰다. 치상 28일째 cotyledon과 callus를 제거한 후 hygromycin 10ppm이 포함된 SE 배지로 이식하여 shoot를 성장시켰다. 4cm 이상 shoot가 자라면 root medium으로 이식시킨 후 식물체 관찰하였다.

#### 마) 신초형성을 및 GUS expression assay

형질전환 효율 검정을 위해 신초형성을 조사하였고, 특히 후기에 재분화되어 나오는 신초들을 대상으로 GUS 발색 반응을 수행할 예정이다.

#### 바) Genomic DNA 추출

잠정적인 형질전환체들의 잎을 1g 정량한 후 액체질소로 얼리고 막자사발에 액체질소를 부어 사발을 차갑게 만든 후, 얼린 잎을 넣고 곱게 갈아 주었다. DNA extract

Buffer [7M urea(210g/500ml), 0.3M NaCl(30ml/5M stock 500ml)] 를 6ml 첨가하여 잘 섞어 준 후, phenol/chloroform 6ml을 첨가하고 천천히 뒤집으면서 완전히 섞어 주었다. 12000rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상층액을 따서 새 tube에 옮겨주었다. 동일 volume의 chloroform첨가 후, 천천히 뒤집으며 섞고, 12000rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액을 따서 새 tube에 옮겨주었다. 1ml의 4.4M ammonium acetate(pH5.2)를 넣고, 2배 부피의 에탄올을 첨가한 후, 잘 교반하여, 냉동고에서 20분 이상 보관하였다. 12000rpm으로 15분간 원심분리하여 pellet을 모으고, 상층액을 버린 후, pellet을 10분간 말렸다. TE buffer 0.5ml에 녹이고, RNase 1 $\mu$ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에 1시간동안 처리하였다. 처리 후, phenol/chloroform 0.5ml을 넣고 천천히 섞어 주었다. 용액을 12000rpm으로 10분간 원심분리 하였고 상층액을 따서 새 tube에 옮긴 후, 동일 volume의 chloroform첨가하여 서서히 교반을 진행하였다. 다시 12000rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상층액에 1/10 volume의 sodium acetate와 1ml의 100% ethanol을 넣어 냉동고에 20분 이상 보관하였다. 12000rpm으로 15분간 원심분리하여 DNA를 pellet화 한다음 TE buffer 50 $\mu$ l에 DNA를 녹였다. 최종적으로 흡광도를 측정하여 DNA의 양을 측정하여 southern을 실시하였다.

#### 사) PCR 및 Northern 분석

유전자의 도입여부를 알아보기 위하여 Hyg 유전자의 sequence를 이용하여 PCR primer를 합성하였다. 작성한 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 먼저 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 denature를 하고, 다시 denature를 위하여 94 $^{\circ}$ C에서 45초, annealing을 위하여 55 $^{\circ}$ C에서 45초, extention 72 $^{\circ}$ C 1분 30초 처리한 과정을 35회 반복한 후, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 처리하였다. 또한 도입유전자의 발현 여부를 알아보기 위하여 잠정적인 형질전환체로부터 RNA를 추출하였고 Northern blotting을 하였다. ERNA 추출을 위하여 SOL D(4M guanidinium thiocyanate 23.63g, 25mM sodium citrate pH7.0 1.67ml of 0.75M, 0.5% sarcosyl 2.5ml of 10%, DEPC-treated water up to make 50ml) 10ml/g와  $\beta$ -2-Mercaptoethanol 75 $\mu$ l를 넣은 50ml짜리 tube에 시료 1g을 액체질소를 부어가며 곱게 갈아 넣어 vortex하여 실온에 10~15분 둔 후, 2M Sodium acetate(pH 4.0)를 0.1 volume(1ml)을 넣었다. 그 후, phenol (water saturated)을 1 volume(10ml)을 넣고, chloroform/isoamyl alcohol (49:1)을 0.2 volume(2ml)을 넣고, 1분동안 inversion하여 ice에 15분간 처리한 후, 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm으로 20분간 centrifuge하였다. centrifuge를 한 후 상층액을 따서 새 tube에 옮기고 chloroform/isoamyl alcohol (49:1)을 상층액의 0.5~1 volume의 양만큼 넣고 1분동안 inversion하였다. 그 후 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm으로 20분간 한번 더 centrifuge하였다. Centrifuge를 한 후 상층액을 따서 새 tube에 옮기고, 1 volume의 isopropanol을 넣

