

1단계
최종보고서

CG2113

대두의 Functional Genomics를 위한 고빈도 형질
전환 시스템 개발

**Development of High Frequency Transformation System for Soybean
Functional Genomics**

유진텍(주) 부설연구소

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 과학기술부 특정연구개발사업 21세기프론티어연구개발사업 중 과학기술부와 농촌진흥청이 지원하는 작물유전체기능연구사업 “대두의 Functional Genomics를 위한 고빈도 형질 전환 시스템 개발”에 관한 연구(과제 번호 CG2113)의 단계보고서로 제출합니다.

2004. 8.

주관연구기관명 : (주) 유진텍 부설연구소

주관연구책임자 : 최 동 욱

연 구 원 : 최 필 선

” : 조 미 애

” : 송 윤 미

“ : 최 우 영

” : 최 규 명

“ : 김 용 덕

보고서 초록

과제관리번호	CG2113	해당단계 연구기간	2년 10월	단계 구분	(1단계) / (총3단계)
연구사업명	중 사업명	21세기프론티어연구개발사업			
	세부사업명	작물유전체기능연구사업			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	대두의 Functional Genomics를 위한 고빈도 형질 전환 시스템 개발 (Development of High Frequency Transformation System for Soybean Functional Genomics)			
연구책임자	최 동 욱	해당단계 참여연구원수	총 : 5 명 내부: 5 명 외부: 명	해당단계 연구비	정부: 240,000 천원 기업: 74,000 천원 계: 314,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	(주) 유진텍 부설연구소		참여기업명	(주) 유진텍	
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 :	연구책임자 :			
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
<ul style="list-style-type: none"> ○ 기관분화 연구 <ul style="list-style-type: none"> - Genotype Screening 완료 (800 품종) - 최적 Genotype 선정 - 최적배지 선정 - 최적 호르몬 종류 선정 - 최적 배양절편 선정 ○ 체세포배를 이용한 형질전환 연구 <ul style="list-style-type: none"> - 충분한 배발생캘러스 유지 및 증식 - 정상 체세포배 발생을 위한 2,4-D 농도 - Agrobacterium법 형질전환 - 최적 항생제 농도 선정 ○ 형질전환 연구 <ul style="list-style-type: none"> - pPTN289와 pCAMBIA3301로 형질전환된 EHA101, EHA105, GV3101, LBA4404를 이용하여 대두 자엽절과 공동배양한 결과 EHA101균주에서 3.6%의 형질전환율을 얻었음. - 최적선발배지선정과 최적 공동배양조건은 자엽절공동배양법(1999)을 기본으로 이용하여 Thorne품종에서 5개체, 1049품종에서 5개체, 백운콩에서 1개체를 각각 얻었음. - 본 연구과제 수행을 통해서 대두의 안정적형질전환시스템(최저 0.1%, 최대 8%) ○ 정량적 연구 성과물 <ul style="list-style-type: none"> - 논문 출판 5건 (국외 2건, 국내 3건) - 국내 학술발표 1건 (식물형질전환 연구회) - 국내 특허 출원 1건 - 형질전환빈도 (최저 0.1%, 최대 8%) 					
색인어 (각 5개 이상)	한글	대두, 형질전환, 아그로박테리움, 품종, 기관분화, 체세포배발생			
	영어	Soybean, Transformation, Agrobacterium, Cultivar, Organogenesis, Somatic embryogenesis			

요 약 문

I. 제 목

대두의 Functional Genomics를 위한 고빈도 형질 전환 시스템 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

대두 Functional Genomics 연구를 위한 대규모의 T-DNA Insertion Tagging Line이 확보와 대두 신 품종 육성을 위해서는 고빈도의 형질전환 시스템 확립이 선행되어야 함. 본 과제의 연구 목표는 고빈도의 안정적인 대두 형질전환 시스템을 확보하는 것임.

III. 연구개발의 내용 및 범위

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2001)	최적 배양조건 확립 및 genotype별 재분화능 조사	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대두재료의 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 10,000개의 대두 genotype 분석 - 1,000개의 genotype 선정 ○ 기관분화 시스템 <ul style="list-style-type: none"> - 물리적 배양조건 조사 - 재료의 종류 및 분화 단계에 따른 기관분화능 조사 - 배지성분 조사 - 식물호르몬의 종류와 농도 조사 ○ 체세포 배발생 시스템 <ul style="list-style-type: none"> - 미숙배 및 성숙배의 자엽절편 등 - 체세포배의 maturation 연구 - 정상자엽발생 배양조건 조사 - 체세포배의 conversion 연구 ○ Genotype Screening <ul style="list-style-type: none"> - 200 품종 이상
2차년도 (2002)	고빈도 재분화능 genotype 선발	<ul style="list-style-type: none"> ○ Genotype Screening (800 품종 이상) ○ 최종 5개의 genotype 선정 ○ 체세포배를 이용한 형질전환을 조사 (항생제 농도 설정 등)
3차년도 (2003)	Consensus 형질전환시스 템 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최적 Agrobacterium strain 선정 ○ 최적 선발배지 선정 (항생제 screening) ○ 최적 co-cultivation 조건 선정

IV. 연구개발결과

번호	세부연구목표	연구 결과
1	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기관분화 연구 - genotype Screening (800 품종 이상) - 최적 Genotype 선정 - 최적배지 선정 - 배양절편 선정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기관분화 연구 - genotype Screening 완료 (800 품종) - 최적 Genotype 선정 - 최적배지 선정 - 최적 호르몬 종류 선정 - 최적 배양절편 선정
2	<ul style="list-style-type: none"> ○ 체세포배의 형질전환 연구 - 배발생캘러스 유지 및 증식 - 정상자엽발생을 위한 배양조건 - Agrobacterium법 및 Particle bombardment법으로 형질전환 - 최적 항생제 농도 선정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 체세포배를 이용한 형질전환 연구 - 충분한 배발생캘러스 유지 및 증식 - 정상 체세포배 발생을 위한 2,4-D 농도 - Agrobacterium법 형질전환 - 최적 항생제 농도 선정
3	<ul style="list-style-type: none"> ○ Consensus 형질전환시스템 개발 - 최적 Agrobacterium strain 선정 - 최적 대두 형질전환 조건 확립 - 모델 형질전환시스템 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ○ pPTN289와 pCAMBIA3301로 형질전환된 EHA101, EHA105, GV3101, LBA4404를 이용하여 대두 자엽절과 공동배양한 결과 EHA101균주에서 3.6%의 형질전환율을 얻었음. ○ 최적선발배지선정과 최적 공동배양조건은 자엽절공동배양법(1999)을 기본으로 이용하여 Thorne품종에서 5개체, 1049품종에서 5개체, 백운콩에서 1개체를 각각 얻었음. ○ 본 연구과제 수행을 통해서 대두의 안정적 형질전환시스템(최저 0.1%, 최대 8%)
4	<ul style="list-style-type: none"> ○ 논문 출판 3건 ○ 특허 1건 ○ 형질전환율 (>15%) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 논문 출판 5건 (국외 2건, 국내 3건) ○ 국내 학술발표 1건 (식물형질전환 연구회) ○ 국내 특허 출원 1건 ○ 형질전환빈도 (최저 0.1%, 최대 8%)

V. 연구개발결과의 활용계획

- 새로운 기능성 대두 품종 생성
- 대두 Functional Genomics을 위한 T-DNA insertion Mutant line 생성

S U M M A R Y

I. Title

Development of High Frequency Transformation System for Soybean Functional Genomics

II. Objectives and Needs of the R&D

Soybean (*Glycine max* L.) is an important leguminous seed crop as it is an economic source of oil, protein and secondary metabolites. Developing an efficient genetic transformation system for soybean should be facilitate physiological and molecular biology studies as well as the improvement of elite cultivars for desirable agronomic traits. Moreover, the rapid ongoing progress in functional genomics studies of the soybean has increased the demand for a routine and efficient transformation system. However, current soybean transformation protocols remain low efficiency. This project focuses on development of high frequency soybean transformation system for producing T-DNA tagging mutant lines on the large scale applicable to functional genomics.

III. Contents and Range of the R&D

	Objectives	Contents and Range
1st year (2001)	Establishment of optimal culture condition and screening of genotype for plant regeneration in soybean	<ul style="list-style-type: none">○ Preparation of soybean cultivar seeds<ul style="list-style-type: none">- Analysis of morphological and local characteristics from 10,000 genotypes- Selection of 1,000 genotype○ Organogenesis system<ul style="list-style-type: none">- Testing of physical culture condition (temperature, light etc)- Screening of regenerability for explants (cotyledon, hypocotyl)- Screening for medium compositions- Screening for plant growth regulator type and concentration○ Somatic embryogenesis system<ul style="list-style-type: none">- Testing of embryogenesis for immature and mature embryo

		<ul style="list-style-type: none"> - Study of maturation for somatic embryo - Screening of culture condition for normal cotyledon development of somatic embryo - Study of somatic embryo convert to plantlet o Genotype Screening - More 200 genotype
2nd year (2002)	Selection of high frequency regenerability genotype	<ul style="list-style-type: none"> o Genotype Screening (800 genotypes) o Selection of 5 genotype o Screening of transformation factor using somatic embryogenesis - Antibiotics concentration
3rd year (2003)	Development of consensus transformation system in soybean	<ul style="list-style-type: none"> o Selection of optimal agrobacterium strain o Selection of optimal selectable marker o Selection of optimal co-cultivation condition

IV. Results of the R&D

1. Screening of soybean recombinant inbred lines for high competence somatic embryogenesis

Cotyledonary explants from immature zygotic embryos of each 85 recombinant inbred lines (RILs) were cultured on medium containing MS salts, B5 vitamins, 40 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 30 g/L sucrose. Frequency of somatic embryo formation on cotyledonary explants showed in thirty-six lines at less than 10%, in thirty-seven lines at 11 to 49%, in nine lines at 50~89%, and in three lines at more than 90%, respectively. The highest frequency (more than 90%) of somatic embryos formation were obtained from lines of KM1010, KM1032 and KM1064. These soybean genotype produce average 6.36 primary somatic embryos cells per cotyledon. Primary somatic embryos obtained from three lines produced numerous secondary somatic embryos on the surfaces, which were subcultured for over one year. Upon transfer to maturation and conversion medium, somatic embryos converted to plantlets at a frequency of approximately 25%. The results showed that efficiency of the somatic embryo formation is different from between soybean genesis genotypes.

2. Selection of soybean genotype with high efficiency of shoot regeneration

Previous report of the soybean transformation suggest that transformation efficiency is highly dependent on the soybean genotype. Therefore, it is prerequisite to select soybean genotype that have high shoot regeneration efficiency for the high efficiency soybean transformation system. In order to develop high frequency soybean regeneration system via organogenesis, we select 1,100 soybean genotypes from 10,000 genotypes of worldwide collection and screen their shoot regeneration efficiency on MS medium supplemented with a combination of 0.1 mg/L NAA and 3.2 mg/L cytokinin (BAP, tidiazuron, zeatin, kinetin), respectively. Tested 1,100 soybean genotypes consist of 200 genotype from domestic cultivars and 900 genotype from foreign's cultivars. Finally, we selected four soybean genotypes (line #1049, 480, 61, 888) with 45% efficiency of shoot regeneration. The results showed genotype influence on soybean regenerability via organogenesis.

3. Production of transgenic soybean

We carried out soybean transformation using the *Agrobacterium*- cotyledonary node transformation method with some modifications and the bar gene as the selectable marker coupled with glufosinate as a selective agent in 4 genotypes (1049, 480, 61, 888) with the high regenerability frequency selected from 1,100 genotypes, in 4 domestic genotypes (Dae won, Bakun, Mooan, Eunhwa), and in Thorne cultivar. Soybean cotyledonary explants were co-cultivated with five *Agrobacterium tumefaciens* strains (LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, C58C1) carrying with pPTN289 or pCAMBIA3301, respectively. There was a significant difference in the frequency of transformation for each bacterial strain. The EHA101 strain of the bacterial strains employed gave the maximum efficiency (8.0%). Strains GV3101 (0.1%), LBA4404 (2.0%) were also effective, but not obtained from C58C1 strain. One hundred-six glufosinate resistance plants were established. Analysis of GUS staining and a leaf paint assay with basta (Aventis) showed that at least 11 plants were transformed with the GUS and bar gene. The positive soybean transformants were obtained from the Thorne cultivar (5 plants),

1049 genotype (5 plants) and Bakun cultivar (1 plant), respectively. Southern blot analyses revealed that the GUS and bar gene integrated into soybean genome, and that the genes segregated to their progeny. These soybean transformation system will be used for producing T-DNA tagging mutant lines.