고 inversion하여 고루 섞어서  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 처리하였다. 그 후,  $4^{\circ}\text{C}$ , 12000rpm으로 20분간 centrifuge하였다. centrifuge를 한 후 상층액을 버리고 RNA를 모아서  $750\mu\text{l}$ 의 solution D(or DEPC water)를 넣어 pellet을 녹였다. Isopropanol을 동일 volume으로 넣은뒤  $4^{\circ}\text{C}$ , 1200rpm에서 15분간 centrifuge하였다. 상등액을 버리고, 70% ethanol을 1ml 넣고  $4^{\circ}\text{C}$ , 8000rpm에서 10분간 centrifuge하여, 70% ethanol을 버리고 깨끗이 말렸다. 그후, DEPC - treated water를  $500\mu\text{l}$  넣고 잘 녹인 뒤 정량한 뒤 membrane을 만들어 northern blot을 실시하였다. Nylon membrane을 만들었으며 그 방법은 다음과 같다.

전기영동한 젤을 필요한 만큼 잘라서 nylon membrane은 transfer 용액에 5분 담귀서 downward alkaline transfer방법으로 설치한 후 overnight동안 transfer하였다. 그 후, Neutralization용액에 10분간 처리한 후, 10분간 건조시켜 UV처리하였다.

Northern에 필요한 probe를 만들기 위해 Hyg유전자를 PCR하여 Accuprep<sup>®</sup> Gel Purification Kit(Bioneer)를 사용하여 elution하였다. PCR 조건은 denaturation  $94^{\circ}\text{C}$  45초, annealing  $55^{\circ}\text{C}$  45초, extention  $72^{\circ}\text{C}$  1분 30초 처리한 과정을 35회 반복하였으며 1% agarose gel을 만들어 전기영동한 결과 적절한 사이즈의 밴드가 나타났다.

#### 4. 결과

미네소타 대학의 실험방법으로 실험한 결과 초기에 hygromycin에 의한 선발이 이루어지지 않아 실험실방법(아래 도표 참조)으로 실험한 결과보다 많은 수의 shoot가 발생하였는데 두 방법의 경우 모두 Shoot 발생 후 SE 배지로 이식한 후 shoot/callus pad가 다수 발생하였다. Hygromycin 선발이 이루어지는 SE 배지 이식 후 초반에 발생한 shoot는 대부분 죽어가고 새로운 shoot/callus pad가 왕성히 자라는 것이 현미경으로 관찰되었다. 현미경 관찰 결과 shoot의 발생 및 형질전환 여부를 관찰할 수 있었는데 형질전환 되지 않은 경우의 shoot는 hygromycin이 첨가된 배지에 바로 접촉하지 않은 채 성장하는 것을 볼 수 있었다. 현재 이들 후기에 발생하는 shoot 들에 대한 GUS 분석이 수행중이고, 두 가지 방법의 비교 실험이 계속 진행중이며 실험의 결과를 현미경을 통하여 매일관찰하고 있다. 아래는 현재 실험실에서 사용중인 황화합물을 첨가하는 방법으로 변형된 실험실 형질전환방법이다. 유전자의 도입여부를 T0 세대에서 알아보기 위하여 genomic DNA를 추출하였고