V. Applications

1. Development of soybean cultivar using transformation system
2. Production of T-DNA insertion mutant lines for soybean functional genomics

C O N T E N T S

Chapter 1. Outline of the R&D	11
Chapter 2. State of the art	13
Chapter 3. Contents and RangeResults of the R&D	16
Section 1. Genotype screening for high competence somatic embryogenesis in soybean	16
Section 2. Plant regeneration from immature embryo cultures of <i>Vigna unguiculata</i> L.	24
Section 3. Importance and issue for soybean transformation system	35
Section 4. development of plant regeneration system via organogenesis in soybean	44
Section 5. Study for conversion from somatic embryo to plantlet	51
Section 6. Development of coyledonary node coculture with <i>Agrobacterium</i> in soybean	55
Chapter 4. Objectives of the R&D and possible contribution to plant biotechnology	66
Chapter 5. Applications	67
Chapter 6. International information of biological sciences	68
Chapter 7. References	87

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	11
제 2 장 국내외 기술개발 현황	13
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	16
제 1 절 대두 재조합순계주에서 고빈도 체세포배발생능계통 조사	16
제 2 절 동부콩 미숙배배양으로부터 식물체 재생시스템	24
제 3 절 콩 형질전환에 대한 문제점 및 해결 방안	35
제 4 절 기관발생을 통한 식물체 재분화시스템 개발	44
제 5 절 체세포배발생을 통한 대두 형질전환 연구	51
제 6 절 대두 자엽절 공동배양법을 이용한 형질전환 시스템 개발	55
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	66
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	67
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	68
제 7 장 참고문헌	87

제 1 장 연구개발과제의 개요

- 외래 유용유전자 도입에 의한 식물의 형질전환 기술은 식물 생명공학 분야에서 가장 중요한 핵심 분야라 할 수 있으며, 이는 작물의 품종개량뿐 아니라 최근 insertion tagging line을 이용한 기능유전체 연구에서도 핵심기술로서 이용되고 있음
- 식물의 형질전환 연구는 여러 가지 요인에 의해서 성공 여부가 결정될 수 있으나, 가장 중요한 기반 기술은 역시 고빈도의 안정된 재분화 시스템이라 할 수 있음
- 많은 식물 중 담배나 애기장대를 모델식물로 연구가 이루어질 수 있었던 것은 담배의 안정된 재분화 시스템과 애기장대의 고효율 형질전환 방법이 중요한 역할을 했음. 벼의 경우도 고효율의 형질전환 시스템이 개발된 후 Functional Genomics를 위한 knock-out mutant lines 확보가 가능해짐
- 많은 작물에서 식물체 재분화능과 형질전환 빈도는 배양조건, 배지성분 등 물리·화학적 요인에 의하여 어느 정도 좌우되나, 가장 중요하게 고려해야 할 사항은 식물종 내 genotype의 특성임. 따라서 고빈도 재분화 시스템 개발을 위해서는 광범위하게 genotype을 조사할 필요가 있음(Komatsuda, 1995)
- 지금까지 개발된 대두의 형질전환 시스템은 미국의 Collins, Finer와 Parrott 그룹에서 개발된 미숙배 배양으로부터 체세포 배발생 경로를 통한 식물체 재분화 방법을 이용하고 있음. 이 방법은 체세포 배에서 식물체로의 매우 낮은 전환율과 복잡한 배양방법으로 한정된 대두 형질전환체(약 0.5%)를 얻을 수밖에 없었음. 이는 매우 한정된 genotype(예를 들면 Jack bean 등)을

대상으로 재분화 시스템을 확립하여 형질전환 시스템에 이용하였기 때문임
(www.oardc.ohio-state.edu/plantranslab/d20.htm)

본 과제에서는 전세계에서 수집된 약10,000개의 대두 genotype중 계통분류학적 차이와 기존의 연구를 바탕으로 약 1,000개 이상의 genotype을 선정하여 그 재분화능을 광범위하게 조사함으로써 최적의 genotype과 최적의 배양조건을 확립하고 나아가 향후 작물유전체기능연구과제의 2단계에서 대두 Functional Genomics을 위한 Kit 개발에 활용할 수 있는 consensus 형질전환시스템을 개발하고자 함

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 대두의 재분화 및 형질전환 시스템 개발 연구는 주로 국외를 중심으로 이루어져 왔으며(약 국외155편), 국내에서는 본 연구진에 의해서 체세포배발생 경로를 통한 식물체재분화 시스템 개발 연구를 1995년 보고한 이래 수 개에 불과함. 최근 씨앗에서 막 싹튼 줄기 부분에 머리카락 굵기의 침으로 찌른 뒤 *Agrobacterium*을 접종하는 형질전환 방법이 국내 연구진에 의해 개발된 바 있음(최 등, 2001)
- 국외에서는 대두의 중요성을 인식하고 1981년 Phillips와 Collins에 의해 대두 액체배양 시스템으로부터 체세포 배발생 연구가 보고된 이래 체세포 배발생(약 84편)과 기관분화 발생(약 31편) 시스템을 통한 재분화 연구가 진행되어 왔고, 이는 곧 대두의 형질전환 시스템 개발연구로 진행되어 지금까지 약 40여 편의 연구가 보고되어 있음 (표1 참조)

표 1. 국외 대두 재분화 및 형질전환시스템 연구자료 분석

		Factors for regenerability				
		Explants	Conversions	Mediums	Genotypes	etc
Regeneration systems	somatic embryogenesis	19	16	14	18	17
	organogenesis	22	-	3	2	4
Transformation systems		40 (형질전환시스템개발, 지방산 발현식물체, 제초제저항성식물체등)				

- 이러한 기반 연구는 미국의 몬산토, 듀폰 그리고 일본의 저팬코바코 등 일부 기업들이 그 원천기술을 독점할 수 있는 기회를 제공하였고, 결과적으로 현재 국내에서 이러한 기술을 상용화하는 데 많은 제약이 따르고 있는 실정임
- 작물유전체기능연구사업단에서 추구하고 있는 국내 주요 작물 중 대두의 새로운 형질전환 기술 개발 연구를 수행하기 위해서는 현재까지 국외에서 개발돼 독점하고 있는 형질전환 기술에 의한 형질전환율(약 0.5%)을 훨씬 능가

할 수 있는 기술 개발이 필수적이며, 이를 위해서는 대두의 안정된 고빈도 재분화 시스템이 선행되어야 함

- 본 연구진은 그 간 국내 주요 작물 (오이, 수박, 배추, 더덕, cowpea, 딸기, 무 등)을 대상으로 식물체 재분화 시스템을 확립하여 왔으며, 특히 수박, 더덕에서는 세계 최초로 형질전환 시스템을 확립하여 보고한 바 있음. 또한 본 연구 과제를 위하여 이미 대두의 117개 genotype에 대한 체세포배발생능을 조사 완료 하였으며, 유식물체로의 전환율을 조사중에 있음(그림1, 그림2).

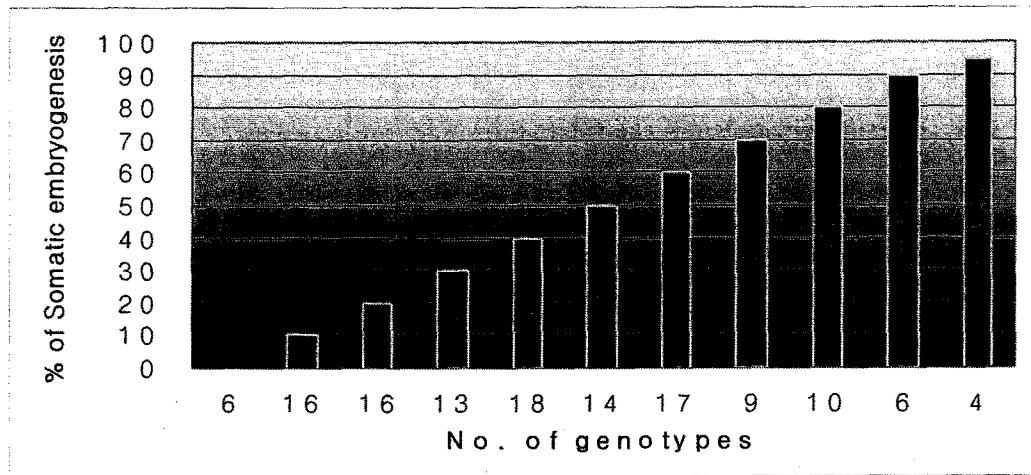


그림1. 고빈도 체세포배형성능을 갖는 genotypes Screening 117개의 genotype을 MS40D배지에서 screen 한 결과임



그림 2. Finer의 대두 배양 방법에 의한 미숙배 배양으로부터 형성된 체세포배

2000년 말 애기장대에 이어 벼 유전체 염기서열도 곧 완성될 것으로 기대됨에 따라 향후 주요 식물에 대한 functional genomic 연구는 더욱 확대될 전망이다.

미국 경우 NSF 지원 하에 대두와 콩과식물의 모델식물인 *Medicago truncatula*에서 DNA Marker 개발, 고빈도 형질전환 시스템 개발, 유전체 구조 분석 및 기능 분석 연구 등이 포함된 유전체 프로젝트가 수행되고 있음. 일본도 Kazusa DNA 연구소에서 *Lotus japonica*에 대한 기능 유전체 연구 프로젝트가 진행됨에 따라 향후 수 년내 콩과식물의 기능 유전체 연구를 위한 기반 기술이 확립될 것으로 추정됨

따라서 대두 Functional Genomics 연구를 성공적으로 수행하기 위해서는 T-DNA Insertion Tagging Line이 확보되어야 하며, 이를 위해서는 안정적인 형질전환 시스템이 필수적으로 요구됨

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 대두 재조합순계주에서 고빈도 체세포배발생능 계통 조사

1. 서 론

대두의 기내 식물체재생연구는 체세포배발생을 통하여 처음으로 보고 되었고 (Christianson et al., 1983), 이후 식물생장조절제의 적정농도 (Finer and Nagasawa, 1988; Liu et al., 1992), 배양재료로서 미숙배의 중요성 (Komatsuda, 1995), 오옥신과 sucrose의 상호작용 (Lazzeri et al., 1988; Komatsuda, 1992), 체세포배의 이상형태발생 (Choi et al., 1994), 체세포배의 성숙 및 식물체로의 전환 (Buchheim et al., 1989) 그리고 품종간 체세포배형성능 (Komatsuda, 1988) 등 많은 연구가 이루어져왔다. 특히 대두의 품종간 체세포배발생능 비교 연구는 전세계에서 수집한 약 300여개 품종을 대상으로 광범위하게 조사하여 대두의 식물체 재분화연구에 품종의 중요성이 강조된 바 있다 (Komatsuda, 1992). 이와같이 기내배양이 어려운 콩과식물에서 품종간 재분화능 비교 연구는 필수적이라 할수 있으며, 배양재료로서 우수한 계통 또는 품종선택은 식물체 재생 및 유전적형질 전환연구에 있어서 성공 여부를 결정지을 수 있는 중요한 과정이라 할 수있다 (Green, 1982; Rhodes et al., 1988a,b; Foroughi-Wehr and Friedt, 1981; Vasil et., 1990; Kamiya et., 1988). 이와관련 하여 Komatsuda (1992)는 체세포배발생에 대한 QTL분석을 목적으로 체세포배발생능이 높은 품종 (Masshokutou Kou 502)과 낮은 품종 (Keburi)의 교배로부터 117개 대두재조합순계주를 개발한 바있다 (Komatsuda, unpublished). 따라서 본연구에서는 대두 기능유전체분석을 위한고 빈도형질전환시스템을 개발할목적으로 117개재조합순계주에 대한 체세포배발생능을조사하고 고빈도 체세포배발생능계통으로부터식물체 재생에 대한 연구를

수행하였다.

2. 재료 및 방법

대두 117개의 재조합순계주 (RIL, recombinant inbred lines) F14세대를 일본 농업생물자원연구소 유전다양성과로부터 공급받았다. 재조합순계주는 이전연구에서 체세포배발생능이 높은 *Glycine gracilis*의 semi-wild변종인 Masshokutou Kou 502와 체세포배발생능이 낮은 *Glycine max*의 재배품종 Keburi를 (Komatsuda et al., 1992) 교배하여 single-seed descent 방법으로 개발하였다 (Komatsuda, unpublished). 본 실험에서는 2개 양친 품종과 117개의 재조합순계주를 온실포장에 파종하여 85계통의 식물체를 얻었다. 개화 후 15일째에 미숙배의 크기가 2.5-3 mm로 자란 꼬투리를 취하여 수돗물에 3-5회 세정한 후 종피와 배축을 제거한 자엽절편을 배양재료로 이용하였다. 체세포배유도배지 (SIM, Somatic Induce Medium)는 MS salt (Murashige and Skoog, 1962), B5비타민 (Gamborg et al., 1968), 40 mg⁻¹ 2,4-D (Finer and Nagasawa, 1988) 및 30 g⁻¹ sucrose를 조합하여 배지를 조성하였다. 배지는 4 g⁻¹ Phytigel을 첨가하기 전 pH를 5.8로 조정하여 121℃, 1.2기압에서 15분간 고압멸균 후 90×15 mm 플라스틱 페트리디쉬에 25 ml씩 분주하여 사용하였으며, 페트리디쉬당 20개의 자엽절편을 치상하였다. 배양은 25℃로 조절되는 배양실에서 광도 46μmol m⁻²s⁻¹의 16시간 광주기에서 5주간 배양한 후 체세포배발생 빈도와 자엽당 체세포배발생수를 기록하였다. 일차 체세포배를 동일 배지상에 옮겨 구형기의 2차 체세포배로 증식하였으며, 성숙배지와 식물체 전환배지 (Komatsuda, 1992)에 옮겨 완전한 식물체로 생육시켰다. 모든 실험은 3회 반복하였다.

3. 결과 및 고찰

대두 재배품종 (Keburi)과semi-wild변종 (Masshokutou Kou 502)의 교배로부터 얻은 117개의재조합 순계주를 파종하여 85계통의 식물체로부터 개화 후 약 15 일째에 미숙배를 얻었다. 미숙배로부터 자엽절편을 취하여 체세포배유도배지 (SIM)에 이식한 결과 배양 1주후 부터 자엽절편 가장자리에서 갈변되기 시작하여 3주째에는 거의 모든 부위가 갈색으로 변하였고, 자엽절편 가장자리와 가운데에서 캘러스 형성 없이 체세포배가 형성 되기 시작하였다. 그러나 갈변현상 없이 자엽으로부터 캘러스가 형성되거나 팽창되는 현상이 일어나는 계통에서는 체세포배가 거의 형성 되지 않았다 (데이터 미제시).