## Soybean Transformation by modified lab protocol

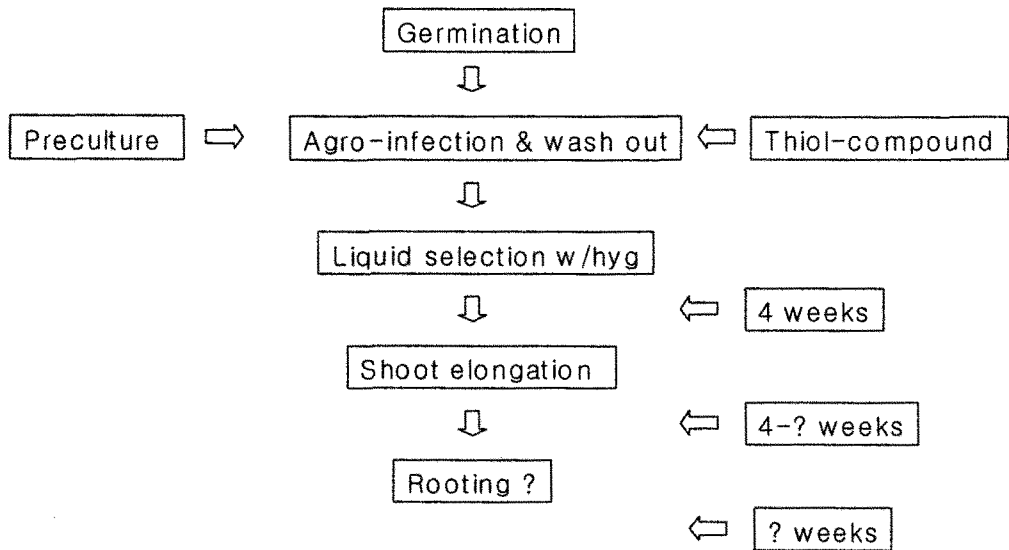


표1. 실험실 방법과 미네소타 방법으로 형질전환한 개체들의 신초형성을 비교

	Minnesota	Lab. Proto
Shoot formation	200/778 (25.7%)	87/590 (14.7%)