배양 5주 후 양친의 자엽절편으로부터 체세포배형성과 자엽당 체세포배 형성 수를 조사한 결과, 대두 재배품종인 Keburi에서는 체세포배가 관찰되지 않았으나, semi-wild변종인 Masshokutou Kou 502에서는 92%의형성빈도와자엽당 3.92개의체세포배가형성되었다 (표 2). 이러한 결과는 품종간 체세포배발생능 차이가 분명함을 보여 주며, 체세포배발생능에 대한 약 300여개의 품종스크리닝 (Komatsuda, 1992)과 Masshokutou Kou 502와 Keburi에서자엽당각각 4.6개와 0.02개의체세포배가형성된다는이전연구결과 (Ito et al., 1999)와 아주 잘 일치하였다.

양친의 교배로부터 얻은 재조합순계주 F14세대에서 85계통에 대한 체세포배 형성빈도와 형성 수를 비교한 결과, 36계통에서 0-10%의 낮은 체세포배 형성빈도와 자엽당 약 0.07개의 체세포배가 형성되었고, 37계통에서 11-49%의 형성빈도와 자엽당 약 0.90개의 체세포배가, 9계통에서 50-89%의 형성빈도와 자엽당 약 3.12개의 체세포배가 각각 형성되었으며, 90%이상의 고빈도 체세포배 형성빈도는 3계통에서만 관찰 되었고, 자엽당 6.36개의 체세포배가 형성되었다 (그림 3). 이러한 고빈도 체세포배발생능을 갖는 3계통의 일차배를 동일배지에 옮겨 2차배 증식방법으로 1년 이상 증식 및 유지할 수 있었으며 (그림 4.A, B), 체세포배를 성숙배지, 발아배지 및 식물체 전환배지 (Komatsuda, 1992)에 옮겼을 때 체세포배중 약 25%정도가 정상 식물체로 생육하였다 (그림 4 2C, D). 이러한 결과는 대두의 재조합 순계주에서 체세포배 형성능이 높은 계통은 양친 중

Masshokutou Kou 502의 유전적특성이, 체세포배형성능이 낮은계통은 Keburi의 유전적특성이 유전되었기 때문인 것으로 사료되며, 특히 KM1032, KM1064 및 KM1010계통과 같이 체세포배 형성빈도가 각각 92%, 92% 및 100%로 그리고 자엽당 체세포배 형성수가 각각 4.77개, 8.23개 및 8.52개로 양친 (Masshokutou Kou 502) 보다 높게 나타난것은 유전학적상가효과 (additive effect)에 의한것으로 추측된다. 옥수수에서 부드러운 배발생캘러스를 순계주 A188에서 얻은 이후 (Green, 1982), 세포배양과 원형질체배양을 통하여 식물체재생 (Rhodes et al., 1988a)과 electroporation법에 의한 형질전환식물체생산이 가능하였고 (Rhodes et al., 1988b), 보리품종 Dissa와 Igri에서 약배양에 의한 반수체 식물생산 (Foroughi-Wehr and Friedt, 1981)과 미숙배배양에 의한 부드러운 배발생캘러스유도가 가능하였다 (Luhrs and Lorz, 1987). 또한 밀품종 Chris에서 약, 화기 및 미숙배배양에 의한 식물체재생이 가능하였고 (Vasil et al., 1990), 벼에서 약 500개의 품종을 대상으로 스크리닝하여 고빈도배발생능 품종을 선발한바 있다 (Kamiya et al., 1988). 이와같이 대두를 포함한 많은 식물에서 동일종이라 할지라도 계통간 또는 품종간 체세포배발생능이나 식물체재분화능에 있어서 현저한 차이가 있기 때문에 기내배양이 어려운종일수록 광위한스크리닝연구를 통해서 우수한 품종이나 계통선발과정이 필수적이라 할 수 있다. 본 연구에서도 117개의 재조합순계주에서 체세포배발생능이 우수한 KM1032, KM1064 및 KM1010 등 3계통을 선정하였으며, 이는 지금까지 매우 낮은 대두 식물체 재생율과 형질전환율을 향상시키는데 중요한 유전자원으로 활용될 수 있을 것이다.

표 2. 대두 RIL line의 모본에 대한 체세포배발생능

Parants	Number of cotyledon cultured	Number of explants with somatic embryo (%)	Total number of somatic embryos formed from explants	Number of somatic embryos per one cotyledon
Keburi	60	0 (0)	0	0
Masshokutou Kou 502	60	55 (92)	235	3.92

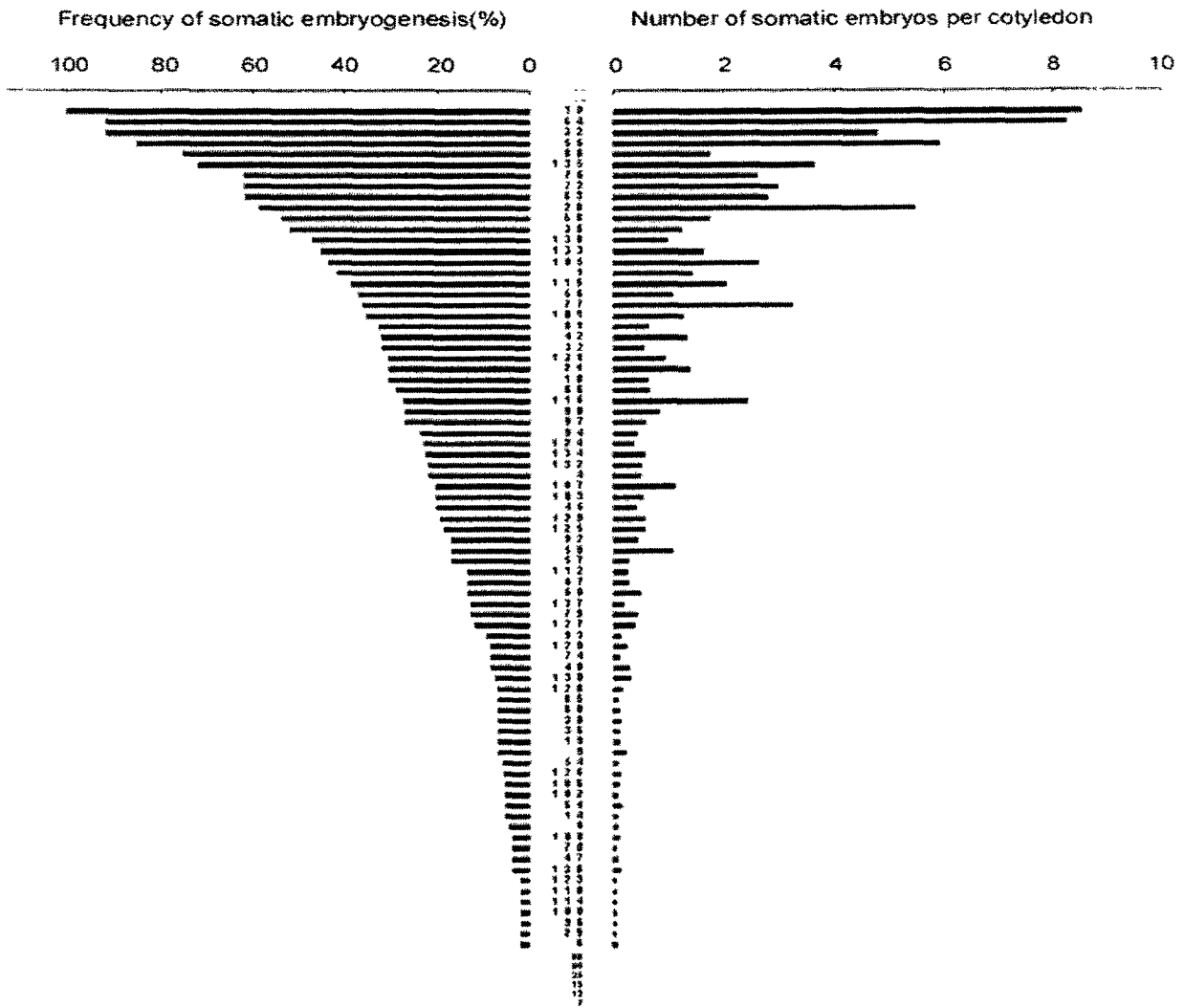


그림 3. 대두 재조합 순계주의 체세포배 발생능

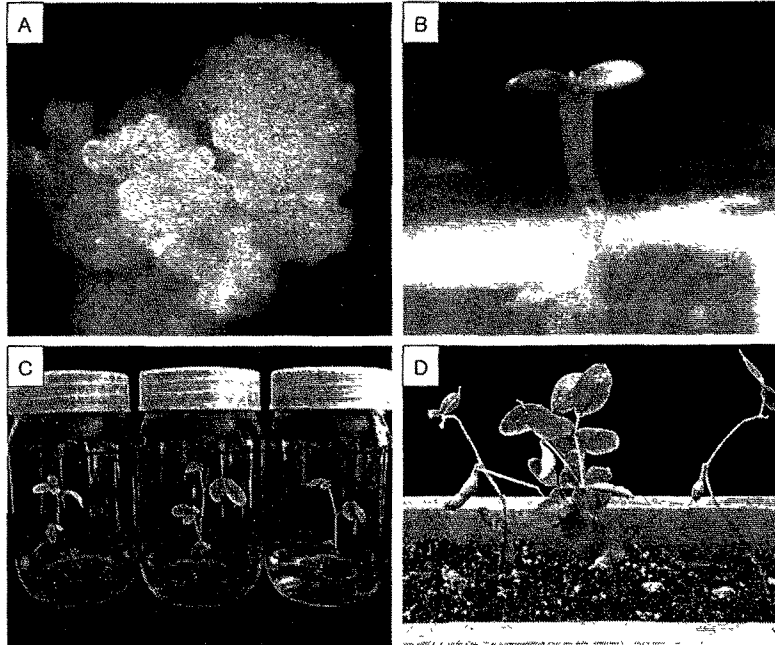


그림 4. 대두 미숙배로부터 체세포배발생을 통한 식물체 재생 시스템

4. 적 요

대두 85개 재조합 순계주의 미숙배로부터 얻은 자엽절편을 MS salt, B5비타민, 40 mg^{-1} 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 및 30 g^{-1} 서당으로 조성된 체세포배유도배지 (SIM, somatic induce medium)에 치상하여 5주간 배양하였다. 10%이하의 체세포배 형성빈도는 36계통에서, 11-49%의 형성빈도는 37계통에서, 50-80%의 형성빈도는 9계통에서 그리고 90% 이상의 형성빈도는 3계통에서 각각 관찰되었다. 90%이상의 체세포배 형성빈도와 자엽당 6.36개의 체세포배를 형성하는 계통으로는 KM1010, KM1032 및 KM1064이었으며, 3계통에서 얻은 일차배를 동일배지상에서 계대배양하면서 2차배증식방법으로 1년이상 증식 유지하였다. 체세포배를 성숙배지와 식물체전환배지 (Komatsuda, 1992)에 옮겼을때 약 25% 정도가 정상 식물체로 생육하였다.

제 2 절 동부콩 미숙배배양으로부터 식물체 재생시스템

1. 서 론

콩과식물은 경제적으로 중요한 작물임에도 불구하고 아직까지 식물체 재분화 시스템이 확보되어 있지 않다. 이런 경우에 미숙배와 자엽절편을 재료로 쓸 경우에 고도의 기관분 능력이 발현 되므로 재생 식물체를 얻을수 있게 된다. 최근에 미숙배 배양으로부터 기관분화를 거쳐 식물체를 얻은 예는 *Calotropis gigantea* (Ashis and Deepesh, 1990)와 *Rosa hybrida*(Burger et al., 1990)에서, 성숙배의 경우 *Pseudotsuga menziessii*(Cheng, 1975, 1977), *Camellia japonica*(Ana and Jesus, 1990), *Glycine max*(Moon et al., 1994), *Pinus ponderosa* (Tuskan et al., 1990), kidney bean(Allavena, 1984), penut(Bajaj, 1984), pea(Gantotti and Kartha, 1986), alfalfa(McCoy and Walker, 1984) 및 clover(Phillips and Collins, 1984) 등에서 이루어 졌다. 그러나 동부에서는 약배양으로 부터 기관분화(Arya and Chandra, 1989), 잎절편 배양으로 부터 부정근 형성(Ladeinde and Soh, 1991) 및 상배축과 자엽절편(Amitha and Reddy, 1996)으로 부터 식물체 재생에 관한 연구 등이 이루어 졌으나, 식물체 재생 빈도(16%)가 낮을 뿐 아니라, 0.2 mg/L BA와 5% 코코넛밀크(coconut milk)가 첨가된 배지에서 형성된 부정아의 경우 식물체로 재생이 어려운 것으로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서 동부의 기내 배양으로 부터 식물체 재생빈도를 높이기 위해서 성숙배와 미숙배로 부터 부정아 형성에 대한 BA의 영향과 미숙배의 부위에 따른 부정아 형성능을 조사하여 그 결과를 보고 하고자 한다.