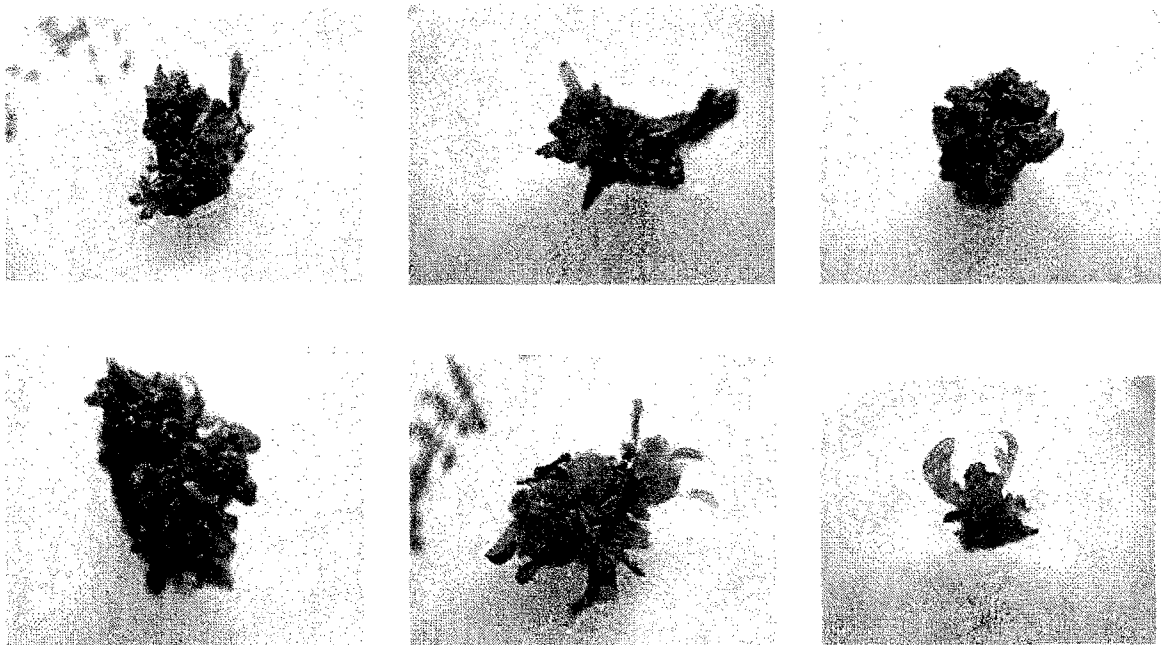


그림1. 황화물첨가방법에 의해 만들어진 잠정적인 형질전환체들의 모습

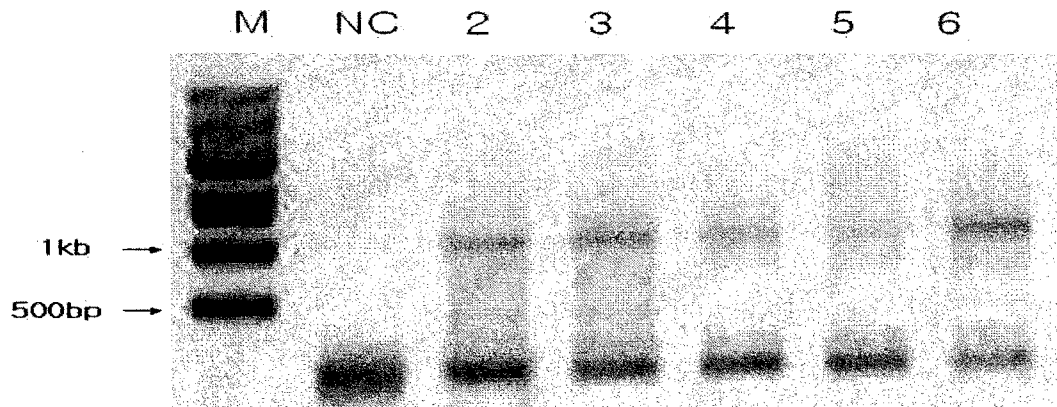


그림2. 잠정적인 형질전환체로부터 도입 유전자의 PCR 확인



그림3. 잠정적인 형질전환체들에 대한 GUS 유전자 발현 검정

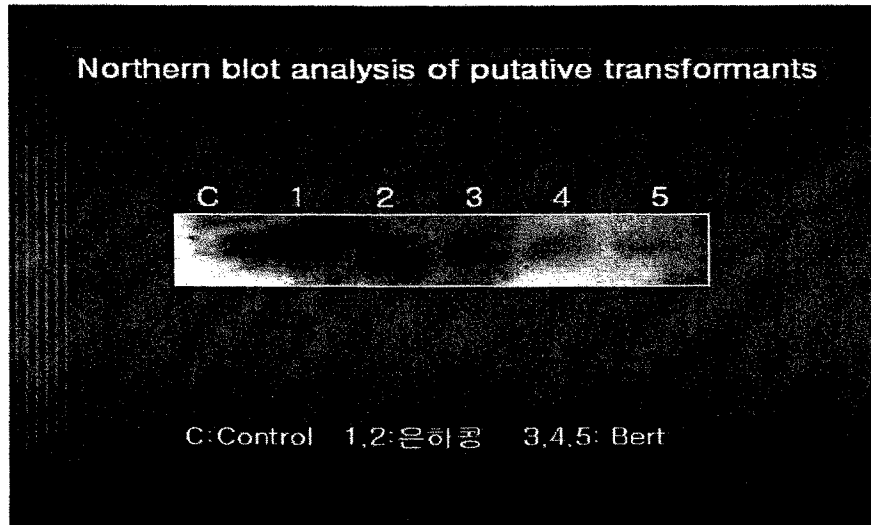


그림4. Northern 분석을 통한 잠정적인 형질전환체에 대한 도입 유전자 발현 검정



## 제 4 장 목표달성도 및 관련 분야에의 기여도

### 1. 연도별 연구목표

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	예상 결과물
1차년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶국내 콩 형질전환 순응형 유전자형 스크린</li> <li>▶새로운 고효율 콩 형질전환 기초 기술 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-형질전환 순응형 유전자형 선발 (5개/년)</li> <li>-새로운 콩 형질전환 기초기술 개발; 전처리기술을 이용한 효율 증대</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-형질전환순응 품종선발(5개이상)</li> <li>-고효율형질전환 기초기술</li> </ul>
2차년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶국내 콩 형질전환 순응형 유전자형 스크린</li> <li>▶새로운 고효율 콩 형질전환 기술 개발</li> <li>▶형질전환체 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-형질전환 순응형 유전자형 선발 (5개/년)</li> <li>-새로운 고효율 콩 형질전환 기초 기술 개발; 전처리기술을 이용한 효율 증대 (5%이상)</li> <li>-형질전환체 분석 및 후대 검정</li> <li>-형태적, 생리적, 생화학적 변이 관찰</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-형질전환순응 품종선발(5개이상)</li> <li>-고효율 형질전환기술개발(5%)</li> <li>-형질전환체(50계통 이상)</li> <li>-논문발표</li> </ul>
3차년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶국내 콩 형질전환 순응형 유전자형 스크린</li> <li>▶새로운 고효율 콩 형질전환 기술 개발</li> <li>▶형질전환효율 비교 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-형질전환 순응형 유전자형 선발 (5개/년)</li> <li>-새로운 고효율 콩 형질전환 기초 기술 개발; 전처리기술을 이용한 효율 증대(5%이상)</li> <li>-형질전환체 분석 및 후대 검정</li> <li>-형태적, 생리적, 생화학적 변이 관찰</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-형질전환순응 품종선발(5개이상)</li> <li>-고효율 형질전환기술개발(5%)</li> <li>-논문발표 및 특허등록</li> </ul>

## 2. 연구추진 실적

구 분	연구개발 세부목표	추진 실적	달성도 (%)
2001	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶국내 콩 형질전환 순응형 유전자형 스크린</li> <li>▶새로운 고효율 콩 형질전환 기초 기술 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶32개의 genotype 스크린 중, 형질전환 순응형 14개 품종선발</li> <li>▶제균제(Cefotaxime), 하이그로마이신 농도, 적정 agar 농도, 치상방향, 상처방법 조건확립</li> </ul>	100
2002	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶국내 콩 형질전환 순응형 유전자형 스크린</li> <li>▶새로운 고효율 콩 형질전환 기술 개발</li> <li>▶형질전환체 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶새로운 고효율 콩 형질전환 기초 기술 개발 : 특히 기술 개발 1건</li> <li>-고효율의 형질전환 조건 확립을 위한 전처리 기술 개발</li> <li>-고효율 형질전환 조건 확립을 위한 액체배지 선발 조건 확립</li> </ul>	100
2003	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶국내 콩 형질전환 순응형 유전자형 스크린</li> <li>▶새로운 고효율 콩 형질전환 기술 개발</li> <li>▶형질전환효율 비교 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶고효율 형질전환 조건 확립을 위한 황화합물 처리 조건 확립</li> <li>▶콩 형질전환효율 증대</li> </ul>	90

본 연구를 수행하며 얻은 성과는 아래와 같이 요약할 수 있다.

- 1) 국내 콩품종 유전자형 스크린: 국내 장려품종 이상의 콩품종에 대한 형질전환기술 개발을 목표로 32개의 품종을 스크린 한 결과, 14개의 형질전환 순응형 genotype을 선발하였다.
- 2) 고효율 형질전환기술개발을 위한 조건 확립: 고효율의 신 형질전환 조건 확립을 위한 실험수행결과, 호르몬 전처리 조건 확립, 황화물 첨가, 적정 제균제 선발, 적정 선발 조건 확립(하이그로마이신농도, 상처방법, 치상방향, agar 농도조건)등을 하였다.
- 3) 전처리 기술 특허출원: 호르몬전처리 결과 형질전환의 효율증대를 확인하였으며, GUS분석 결과 도입 유전자의 향상된 발현을 확인할 수 있었다.
- 4) 고효율의 형질전환을 위한 기초자료 활용: 본 실험에서 선발된 genotype들은 유전자 도입을 위한 형질전환실험의 재료로 사용될 수 있으며, 규명된 많은 형질전환 조건들은 고효율의 형질전환을 위한 기초자료로 활용될 수 있다.