2. 재료 및 방법

동부 [*Vigna unguiculata* (L.) walp.] 의 발달중인 삭과와 성숙한 삭과를 취하여 70% 에탄올에 1분간, 1% 차아염소산나트륨에 15분간 표면살균한 후 무균수

로 3번 수세하여 삭과속의 미숙배와 성숙배를 배양재료로 사용하였다. 부정아 형성에 대한 조사는 첫째 미성숙배와 성숙배를 배 전체(whole embryo), 배축(embryo axis) 및 자엽절편(cotyledon segment) 등 세 부위로 나누어 여러가지 농도의 BA(0.1, 0.5, 1 및 2 mg/L)를 첨가한 MS 배지(Murashige and Skoog, 1962)에서 6주동안 배양하여 부정아 형성률을 조사하였고, 이때 자엽절편의 경우는 하면표피가 배지표면에 닿도록 이식 하였다. 둘째 미숙배와 성숙배를 자엽만(one cotyledon only), 자엽기부쪽 절반(proximal half cotyledon), 자엽말초부쪽 절반(distal half cotyledon), 배 전체(whole embryo), 배축(embryo axis), 배축이 붙은 자엽(one cotyledons with embryo axis), 배축이 붙은 자엽기부쪽 절반(proximal half of one cotyledon with embryo axis) 및 배축이 붙은 2개의 자엽기부쪽 절반(proximal half of two cotyledons with embryo axis) 등 8가지로 나누어 1 mg/L BA를 첨가한 MS배지에서 위와 동일한 조건으로 배양하였다. pH 5.8로 조절된 25 ml의 배지를 100 ml 용량의 삼각 후라스크에 넣고 고압 멸균하였으며, 1900 lux, 16시간 광주기하에서 25 ± 1 °C로 조절되는 배양실에서 배양하였다. 또한 처리군당 15개씩 3회 반복하였다. 배양 6주 후 부정아는 MS 기본 배지에 이식하여 부정근을 유도하였으며, 유식물은 버미큘라이트(vermicurite)를 넣은 화분에 심어서 순화하였다.

한편, 부정아의 발생과정을 관찰하기 위하여 배양중인 자엽절편을 배양 3일부터 2일간격으로 FAA에 고정한 다음, buthanol 시리즈로 탈수하여 파라핀에 포매하였다. 박절은 회전식 마이크로톰으로 약 10 μ m 두께의 절편을 만들어 0.5 % 헤마톡실린과 1 % 라이트 그린으로 염색한 후 광학현미경하에서 관찰하였다.

3. 결 과

가. 배의 성숙도와 BA농도

미숙배가 3-4개가 들어있는 발생중인 삭과의 길이는 2-3 cm이고, 미숙배와 성

숙배의 크기는 각각 4 mm와 9 mm정도였다. 미숙배를 배 전체 또는 배축을 배양 하였을때 어느조건에서도 부정아가 형성되지 않았다. 그러나 배축이 제거된 자엽절편을 배양하였을 경우 배양 3주 후 절단부위로 부터 녹색의 단단한 캘러스가 형성되고, 이러한 캘러스로 부터 부정아가 형성 되었다(그림 5. A, B, C, D). 또한 BA농도에 따라 부정아 형성율은 다르게 나타났다. 0.5 또는 1.0 mg/L BA가 첨가된 배지에서 가장 높았으며(50 %), 0.1 mg/L와 2.0 mg/L BA가 첨가된 배지에서는 각각 9 %와 15 %의 낮은 형성률을 보였다. 자엽절편당 부정아 수는 1.0 mg/L BA가 첨가된 배지에서 10.1개로 가장 많이 형성되었으며, 그 다음은 0.5 > 2.0 > 0.1농도 순으로 감소하였다 (표 3). 이와같이 부정아 형성율과 절편당 부정아 수의 결과로 볼때 부정아 형성은 자엽절편을 1.0 mg/L BA가 첨가된 배지에 배양 하였을 때 가장 효과적인 것으로 나타났다. 한편, 위와 동일한 조건으로 성숙배를 배양 하였을 경우 부정아 형성은 이루어 지지 않았다 (표 3).

Æ 3. Adventitious bud formation from cotyledon of immature or mature zygotic embryos of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. on MS medium containing BA.

Zygotic embryos	BA conc. (mg/L)	^a Frequency(%) of adventitious bud formation / explant	Adventitious bud No. / explant
immature	0.1	9.1 ± 1.1	0.2
	0.5	49.9 ± 2.7	3.6
	1.0	49.9 ± 1.9	10.1
	2.0	15.4 ± 2.1	2.1
mature	all conc.	0.0 ± 0.0	0.0

⌘ 4. The frequency(%) of adventitious bud formation on variuos explants from immature zygotic embryo of *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

^a Explants	^b Frequency(%) of adventitious bud formation / explant	Adventitious bud No. / explant
one cotyledon only	67.5 ± 2.9	6.7
one proximal half only	50.1 ± 3.2	4.2
distal segment of cotyledon	30.3 ± 1.3	2.3
whole embryo	0.0 ± 0.0	0.0
embryo axis	0.0 ± 0.0	0.0
one cotyledon with embryo axis	0.0 ± 0.0	0.0
proximal half of one cotyledon with embryo axis	0.0 ± 0.0	0.0
proximal half of two cotyledons with embryo axis	0.0 ± 0.0	0.0

나. 미숙배의 자엽과 배축절편

미숙배를 8가지 부위로 나누어 1.0 mg/L BA가 첨가된 MS배지에서 6주동안 배양한 결과, 배 전체(whole embryo), 배축(embryo axis), 배축이 붙은 자엽(one cotyledon with embryo axis), 배축이 붙은 자엽기부쪽 절반(proximal half of one cotyledons with embryo axis) 및 배축이 붙은 2개의 자엽기부쪽 절반(proximal half of two cotyledons with embryo axis) 등의 절편에서는 경단분열조직이 발달하여 식물체로 성장 하였을 뿐, 부정아 형성은 이루어지지 않았다. 그러나 배축을 제거한 자엽절편을 자엽만(one cotyledon), 자엽기부쪽 절반($\frac{1}{2}$ proximal cotyledon) 및 자엽말초부쪽 절반($\frac{1}{2}$ distal cotyledon)으로 나누어 배양하였을때 부정아가 형성 되었으며, 각각 67%, 50% 및 30%의 형성율을 나타냈다. 이때 부정아 형성은 절편의 기부쪽부위에서만 이루어졌다. 절편당 부정아 수는 자엽만 배양 했을때 6.7개, 자엽기부쪽 절반($\frac{1}{2}$ proximal cotyledon)에서 4.2개 및 자엽말초부쪽 절반($\frac{1}{2}$ distal cotyledon)에서 2.3개가 형성되었다 (표 4). 이와같이 자엽을 그대로 배양하든 절반을 배양하든 배축이 존재하면 부정아 형성이 이루어지지 않았으며, 오직 배축이 제거된 자엽절편에서만 형성 됨을 알수있었다. 배양 6주 후 부정아를 MS 기본배지에 옮겨 약 2주동안 배양하면 부정근이 유도되어 정상 식물체로 발달하였다(그림 5. E, F).

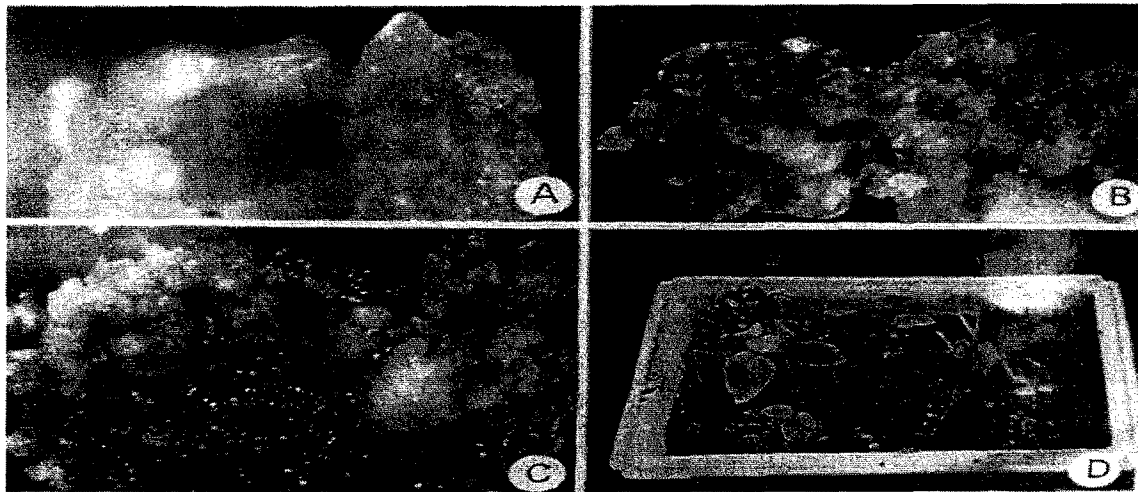


그림 5. Plant regeneration in cotyledon cultures of immature zygotic embryo of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. on MS medium containing 1.0 mg/L BA. A: Green spot(arrows); B: Adventitious bud primordia(arrows); C: Developing adventitious buds(arrows); D: Mature adventitious bud; E: Plantlet; F: Plantlets in pott with vermiculite

다. 조직학적 관찰

부정아 형성과정을 조직학적으로 관찰한 결과, 자엽 내부의 유관속 주위의 분열조직으로부터 세포분열을 거쳐 많은 부정아 원기가 형성되었다 (그림 6) 따라서 부정아는 유관속 주위의 분열조직으로부터 기원됨을 알수있었다.

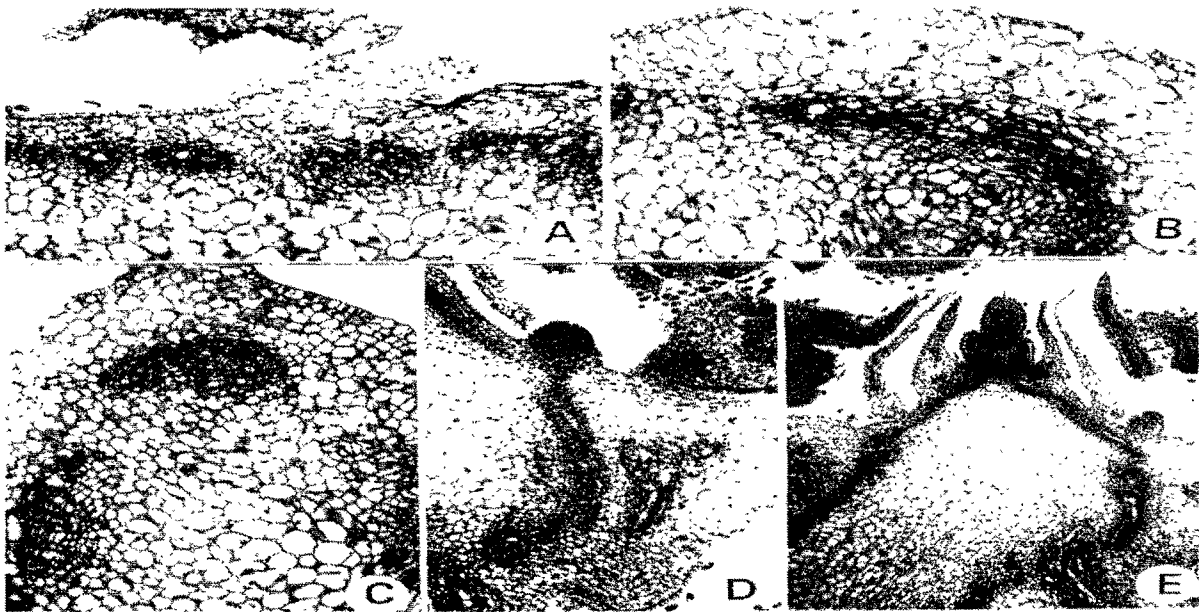


그림 6. Anatomy of adventitious bud formation from the cotyledon segments of immature zygotic embryo of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. A: Subepidermal cells divided periclinally(arrow); B: Adventitious bud primordia(arrows); C: Adventitious bud primordias linked vascular tissue(arrows); D: Adventitious bud primodium; E: Adventitious shoot

4. 고 찰

가. 미숙배와 BA농도

기관분화에 대한 연구에서 배양재료 선택은 가장 중요하다. Soybean, kidney bean, alfalfa 및 clover 등에서 성숙한 자엽절편을 이용하여 부정아를 유도 하거나(Moon et al., 1994; Allavena, 1984; McCoy and Walker, 1984; Phillips and Collins, 1984), 미숙배를 이용하여 부정아를 얻어(Ashis and Deepesh, 1990; Burger et al., 1990) 식물체가 분화 되기도 한다. 본 연구에서 동부의 미숙배와 성숙배를 여러가지 농도의 BA를 첨가한 MS 배지에서 배양 하였을때 미숙배의 경우 자엽절편당 부정아 형성율은 0.5 또는 1 mg/L BA가 첨가된 배지에서 그리고 부정아 수는 1 mg/L BA가 첨가 되었을때 가장 높은 것으로 나타났다. 그러나 성숙배의 경우 어느농도에서도 부정아는 형성 되지 않았다. 이러한 결과는 이전 우리연구에서 동부의 잎절편을 배양재료로 이용하였을 때 오직 부정근만이 발생된 결과(Ladeinde and Soh, 1991)와 하배측 절편에서 얻은 여러형태의 캘러스 [녹색반점의 캘러스(green spot callus), 연한 노란색의 캘러스(friable yellowish callus), 단단한 노란색의 캘러스(compact yellowish callus)] 에서 부정근이 발생된 결과(Cho et al., 1991) 등으로 볼때 동일 종이라 할 지라도 배양재료에 따라 다른 형태의 기관분화가 이루어진다는 것을 알수 있었으며, 미숙배의 자엽절편에서 부정아 형성에 대한 BA의 적정농도는 1 mg/L BA임을 알수 있었다. 또한 어린시기의 배일수록 배양 환경에 대한 적응력이 강하기 때문에 배지에 첨가된 호르몬에 의해 기관분화 패턴이 결정되기 쉽고, 성숙배일수록 그 능력이 상실 되었기 때문인 것으로 생각된다.