- 5) 신형질전환기술개발의 활용: 호르몬 전처리 기술과 액체선발배지를 이용한 선발기술 개발은 다른 형질전환이 어려운 작물들의 형질전환효율증진을 위하여 사용될 수 있는 매우 중요한 기초기술개발이다.
- 6) 유용한 형질전환체 생산 및 분자유종기여: 본 실험을 통한 콩 형질전환 기술개발은 프론티어 사업의 유전자 탐색분야의 연구결과, 다양하고 농업적, 산업적으로 유용한 유전자가 많이 확보되었을 때, 본 실험조건을 통하여 형질전환을 함으로써 유용한 형질전환체 및 분자유종에 큰 기여를 할 것으로 생각된다.
- 7) 고효율 형질전환 기초기술의 활용: 호르몬 전처리 기술과 액체선발배지를 이용한 고효율의 형질전환기술은 앞으로 다양하고 많은 고부가가치의 유용유전자를 콩에 도입하여, 고부가가치의 형질전환 콩을 생산하고, 콩 유전체 기능 연구 등에 매우 중요한 기초기술로 활용가능하다.
- 8) 고효율의 형질전환기술개발을 위하여 지난 3년간 전문적인 3명의 조직배양전문연구원 과 1명의 대학원생이 투입되었으며, 현재까지 조건 확립을 위하여 형질전환시킨 떡잎의 수가 약 60,000여개에 이르고 조건확립을 위하여 GUS분석을 한 신초(shoot)의 숫자가 약 4000개에 이르고 있다. 현재도 매주 약 1000개의 떡잎에 형질전환 실험이 수행하여 왔다.
- 9) 본 과제를 수행하면서 아래와 같은 성과물을 얻을 수 있었다.
  - 한국육종학회 poster 3회 발표: 2001년 추계, 2002년 춘계, 2003년 춘계
  - 고효율 형질전환기술 1건에 특허출원
  - 일본 후쿠야마 연구소 콩 형질전환 연구팀 상호 방문 및 상호 lab seminar 토의
  - 미국 미네소타 대학 Dr. Somers lab 과 연구협의 및 방문

## 제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

### 1. 추가연구의 필요성

콩 형질전환 및 콩 GMO 품종생산은 최근에 활발히 진행 중인 유전체 연구와 맞물려 각 나라마다 다양한 고부가가치의 품종을 생산하기 위하여 진행하고 있는 선두 연구 분야이다. 많은 논문결과들이 콩 형질전환의 어려움을 나타내고 있고, 유전자층으로 유전자의 도입을 한 경우, 후대에서의 gene silencing이 문제가 되는 등 적지 않은 어려움이 보고되고 있다. 미국의 다국적 대형 회사들을 제외하고 많은 연구기관들이 Agrobacterium을 매개로한 형질전환을 하고 있으며, 보다 고효율의 안정적인 형질전환기술개발을 위하여 노력을 하고 있다. 본 연구에서는 우리나라 콩 품종을 재료로 고효율의 형질전환기술을 개발하기 위하여 지난 3년간 연구를 수행하였고 나름대로 가시적 성과를 이루었다. 그러나 콩 형질전환의 실험적 특성과 제한된 여건상 3명의 전문 연구원을 투입하였음에도 불구하고 형질전환의 결과를 후대에서 확인하는 데까지는 하지 못하였다. 이 부분에 대해서는 올 가을까지는 종자를 확보하고 후대에서의 다양한 유전자 발현 검정을 하려고 한다. 본 연구를 통하여 현재까지 고효율의 형질전환을 위한 다양한 실험조건이 확립되었으며, 이들 조건의 최적함에 힘입어 최근에 다수의 하이그로마이신 저항성 개체들이 얻어지고 생육이 전개되고 있는 것은 매우 고무적인 일이라 하겠다. 이와 같은 조건을 토대로 2단계 프론티어 사업에서 기회가 주어진다면 농업적 유용유전자의 도입을 곧 수행하려고 한다.