나. 미숙배의 자엽과 배측절편

미숙배의 자엽에 배측이 붙어 있으면 부정아가 형성되지 않았으며, 오직 배

축이 제거 되었을때 부정아가 형성되었다. 또한 부정아 형성과 부정아 수는 자엽만(one cotyledon) > 자엽기부쪽 절반(proximal segment) > 자엽말초부쪽 절반(distal segment) 순으로 높았으며, 이때 부정아 형성은 대부분 상처를 받은 기부쪽에서 이루어졌고, 말초부쪽 부위에서는 거의 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 배축이 붙은 재료에서는 경단분열조직의 정아우성 효과에 의해 부정아 발생이 억제 되었거나(Smulders et al., 1988), 자엽절편중 모든부위가 부정아 발생에 참여하는 것이 아니고 자엽절편의 극성효과(Lee-Stadelmann et al., 1989; Paterson, 1983)에 따라 일정한 부위에서 부정아 발생이 이루어진 것으로 생각된다. 또한 부정아 발생과 생장을 촉진하는 요인은 배지에 첨가된 호르몬의 영향도 중요 하지만 자엽내에 존재하는 내적인 물질, 즉 내재오옥신의 극성이동과(Moncousin et al., 1989) 이온의 흐름(Goodwin and Pateromichelakis, 1979) 등이 크게 관여 하였음을 추측할 수 있다.

다. 부정아의 발생기원

부정아의 발생기원은 Douglas fir의 자엽절편의 경우 하표피층(hypoepidermis)의 왕성한 세포분열에 의해(Cheah and Cheng, 1987), kidney bean의 자엽절의 경우 유관속조직의 주위 분열조직으로부터 직접 이루어 지므로(Chandra et al., 1991) 배양환경 및 재료에 따라 그 기원이 다를 수 있다. 동부의 자엽절편으로부터 부정아 형성은 미숙배자엽내부에 존재하는 유관속조직으로부터 기원되고 이어서 유관속조직의 주위 분열세포로부터 많은 부정아 원기가 형성되어 캘러스 표면부로 돌출되어 나오는 것을 관찰하였다.

제 3 절 콩 형질전환에 대한 문제점 및 해결 방안

1. 서 론

대두의 기내 식물체재생연구는 체세포배발생을 통하여 처음으로 보고 되었고 (Christianson et al., 1983), 이후 식물성장조절제의 적정농도(Finer and Nagasawa, 1988; Liu et al., 1992), 배양재료로서 미숙배의 중요성(Komatsuda, 1995), 오옥신과 sucrose의 상호작용 (Lazzeri et al., 1988; Komatsuda, 1992), 체세포배의 이상형태발생 (Choi et al., 1994), 체세포배의 성숙 및 식물체로의 전환 (Buchheim et al., 1989) 그리고 품종간 체세포배형성능 (Komatsuda, 1988) 등 많은 연구가 이루어져왔다. 특히 대두의 품종간 체세포배발생능 비교 연구는 전세계에서 수집한 약 300여개 품종을 대상으로 광범위하게 조사하여 대두의 식물체 재분화연구에 품종의 중요성이 강조된 바 있다(Komatsuda, 1992). 이와같이 기내 배양이 어려운 콩과식물에서 품종간 재분화능 비교 연구는 필수적이라 할 수 있으며, 배양재료로서 우수한 계통 또는 품종선택은 식물체 재생 및 유전적 형질전환 연구에 있어서 성공 여부를결정 지을 수 있는 중요한 과정이라할수있다 (Green, 1982; Rhodes et al., 1988a,b; Foroughi-Wehr and Friedt, 1981; Vasil et., 1990; Kamiya et., 1988). 이와 관련하여 Komatsuda (1992)는 체세포배발생에 대한 QTL 분석을 목적으로 체세포배발생능이 높은 품종 (Masshokutou Kou 502) 과 낮은 품종 (Keburi)의 교배로부터 117개 대두 재조합 순계주를 개발한 바 있다(Komatsuda, unpublished). 따라서 본 연구에서는 대두 기능유전체분석을 위한 고빈도 형질전환시스템을 개발할 목적으로 117개 재조합 순계주에 대한 체세포배발생능을 조사하고 고빈도 체세포배발생능계통으로부터 식물체 재생에 대한 연구를 수행하였다.

2. 재료 및방법

대두 117개의 재조합 순계주(RIL, recombinant inbred lines) F14 세대를 일본 농업생물자원연구소 유전다양성과로부터 공급받았다. 재조합순계주는 이전연구에서 체세포배발생능이 높은 *Glycine gracilis*의 semi-wild 변종인 Masshokutou Kou 502와 체세포배발생능이 낮은 *Glycine max*의 재배품종 Keburi를 (Komatsuda et al., 1992) 교배하여 single-seed descent 방법으로 개발하였다 (Komatsuda, unpublished). 본 실험에서는 2개 양친품종과 117개의 재조합순계주를 온실포장에 파종하여 85계통의 식물체를 얻었다. 개화후 15일째에 미숙배의 크기가 2.5-3 mm로 자란 꼬투리를 취하여 수돗물에 3-5회 수세한 후 종피와 배축을 제거한 자엽절편을 배양재료로 이용하였다. 체세포배유도배지 (SIM, Somatic Induce Medium)는 MS salt (Murashige and Skoog, 1962), B5비타민 (Gamborg et al., 1968), 40 mg⁻¹ 2,4-D (Finer and Nagasawa, 1988) 및 30 g⁻¹ sucrose를 조합하여 배지를 조성하였다. 배지는 4 g⁻¹ Phytigel을 첨가하기전 pH를 5.8로 조정하여 121℃, 1.2기압에서 15분간 고압 멸균후 90×15 mm 플라스틱 페트리디쉬에 25 ml씩 분주하여 사용하였으며, 페트리디쉬당 20개의 자엽절편을 치상하였다. 배양은 25℃로 조절되는 배양실에서 광도 46μmol m⁻²s⁻¹의 16시간 광주기에서 5주간 배양한 후 체세포배 발생빈도와 자엽당 체세포배발생수를 기록하였다. 일차 체세포배를 동일배지상에 옮겨 구형기의 2차체세포배로 증식하였으며, 성숙배지와 식물체전환배지(Komatsuda, 1992)에 옮겨 완전한 식물체로 생육시켰다. 모든 실험은 3회반복하였다.

3. 결과 및 고찰

대두 재배품종 (Keburi)과 semi-wild 변종 (Masshokutou Kou 502)의 교배로부터 얻은 117개의 재조합 순계주를 파종하여 85계통의 식물체로부터 개화 후 약 15일째에 미숙배를 얻었다. 미숙배로부터 자엽절편을 취하여 체세포배유도배지 (SIM)에 이식한 결과 배양 1주후 부터 자엽절편 가장자리에서 갈변되기 시작하여 3주째에는 거의 모든 부위가 갈색으로 변하였고, 자엽절편 가장자리와 가운데

에서 캘러스 형성 없이 체세포배가 형성 되기 시작하였다. 그러나 같은현상 없이 자엽으로부터 캘러스가 형성되거나 팽창되는 현상이 일어나는 계통에서는 체세포배가 거의 형성 되지 않았다 (데이터 미제시).

배양 5주 후 양친의 자엽절편으로부터 체세포배형성과 자엽당 체세포배 형성 수를 조사한 결과, 대두 재배품종인 Keburi에서는 체세포배가 관찰되지 않았으나, semi-wild변종인 Masshokutou Kou 502에서는 92%의형성빈도와자엽당 3.92개의체세포배가형성되었다. 이러한 결과는 품종간 체세포배발생능 차이가 분명함을 보여 주며, 체세포배발생능에 대한 약 300여개의 품종스크리닝 (Komatsuda, 1992)과 Masshokutou Kou 502와 Keburi에서자엽당각각 4.6개와 0.02개의체세포배가형성된다는 이전연구결과 (Ito et al., 1999)와 아주 잘 일치하였다.

양친의 교배로부터 얻은 재조합순계주 F14세대에서 85계통에 대한 체세포배 형성빈도와 형성 수를 비교한 결과, 36계통에서 0-10%의 낮은 체세포배 형성빈도와 자엽당 약 0.07개의 체세포배가 형성되었고, 37계통에서 11-49%의 형성빈도와 자엽당 약 0.90개의 체세포배가, 9계통에서 50-89%의 형성빈도와 자엽당 약 3.12개의 체세포배가 각각 형성되었으며, 90%이상의 고빈도 체세포배 형성빈도는 3계통에서만 관찰 되었고, 자엽당 6.36개의 체세포배가 형성되었다. 이러한 고빈도 체세포배발생능을 갖는 3계통의 일차배를 동일배지에 옮겨 2차배 증식방법으로 1년 이상 증식 및 유지할 수 있었으며, 체세포배를 성숙배지, 발아배지 및 식물체 전환배지 (Komatsuda, 1992)에 옮겨볼 때 체세포배중 약 25%정도가 정상 식물체로 생육하였다. 이러한 결과는 대두의 재조합 순계주에서 체세포배 형성능이 높은 계통은 양친 중 Masshokutou Kou 502의유전적특성이, 체세포배형성능이낮은계통은 Keburi의유전적특성이유전되었기때문인것으로사료되며, 특히 KM1032, KM1064 및 KM1010계통과 같이 체세포배 형성빈도가 각각 92%, 92% 및 100%로 그리고 자엽당 체세포배 형성수가 각각 4.77개, 8.23개 및 8.52개로 양친 (Masshokutou Kou 502) 보다 높게 나타난 것은 유전학적상가효과 (additive effect)에 의한 것으로 추측된다. 옥수수에서 부드러운 배발생캘러스를 순계주

A188에서 얻은 이후 (Green, 1982), 세포배양과 원형질체배양을 통하여 식물체 재생(Rhodes et al., 1988a)과 electroporation법에 의한 형질전환 식물체 생산이 가능하였고(Rhodes et al., 1988b), 보리품종 Dissa와 Igri에서 약배양에 의한 반수체 식물생산 (Foroughi-Wehr and Friedt, 1981)과 미숙 배배양에 의한 부드러운 배발생 캘러스 유도가 가능하였다(Luhrs and Lorz, 1987). 또한 밀품종 Chris에서 약, 화기 및 미숙배 배양에 의한 식물체 재생이 가능하였고 (Vasil et al., 1990), 벼에서 약 500개의 품종을 대상으로 스크리닝하여 고빈도 배발생 능품종을 선발한바있다 (Kamiya et al., 1988). 이와같이 대두를 포함한 많은 식물에서 동일종이라 할지라도 계통간 또는 품종간 체세포배발생능이나 식물체 재분화능에 있어서 현저한 차이가 있기 때문에 기내배양 이 어려운 종일수록 광위한 스크리닝 연구를 통해서 우수한 품종이나 계통선발과정이 필수적이라 할 수 있다. 본 연구에서도 117개의 재조합순계주에서 체세포배발생능이 우수한 KM1032, KM1064 및 KM1010 등 3계통을 선정하였으며, 이는 지금까지 매우 낮은 대두 식물체 재생율과 형질전환율을 향상시키는데 중요한 유전자원으로 활용될 수 있을 것이다.

외래 유용유전자 도입에 의한 식물의 형질전환 기술은 식물 생명공학 분야 중 가장 중요한 핵심 분야라 할 수 있으며, 이는 작물의 품종개량뿐 아니라 최근 insertion tagging line을 이용한 기능유전체 연구에서도 핵심기술로서 이용되고 있다. 예를 들면 제초제나 nematode 또는 다양한 기능성 유전자들을 사용하여 새로운 유전자 재조합 콩 품종 개발을 촉진 하거나, 다양한 고급 산업용 오일, 인쇄용 잉크, 대체 연료 등 여러 가지 산업용 재료로 이용할 수 있다. Monsanto 등 세계적 종묘회사에서 새로운 기능성 대두 품종들이 개발 되어 지금까지 미국에서 인증 받은 유전자 재조합 대두 품종은 Roundup Ready Soybean, High-Oleic Soybean 그리고 Liberty link Soybean으로 알려져 있으며, 이중 Roundup Ready Soybean은 미국에서 대두 총 재배 면적의 50% 이상을 차지하고 있다. 이와 같이 대두에서 고효율 형질전환 기술 개발은 새로운 대두 신품종 개발을 더욱 촉진시킬수 있을 뿐 아니라 Functional Genomics를 수행하기 위해

서 필요한 insertion mutant line 개발에도 이용할 수 있기 때문에 매우 중요하다 할 수 있다.

대표적으로 Collins, Finer 및 Parrot 그룹에서 개발한 미숙배 배양으로 부터 체세포 배발생 경로를 통한 식물체 재분화 방법을 이용하거나 (약 84편), Widholm, Hinchee 및 Sommer 그룹에서 개발한 자엽절이나 배축절편을 이용한 기관발생시스템 등을 이용하고 있다 (약 31편). 이러한 대두의 재분화시스템에 대한 기반 연구는 형질전환 시스템 개발 연구로 이어져 지금까지 약 40여 편의 형질전환 연구가 이루어졌다. 미국의 몬산토, 듀폰 그리고 일본의 저팬코바코 등 일부 기업들은 이러한 원천기술을 독점하고 있으며, 대두의 신품종 개발을 위하여 전력을 다하고 있는 실정이다. 그러나 이들 방법 역시 체세포 배에서 식물체로의 매우 낮은 전환율과 복잡한 배양 방법 그리고 낮은 기관발생빈도 등 불안정한 재분화시스템 때문에 매우 낮은 형질전환율 (약 0.5%)을 극복하지 못하고 있는 실정이다. 국내에서는 1994년 최 등에 의해 체세포배발생 경로를 통한 식물체 재생이 이루어진 이래 수 개의 재분화시스템이 개발되었고, 최근 씨앗에서 막 싹튼 줄기 부분에 머리카락 굵기의 침으로 찌른 뒤 Agrobacterium을 접종하는 형질전환 방법이 국내 연구진에 의해 개발된 바 있으나 아직 안정적으로 상용되고 있지는 않다 (최 등, 2001).

이와 같이 대두에서 형질전환시스템 개발은 먼저 안정화된 재분화시스템 확립이 필요하며 선결되어야 할 문제점으로 남아 있고

4. 결 론

많은 식물 중 담배나 애기장대를 모델식물로 식물형질전환 연구가 이루어질 수 있었던 것은 담배의 안정된 재분화 시스템과 애기장대의 고효율 형질전환 방법이 중요한 역할을 했고, 벼에서 Functional Genomics를 위한 knock-out mutant lines 확보를 위해서 개발된 고효율 형질전환시스템은 고효율 재분화 시스템이 확립되어 있기 때문에 가능했던 것이다. 이와 같이 식물의 형질전환 연

구는 여러 가지 요인에 의해서 성공 여부가 결정될 수 있으나 가장 중요한 것중 하나는 역시 고빈도의 안정된 재분화 시스템 확보라 할 수 있다.

대두에서 기내 재분화시스템은 체세포배발생과 기관발생을 통하여 이루어져 왔지만 체세포배발생시스템이 우세하다. 그러나 이러한 대두의 체세포배발생을 통한 식물체 재분화시스템 개발과정에서 가장 큰 문제중 하나는 기내배양 조건에서 형성된 체세포배와 접합자배를 형태적으로 동일하다는 관점에서 다루어 왔다는 것이다. 즉 기내 배양으로부터 형성된 대두 체세포배중에는 형태적으로 비정상인 체세포배가 높은 빈도로 포함 되어 있을 뿐 아니라 이는 체세포배의 전체 식물체 재분화율을 감소시키는 중요한 요인이 되고 있다(Choi, 1994). 이러한 현상은 대두 뿐 아니라 당근, 멜론, 더덕 등 대부분의 식물에서 나타 나며, 그 원인은 배지에 포함 되는 탄수화물, 옥옥신, 싸이토키닌 및 옥옥신 이동억제제 등으로 알려져 있다(Buchheim et al., 1989, Ammirato 1987, Kageyama et al., 1990, Soh et al., 1991, Lee and Soh, 1993a, b). 또한 정상 자엽과 비정상 자엽을 갖는 체세포배에서 재분화율은 매우 큰 차이를 나타 내며(Choi 1995, Two-cotyledons: 99%, Three-cotyledons: 46%, Four-cotyledons: 35%, Horn type: 3%), 그 원인은 체세포배의 경단분열조직의 구조와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다(Faure, 1990, Isabelle et al., 1993, Nickle and Yeung, 1993, Choi, 1995, 그림 7).

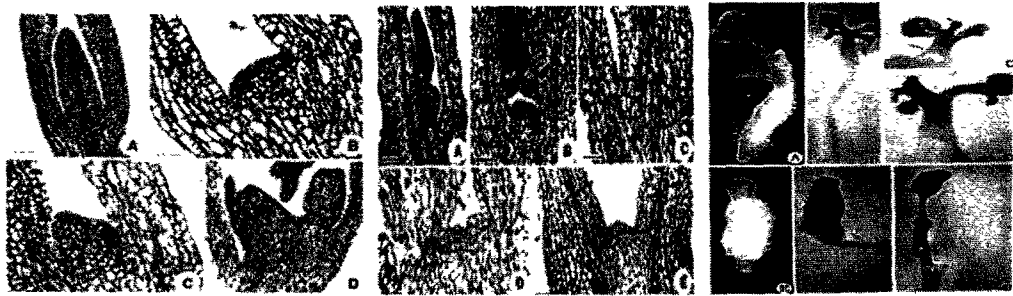


그림 7. 체세포배의 형태적변이, 경단분열조직의 특성 및 식물체 재생 (Choi 1995).

이와 같이 기내 배양세포로부터 얻은 체세포배에는 접합자배와 형태적으로 아주 다른 형태의 자엽을 갖는 비정상 체세포배가 존재하고 이들의 경단분열조직 또한 유조직화, 비정상 모양, 함몰형 등 접합자배의 경단분열조직과 다르게 발달 되기 때문에 체세포배의 재분화율을 감소시키는 중요한 원인이 되고 있다. 따라서 대두에서 체세포배발생을 통한 재분화율을 향상 시키기 위해서는 여러 가지 중요한 과정이 있겠지만 이중 가장 핵심이 되는 과정은 역시 대두의 동일 종 내 광범위한 genotype 스크리닝을 통해 고빈도 체세포배발생능 계통을 선발하고, 선발된 genotype을 이용하여 형태적으로 정상인 체세포배발생을 위한 최적 배지 조건 즉 정상적인 경단분열조직을 갖는 체세포배의 대량생산 조건 (예 : Sucrose 농도, 옥신 이동억제제의 첨가 유무, 호르몬 농도 등) 이 먼저 선정되어야 할 것으로 생각된다. 이러한 정상 체세포배발생은 대두의 재분화율을 향상시킬 뿐 아니라, 나아가 외래유전자가 도입된 체세포배의 재분화율도 향상시켜 형질전환체의 빈도를 향상시킬 것이다.

5. 문제점 및 해결방안 : 최적의 공동배양조건 확립

고빈도 재분화 재분화 시스템이 확보된 후에 아그로박테리움 공동배양법과 particle bombardment법을 이용하거나, SAAT (sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation, Trick et al, 1997) 방법과 같은 물리적 방법으로 최적의 형질전환 시스템이 확보 되어야 할 것이다. 이중 아그로박테리움에 의한 형질전환방법은 가장 일반적으로 사용되는 것으로 상처가 난 식물세포의 genome으로 T-DNA부위가 삽입되어 형질전환이 일어난다. 이 과정에서 가장 중요하게 고려해야 할 사항은 아그로박테리움과 식물절편간 공동배양시 여러 가지 화학적 또는 물리적 요소에 의하여 형질 전환율이 증·감될 수 있다. 예를 들면 *vir* 유전자의 활성을 위해서 acetosyringone과 hydroxy-acetosyringone을 배양액에 첨가 시키기도 하고, 낮은 온도처리에 의해 아그로박테리아의 pili형성 능력을 향상시킴으로서 형질전환율을 개선하기도 한다 (Fullner et al, 1996). 또한

polyvinylpyrrolidone이나 dithiothreitol, L-Cysteine 등과 같은 항 산화제를 첨가하여 아그로박테리움의 병원성에는 영향을 주지 않고 공동배양시 산화에 의해서 나타나는 식물세포의 괴사 또는 갈변화 현상을 억제 시켜 식물 절편의 생존율을 증가 시킴으로서 형질전환빈도를 증가시키는 경우도 있으며, 구리와 철과 같은 킬레이트 화합물을 첨가 함으로서 polyphenol산화제와 peroxidase의 기능 저해에 의한 형질전환율을 증가시키기도 한다 (Perl et al., 1996, Olhoft et al., 2001a,b). 이와 같이 아그로박테리움과 식물절편간 공동배양시 배지에 여러 가지 화합물을 첨가시키거나 물리적처리에 의한 형질전환율 향상을 꾀하고 있다. 그 외에도 식물종에 따른 최적 항생제농도 선정, 최적 발현벡터 조제, 최적 아그로박테리아 세포주 선정 등 여러 가지 중요한 문제점을 고려해 볼수 있을 것이다.

결론적으로 식물에 있어서 형질전환 성공 여부는 고빈도 재분화 시스템 확보와 최적 공동배양 조건 확보가 가장 중요하게 선행 되어져야 할 연구분야라 생각되며, 특히 식물체 재생이 어려운 작물로 알려진 대두에서는 체세포배를 통한 고빈도 재분화 시스템을 확보하든가 아니면 대량의 genotype 스크리닝을 통한 고빈도 기관분화능 계통을 선발하는 것이 가장 중요하게 선행되어야 할 연구 단계라 생각 된다.

제 4 절 기관발생을 통한 식물체 재분화시스템 개발

1. 대두 800 품종에 대한 기관발생능 스크리닝

Genotype Screening(800품종 이상)을 통한 최적 genotype 선정을 위하여 국내외 대두 품종 약 1,100 line중 약 800 line을 대상으로 기관분화능에 대한 1차 스크리닝을 완료 하였으며, 이중 기관발생능을 갖는 23개 line을 대상으로 2차 스크리닝을 수행하였다. 1차 스크리닝에 사용한 배지로는 1년차 64조합 배지 스크리닝에서 얻은 4종류 호르몬조합 즉, NAA0.1 mg/L가 첨가된 MS배지에 BAP, Tidiuron, Zeatin, Kinetin을 각각 3.2 mg/L씩 조합 첨가한 배지(Tn, Zn, Kn, Bn)에서 수행하였으며, 2차 스크리닝에서 사용한 배지로는 이들 호르몬의 농도를 여러농도로 조합한 32개의 배지에서 수행하였다. 1차 스크리닝에서 기관발생능을 갖는 line은 약 1,100개 line중 23개 line이었으며, 나머지 1,077 line에서는 shoot발생이 이루어지지 않았다 (표 5). 또한 1차 스크리닝에서 선정된 23개 line에 대하여 기관발생능을 극대화 하기 위하여 32조합의 배지와 잎절편 및 배축절편을 대상으로 조사한 결과 최종적으로 2 품종 1049 line (49.1%)과 888 line(38.2%)에서 가장 높은 shoot발생율을 나타 냈다 (그림 8). 따라서 2품종 즉, 1049 line과 888 line을 향후 대두의 기관분화를 통한 형질전환시스템 확립에 이용하기 위하여 최종 선정 하였다.

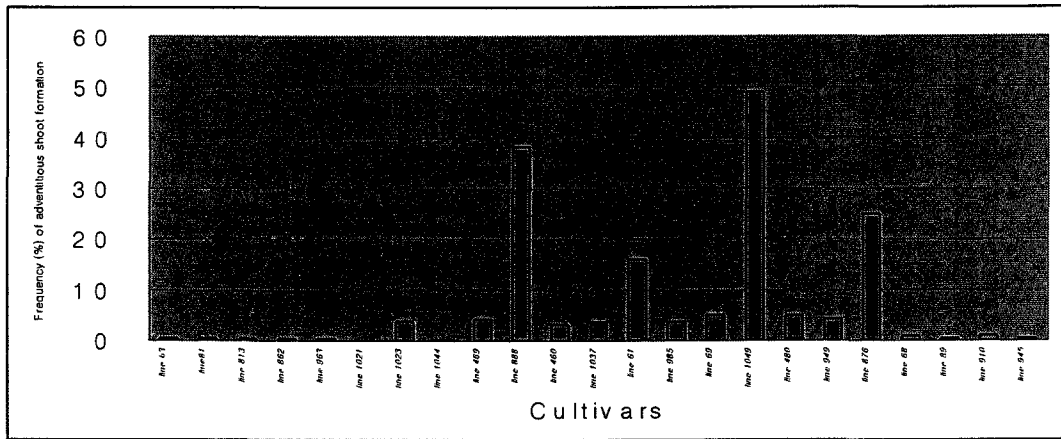


그림 8. 기관분화능을 갖는 23개 품종에 대한 부정아 형성을

표 5. 국내외 품종 약 1,100 line중 기관 분화능을 갖는 23개 line

Code NO.	Genotypes	절편	호르몬 조합			
			BN	ZN	TN	KN
61	AMURSZKAJA 41	잎				
		배측	0			
63	AMUVSKAJE	잎				
		배측		0		
68	AO BISHI G.m	잎				
		배측		0	0	
69	AO CHOUHIN 1 G.m	잎				
		배측		0		
81	asahi mame g.M	잎				
		배측	0			
89	B52	잎	0			
		배측				
813	KM011	잎				0
		배측				
862	KM083	잎				
		배측				0
876	KM012	잎				
		배측	0			
888	KM115	잎				
		배측	0			
910	FAYTTE1	잎				
		배측				0
945	KM061	잎				
		배측		0		
949	KM073	잎				
		배측		0		
963	원576-1	잎			0	
		배측			0	
985	원590-16	잎				
		배측				0
1021	원 608-5	잎				
		배측	0			
1023	원608-8	잎				
		배측	0			
1037	원612-18	잎				
		배측	0			
1044	원614-9	잎				
		배측	0			
1049	원683-6	잎				
		배측	0			
469	NEPAL (ACC0164)	잎				
		배측	0			
460	MUTSUMEJIRO	잎				
		배측		0		
480	OGURA DAIZU G.m	잎				
		배측	0			

2. 기관발생을 위한 최적 호르몬 조합 스크리닝

최적배지 선정을 위하여 MS기본배지에 싸이토키닌으로는 Tidiazuron, Zeatin, kinetin, BAP를 옥신으로는 NAA와 2,4-D를 여러 가지 농도로 조합 첨가하여 32개의 배지를 조제하였다. 32조합 모든 배지에서 shoot가 발생하였으나, 이중 MS + 0.1 mg/L NAA + 3.0 mg/L BAP (25.0%), MS + 0.5 mg/L 2,4-D + 6.0 mg/L BAP (25.0%), MS + 0.1 mg/L 2,4-D + 6.0 mg/L kinetin (25.0%)로 조제된 배지에서 높게 나타났으며, 그 중 가장 높게 나타난 배지는 기관 발생율이 약 37.5%로 MS배지에 0.5 mg/L NAA와 6.0 mg/L zeatin이 첨가 되었을 때 가장 높은 발생율을 보여 주었다 (그림 9). 그러나 호르몬중에는 Tidiazuron이 다른 싸이토카닌보다 그리고 NAA가 2,4-D보다는 기관발생율이 높은 것으로 나타났다. 따라서 본 연구 결과를 바탕으로 대두의 기관발생을 위한 최적배지로서 MS 기본배지에 0.5 mg/L NAA와 6.0 mg/L zeatin이 첨가된 배지를 최적배지로 선정하였다.