### 2. 앞으로의 전망

농산물 시장 개방에 따른 외국 농산물의 수입이 앞으로 크게 증가하여 국내 농업시장의 기반을 상당부분 위협할 것으로 전망된다. 여러 가지 농업 여건이 불리한 우리나라는 보다 더 기술 집약적인 농업을 지향해야 하며, 생명공학같은 고부가가치의 기술이 농업에 접목되어야 한다. 농산물 시장 개방과 더불어 외국의 다양한 종류의 GMO가 국내로 유입될 것으로 본다. 처음에는 일반의 거부감도 있을 수 있으나 여러 가지 GMO가 가지는 장점이 부각되고 기능이 인정되면 빠른 속도로 국내시장을 잠식할 것이다. 현재 선진외국들이 농업생명공학 분야에 많은 연구비를 투입하고 개발을 서두르는 이유가 여기에 있다. 따라서 국내에서도 이에 대응할 수 있는 연구의 수준을 끌어 올리고 생산기반을 갖추어 놓아 대비하여야 할 것이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1단계에서는 일본 후쿠야마연구소의 방문을 통하여 일본의 콩 형질전환연구의 현황을 알 수 있었다. 일변의 경우, 당시에 후쿠야마 연구소가 콩 형질전환을 성공적으로 수행하고 있는 유일한 연구팀이었으나, 형질전환방법이 유전자총을 이용한 방법에만 치우쳐있었고 결국 후대에 유전자의 silencing 현상으로 인해 많은 문제점을 갖게 되었다. 그와 같은 현상을 미루어 볼 때, 콩 형질전환방법은 아그로박테리움을 이용한 방법이 반듯이 개발되어야 할 것으로 생각된다. 1단계 연구과제 수행 중, 현재 아그로박테리움을 이용한 형질전환방법으로 가장 연구가 앞서있는 미네소타대학을 방문하려했으나, 현지의 사정으로 방문을 할 수 없었다. 그러나 2단계 연구사업 시작과 함께 오는 9월 미네소타대학을 현지 방문하여 연구현황을 돌아보고 연구협의를 할 예정이다. 이 방문을 통하여 미국내의 콩 형질전환에 대한 많은 정보를 얻게 될 수 있을 것으로 생각한다.

## 제 7 장 참고문헌

- B. Yan, M. S. Srinivasa Reddy, G. B. Collins, R. D. Dinkins. 2000. *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transfoemation of soybean [*Glycine max*(L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants. Plant Cell Rep 19: 1090-1097
- C. A. Meurer, R. D. Dinkins, G. B. Collins. 1998. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. Plant Cell Rep 18: 180-186
- E. R. Santarem, H. N. Trick, J. S. Essig, J. J. Finer. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. Plant Cell Rep 17: 752-759
- Paula M. Olhoft, Lex E. Flagel, Christopher M. Donovan and David A. Somers. 2003. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. Planta 216: 723-735
- P. M. Olhoft, K. Lin, J. Falbraith, N. C. Nielsen. 2001. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. Plant Cell Rep 20: 731-737
- P. M. Olhoft, D. A. Somers. 2001. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. Plant Cell Rep 20: 706-711
- Tae-Seok Ko, Sangman Lee, Sergei Krasnyanski, Schuyler S. Korban. 2003. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars : *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. Theor Appl Genet 107: 439-447
- Tae-Seok Ko, Sangman Lee, Stephen K. Farrand, Schuyler S. Korban. 2004. A partially disarmed *vir* helper plasmid, pKYRT1, in conjunction with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid promotes emergence of regenerable transgenic somatic embryos from immature cotyledons of soybean. Planta 218: 536-541
- Zhanyuan Zhang, Aiqiu Xing, Paul Staswick, Thomas E. Clemente. 1999. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transfoemation of soybean Plant Cell, Tissue and Organ Culture 56: 37-46