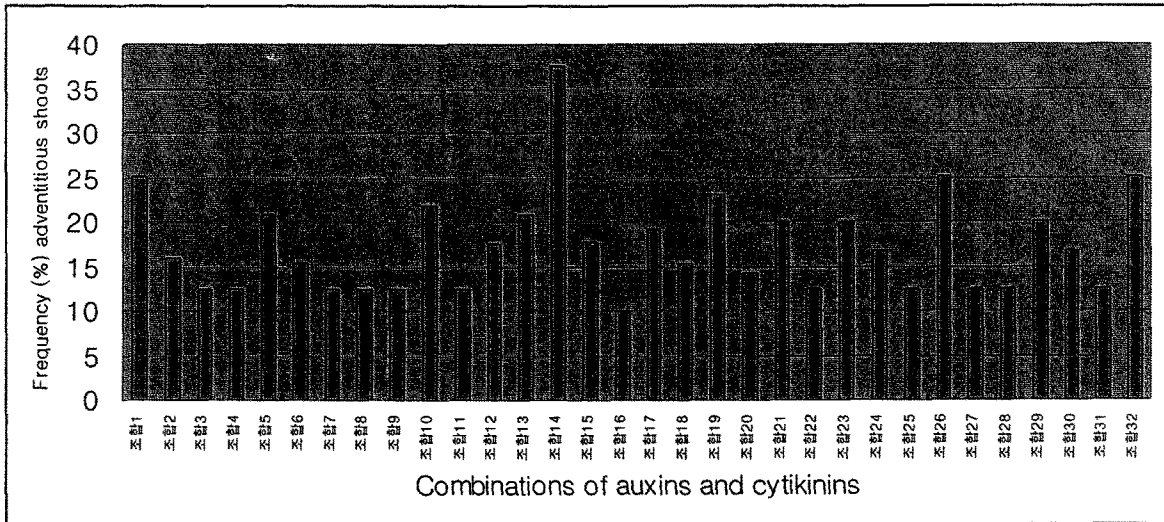


그림 9. 싸이토키닌과 옥옥신조합에 따른 부정아 형성을

3. 대두의 기관발생을 통한 식물체 재분화시스템 확립

대두 기관발생능에 대한 최적 배양절편을 선정하기 위하여 1년차 스크리닝에서 얻어진 여러 가지배양절편중 잎과 배측절편을 대상으로 조사하였다. 32개 배지 대부분에서 잎절편보다는 배측절편으로부터 기관발생율이 높게 나타남으로써 형질전환을 위한 배양재료로서 배측절편을 선정하였다 (그림 10).

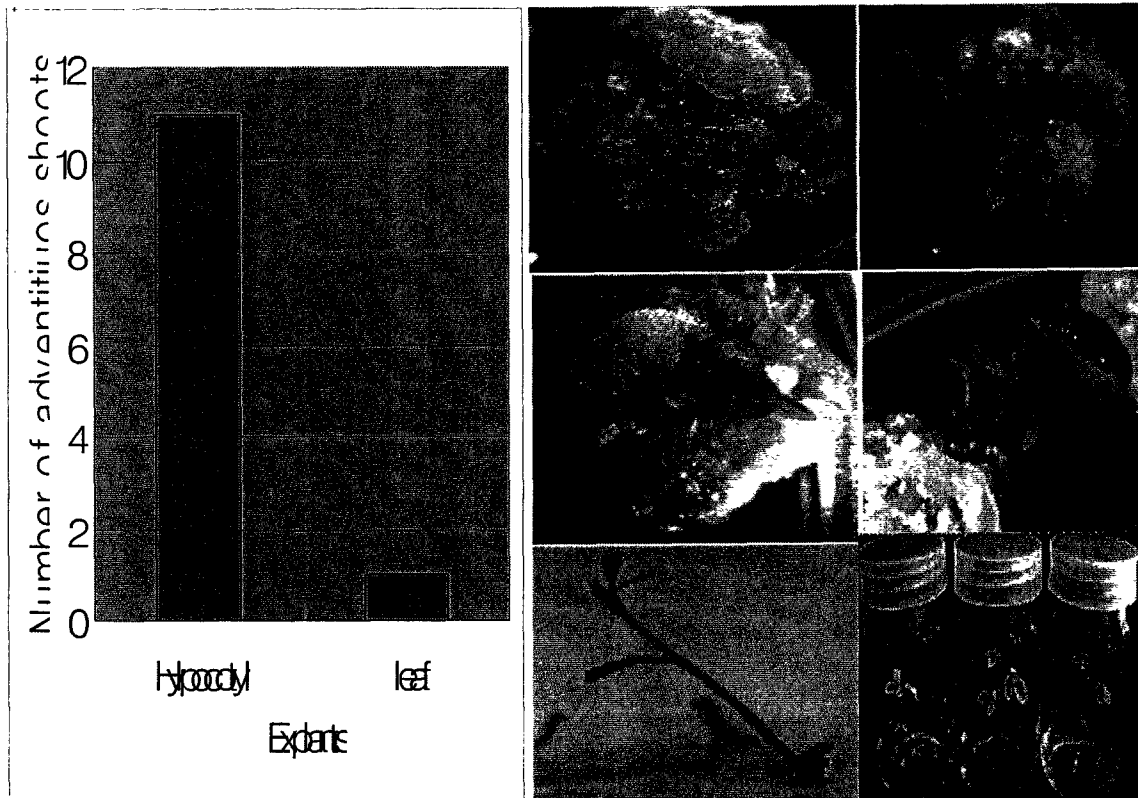


그림 10. 배양절편에 따른 부정아 수 및 형성 과정

제 5 절 체세포배발생을 통한 대두 형질전환 연구

1. 미숙배배양으로 체세포배발생 및 캘러스 유지

대두 체세포배 발생능 캘러스 유지 및 증식을 위하여 1년차 연구에서 117개 genotype중 체세포배 배발생배발생능 90%이상되는 4품종을 대상으로 온실에서 생육시켜 1.5 - 2.5 mm크기의 미숙배를 얻었으며, 이들 미숙배를 40 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에서 1달동안 배양하면서 배발생능 캘러스를 유도 하였다. 배발생 캘러스는 4주간격으로 계대배양하면서 유지 및 증식하였다.

2. 체세포배자엽변이와 2,4-D농도의 상관성

체세포배에서 식물체로의 전환에 있어서 여러 가지 중요한 요인이 있다. 이중 체세포배의 형태적변이 즉 자엽의 변이는 체세포배에서 경단분열조직을 비정상 또는 유조직화 시킴으로서 식물체로의 전환을 저해시키는 중요한 요인이 될 수 있다. 이러한 체세포배의 자엽변이를 일으키는 요인중 2,4-D는 중요한 요인이고 이에 대한 연구는 필요하다. 특히 대두에서 체세포배 유도배지에는 다른 식물에 비하여 매우 높은 농도 (40 mg/L 2,4-D)가 첨가되기 때문에 체세포배의 형태적 변이와 2,4-D농도의 상관관계를 조사할 필요가 있다. 대두 체세포배중에는 한 개의 자엽을 갖는 체세포배, 두 개의 자엽을 갖는 정상적인 체세포배 및 나팔형의 체세포배 그리고 발달이 더 이상 진행되지 않는 구형기의 체세포배가 관찰 되었다. 또한 이들 체세포배의 형태는 2,4-D 농도에 따라 뚜렷하게 차이가 나는 것으로 나타났다. 즉, 0.1-0.2 mg/L의 낮은 농도에서는 나팔형과 하나의 자엽을 갖는 체세포배보다는 두 개의 자엽을 갖는 정상 형태의 체세포배 빈도가 약간 많았으며, 0.5-4 mg/L까지는 2,4-D 농도가 증가 할수록 나팔형의 체세포배수가 증가하는 반면, 두 개의 자엽을 갖는 체세포배는 감소하였다. 그리고 구형기의 체세포배는 4 mg/L 이상의 2,4-D 농도에서부터 아주 낮은 빈도로 관찰되기 시작 하였으며, 10 mg/L 이상의 고농도에서는 모두 구형기의 체세포배만 관찰 되었다 (표 6).

표 6. 대두의 체세포배에서 자엽변이와 2,4-D농도의 상관 관계

2,4-D Conc. (mg/L)	Cotyledonary variation of somatic embryos (%)			
	Two	One	Horn	Others
0.1	67	33	0	0
0.2	42	29	29	0
0.5	42	21	54	0
1	21	14	65	0
2	18	18	64	0
4	27	30	30	13
10	0	0	0	100
20	0	0	0	100
30	0	0	0	100

3. 대두 배발생캘러스를 이용한 형질전환

Agrobacterium법 및 Particle bombardment법에 의한 대두 체세포배 형질전환을 위하여 40 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지에서 증식된 일부 배발생캘러스를 agrobacterium (LBA4404)와 공동배양하거나 particle bombardment법으로 형질전환시켰다. 이들 배발생캘러스를 15 mg/L hygromycin이 첨가된 증식배지에서 4주간격으로 계대배양하면서 형질전환된 캘러스를 선발하였다. 대부분의 배발생캘러스는 선발배지에서 갈변현상을 보이거나 백색화 현상을 보이면서 괴사 하였으며, 그중 일부 배발생캘러스에서 약간씩 증식되는 배발생캘러스를 선발하였다. 이와 같이 선발배지에서 증식된 배발생캘러스의 일부를 분리하여 GUS stain을 수행한 결과 gus 유전자가 발현되고 있음을 확인 하였다 (그림 11).

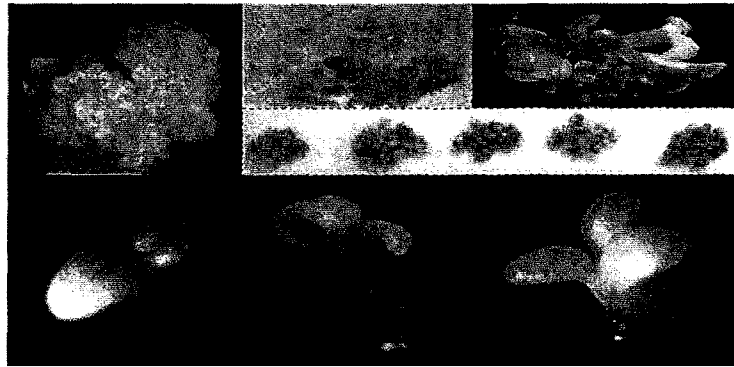


그림 11. 대두 체세포배에서 GUS유전자 발현

제 6 절 대두 자엽절 공동배양법을 이용한 형질전환 시스템 개발

1. 서 론

대두의 고효율 형질전환 기술 개발은 새로운 대두 신품종 개발을 더욱 촉진시킬 수 있을 뿐 아니라 Functional Genomics 연구를 수행하기 위한 insertion mutant line 생산에서도 필수적으로 이용될 수 있을 것이다. 대두 형질전환시스템은 미숙 배 배양으로 부터 체세포 배발생 이나 (Cahoon et al., 2000, Hazel et al., 1998)과 자엽절이나 배측절편을 이용한 기관발생을 (Clemente et al., 2000, Xing et al., 2000, Meurer et al., 1998) 통한 *Agrobacterium* 공동배양법 (Hinchee et al., 1988)과 particle bombardment법 (McCabe et al., 1988)으로 대두 형질전환체를 생산하여 왔다. 이 후 대두의 형질전환율을 증대시키기 위한 벡터의 최적화 (Hadi et al., 1996), 최적 선발마커 개발 (Zhang et al., 1999) 및 고빈도 재분화능을 갖는 품종 선별 (Simmonds and Donaldson, 2000, Choi et al., 2001) 등 많은 연구가 이루어져 왔다. 이러한 기 연구를 바탕으로 대두에서 바이러스 저항성 (Di et al., 1996), 제초제 저항성 (Padgett et al., 1995), 해충 저항성 (Stewart et al., 1996) 및 lysine 함량 증가 (Falco et al., 1995) 등 많은 형질전환체를 생산하여 왔다. 그러나 이러한 대두의 형질전환효율 증진과 신품종 육성을 위한 연구가 진행 되어 왔음에도 불구하고 아직까지 Monsanto, Tom Clemente 실험실 등 제한된 소수 연구 그룹에서 성공 하였을 뿐 국내에서는 아직까지 어려운 작물로 분류되어 있고, 형질전환체의 후대 검증을 통한 외래유전자의 발현을 확인한 바 없다.

따라서 본 연구에서는 자엽 절 아그로박테리움 공동배양법 (Zhang et al., 1999)으로 재분화능이 높은 #1049와 국내외 3개 품종을 대상으로 아그로박테리아 균주에 따른 형질전환과 후대 검증을 통한 안정적 형질전환시스템을 확보 하였기에 보고 하고자 한다.

2. 재료 및 방법

가. 식물 재료

1,000개 genotypes 으로부터 선발된 기관 발생능이 높은 계통 (1049, unpublished 데이터)과 국내·외 3품종 (백운, 무안, Thorne) 종자를 12N 염산가스 노출 법 (Di et al., 1996)으로 2일간 표면 살균하였다. 2% sucrose와 0.8% agar가 첨가된 MS기본배지 (Murashige and Skoog, 1962)에 페트리디쉬당 10개의 종자를 치상하고 16시간 광주기하에서 5일 동안 발아시켰다. 모든 배지는 autoclave전 1N HCl과 1N KOH로 pH 5.8로 조정하였다. 배양 5일 후 발아된 유식물체로부터 약 5 mm의 배축이 포함되게 배축과 뿌리부위를 제거한 후 다시 자엽과 자엽사이를 종단으로 절단 하여 2개의 절편을 얻었다. 자엽사이에 있는 유경조직을 해부현미경 하에서 제거하고 Agrobacterium과 공동배양하기 위한 절편으로 사용하였다.

나. Agrobacterium tumefaciens strains

CaMV35S프로모터, β -glucuronidase (GUS)유전자와 bar유전자를 선발표지로 포함하고 있는 pCAMBIA3301과 pPTN289벡터를 freeze-thaw방법으로 LBA4404, EHA101, GV3101 및 C58C1에 각각 형질전환 하여 균주로 사용하였다 (Jefferson et al., 1987). 50 mg⁻¹ streptomycin과 50 mg⁻¹ spectinomycin이 첨가된 LB액체배지와 50 mg⁻¹ kanamycin (pPTN289)과 50 mg⁻¹ rifampicin이 첨가된 LB액체배지 (pCAMBIA3301) 각 50 ml에 colony를 접종하여 28℃로 8시간 이상 배양한 후 대수기 상태(OD₆₅₀ = 0.6 - 1.0)의 균용액을 얻어 사용하였다.

다. 형질전환체 생산

약 30 - 40개 자엽 절 절편을 25 ml의 *Agrobacterium* 용액에 30분 동안 침지한 후 공동배양용 배지 (CM)가 첨가된 페트리디쉬에 5개씩 치상하여 3일 동안 공동 배양하였다. 공동 배양된 자엽 절 절편을 shoot 유도 액체배지 (SI)로 3 - 5회 수 세한 후 5 mg^{-1} glufosinate가 첨가된 shoot 유도 고체배지 (SI)에 옮겨 2주 동안 배양하였다. 배양 2주 후 각 절편으로부터 갈변된 배축 부위를 제거하고 동일 배 지상에 4주 동안 배양 하였다. 배양 4주 후 탈분화된 자엽절로부터 유도된 shoot 를 분리하여 shoot 신장배지 (SE)에 옮겨 3 cm 이상 신장시켰으며, 부정근유도배 지 (RI)에 옮겨 유식물체를 얻었다. 모든 배지는 Zhang's 등의 방법 (1999)에 따 라 조제 하였으며, 4 g^{-1} Phytigel을 첨가하기 전 pH를 5.8로 조정하여 121°C , 1.2기압에서 15분간 고압 멸균 하였다. 배지는 $90 \times 15 \text{ mm}$ 플라스틱 페트리디쉬 에 25 ml씩 분주하여 사용하였다. 배양은 24°C 로 조절되는 배양실에서 광도 $46 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 16시간 광주기에서 배양 하였다. 선발배지에서 얻은 유식물체는 토양으로 옮겨 온실 하에서 순화 한 후 종자를 수확 하였다.

라. β -Glucuronidase (GUS) 활성조사

Zhang's방법에 따라 선발된 유식물체로부터 잎절편을 채취한 후 37°C 에서 5-bromo-4-chloro-3-indole-glucuronidase 용액에 침지 시켰다 (Jefferson et al., 1987). 24시간 후 70% 알코올 용액으로 탈색 시킨 후 GUS 양성 반응을 보인 식 물체의 빈도를 조사하였다. 대조구로서는 *Agrobacterium*과 공동배양하지 않은 식물체의 잎 절편을 사용하였다.

마. Leaf painting 및 Southern 분석

GUS 양성반응을 나타낸 식물체 (T0세대)로부터 종자(T1세대)를 얻었다. 후대 종자 (T1세대)를 토양에 파종하여 온실에서 생육 시켰다. 파종 후 식물체의 크기 가 30 cm 이상 되었을 때 1차 잎 표면에 0.1% 바스타 (Aventis)를 솜으로 처리

하였다. 5일 후 제초제에 대한 내성을 나타낸 식물체의 잎 조직으로부터 genomic DNA를 추출하였다 (Dellaporta et al., 1983). 10 μ g의 DNA를 Hind III 제한효소 반응액에 37°C에서 16시간 동안 반응시켜 절단 한 후 0.8% agarose 겔에 전기영동 하였다. Agarose 겔 상의 DNA 밴드를 Zeta[®]-Probe nylon membrane (Bio-Rad, catalog #162-0196)에 옮겨 32^P-dCTP (Stratagene, catalog #300385)로 표지된 약 1.5 kb bar probe를 이용하여 Southern 분석 하였다 (Southern, 1975).

3. 결과 및 고찰

전 세계로부터 수집한 1,000개 이상의 genotype에 대한 기관발생능을 0.1 mg⁻¹ NAA와 3.2 mg⁻¹ 사이토키닌 (BA, tidiazuron, zeatin, kinetin)을 각각 조합 첨가한 MS배지에서 조사 하여 45% 이상 기관발생능을 갖는 1 계통 (#1049)을 선정 하였다 (unpublished 데이터). #1049와 3개 품종을 자엽 절 공동배양법 (Zhang et al., 1999)으로 형질전환을 시도한 결과, 배양 2주 후 상처를 받은 자엽 절 부위에서 아주 빠른 성장을 보이는 shoot가 발생하였으나 chimeric으로 추정되어 제거 하였다. 배양 2주째 형성된 shoot를 배측 부위와 함께 제거하고 탈분화된 자엽 절 절편을 다시 동일배지에 옮겨 2주 동안 배양할 경우 녹색반점을 갖는 많은 부정아 원기가 형성되었다. 부정아 원기는 선발배지에서 탈분화되거나 검은 색으로 점차 갈변되는 주위 조직과는 뚜렷이 구분 되었으며, 배양 6주째 이러한 원기로부터 2 - 3 mm 크기의 multiple shoot를 얻을수 있었다. 배양 6주후 건강하게 자란 shoot를 분리하여 shoot신장배지 (SI)에 옮겨 배양하면서 3 cm이상되게 신장 시켰다. 배양절편으로부터 shoot를 분리하여 부정근유도배지에서 뿌리를 유도 하였으며, 이후 토양에 옮겨 순화시켰다 (그림 12). 일반적으로 5 mg⁻¹ glufosinate가 첨가된 선발배지에서 대두의 배양절편은 갈변되면서 점차 괴사 된다 (Zhang et al., 1999). 이러한 현상은 glufosinate가 상처를 받은 배양절편의 목부와 사부조직으로 흡수 되어 (Shelp et al., 1992) 형질전환이 일어나지 않은 세

포의 경우 암모니아 축적으로 세포내 인산화과정을 저해시킴으로서 괴사현상이 나타나고, 형질전환이 일어난 세포의 경우 phosphinothricin acetyl transferase (PAT)효소를 합성함으로써 세포내로 흡수된 glufosinate를 불활성 형태로 전환시킴으로써 저항성을 갖게 한다 (Muller et al., 2001). 따라서 배양기간 동안 나타나는 자엽절 갈변현상과 괴사현상은 배지에 첨가된 glufosinate에 의해 나타난 현상이며, 새롭게 형성된 multiple shoot의 경우는 T-DNA의 bar유전자가 대두 genome에 도입 되어 발현됨으로써 저항성을 갖게 된 것으로 생각된다.

5 mg⁻¹ glufosinate가 첨가된 선발배지에서 1,412개의 자엽 절 절편으로부터 106개의 glufosinate 저항성 유식물체를 얻을 수 있었으며, 이중 GUS 양성반응을 나타낸 식물체는 11개체로 낮은 형질 전환율 (0.77%)을 나타내었다 (그림 12). 그러나 각 품종에서 얻어진 GUS 양성반응 식물체를 보면 #1049에서 6개체 (1.8%), 백운콩에서 1개체 (0.46%), Thorne에서 5개체 (1.72%)를 각각 얻을 수 있었으며, 무안콩에서는 얻지 못하였다. 이와 같이 계통 또는 품종에 따라 형질전환 빈도의 차이를 볼 수 있었으며, 특히 이전 1,000 계통 스크리닝으로부터 높은 기관발생능을 보인 #1049계통에서 국내·외 품종에 비해 높게 나타났다. 이러한 결과는 형질전환빈도가 품종의 기관발생능과 밀접한 관계에 있다는 연구 결과 (Simmonds and Donaldson 2000)와 일치되며, 이는 옥수수에서 식물체 재분화능과 형질전환에 있어서 A188계통의 중요성이 확인 된 후 (Green 1982), 세포배양과 원형질체 배양을 통한 식물체재생 (Rhodes et al. 1988a) 및 electroporation법에 의한 형질전환식물체 생산 등에서도 확인 되었다 (Rhodes et al. 1988b). 이와 같이 대두 뿐 아니라 많은 식물에서 계통 또는 품종의 선발과정은 안정적 형질전환시스템 확립에 중요한 요인이 될 수 있다. 특히 대두와 같이 계통 간 또는 품종 간 식물체 재분화능에 있어서 현저한 차이가 있고, 기내 배양이 어려운 종일수록 광범위한 스크리닝 연구를 통해서 우수한 품종이나 계통 선발과정은 필수적이라 할 수 있다.

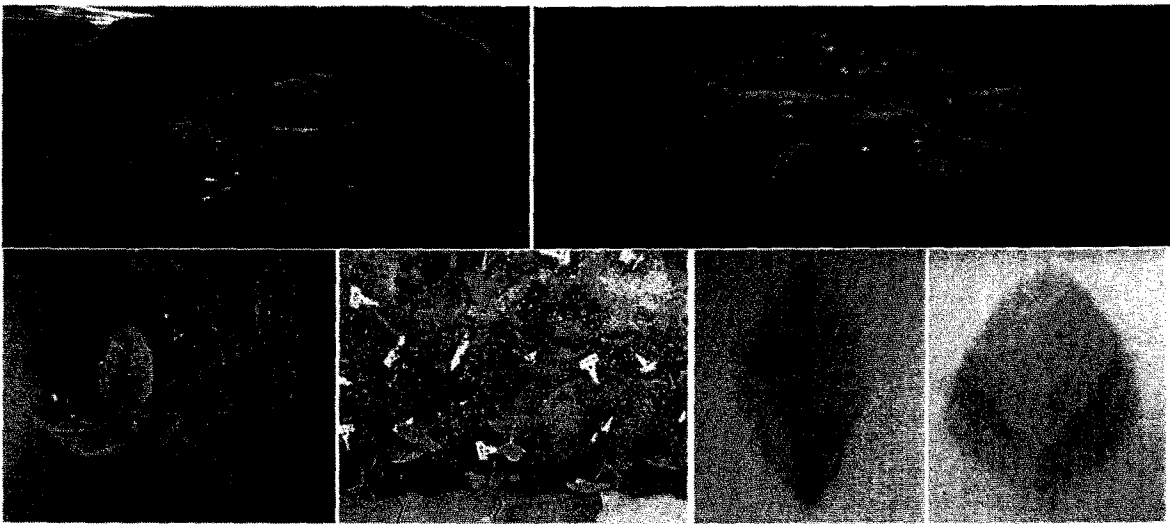
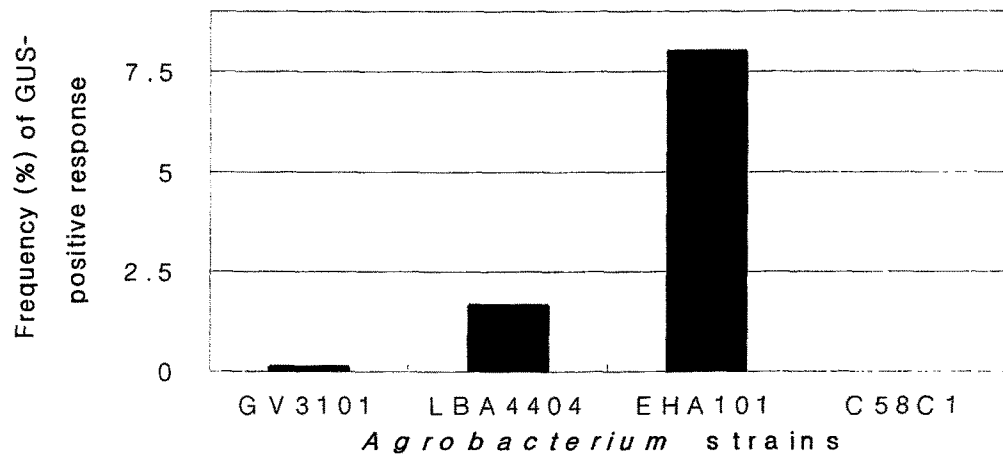


그림 12. 대두 자엽절 공동배양법을 통한 형질전환 및 GUS발현 확인

Agrobacterium 균주에 따른 형질전환율을 비교해 보면 pCAMBIA3301로 형질전환된 LBA4404에서 3.1%, GV3101에서 1.6% 그리고 C58C1에서 0.0%의 GUS 양성반응을 보였고, pPTN289로 형질전환된 EHA101에서는 3.6%로 가장 높게 나타났다 (그림 13). 그러나 pPTN289로 형질전환된 다른 균주 (LBA4404, GV3101, C58C1)와 pCAMBIA3301로 형질전환된 EHA101에서 아직 형질전환체를 얻지 못하였다. 이러한 결과는 대두의 체세포배발생능이 높은 계통에서 Agrobacterium 균주 (A281, C58, ACH5)의 감염성이 품종과 Agrobacterium의 종류에 따라 다르다는 연구 결과 (Simmonds and Donaldson, 2000)와 아주 잘 일치하고 있으며, 이는 13개의 벼 품종과 pTOK233벡터를 포함하는 LBA4404의 감염성을 조사 하였을 때 동진벼, 화영벼 및 낙동벼는 높은 감염성이 그리고 밀양 23호, 낙동벼 및 삼강벼에서는 낮은 감염성을 나타낸 연구(Lee et al., 1999)와 *Coleus blumei*에서 C58C1, GV3101, A281보다 B6S3 균주가 높은 감염성을 보여 준 연구(Bauer et al., 2002) 등에서도 확인되었다. 이와 같이 Agrobacterium 균주의 감염성은 그 균주의 종류에 따라 그리고 식물의 계통, 품종 및 종에 따라서도 다르게 나타나기 때문에 안정적 그리고 고효율 형질전환 시스템을 확보하기 위해서는 최적 품종 및 Agrobacterium 선택이 필수적이라 할수 있다.



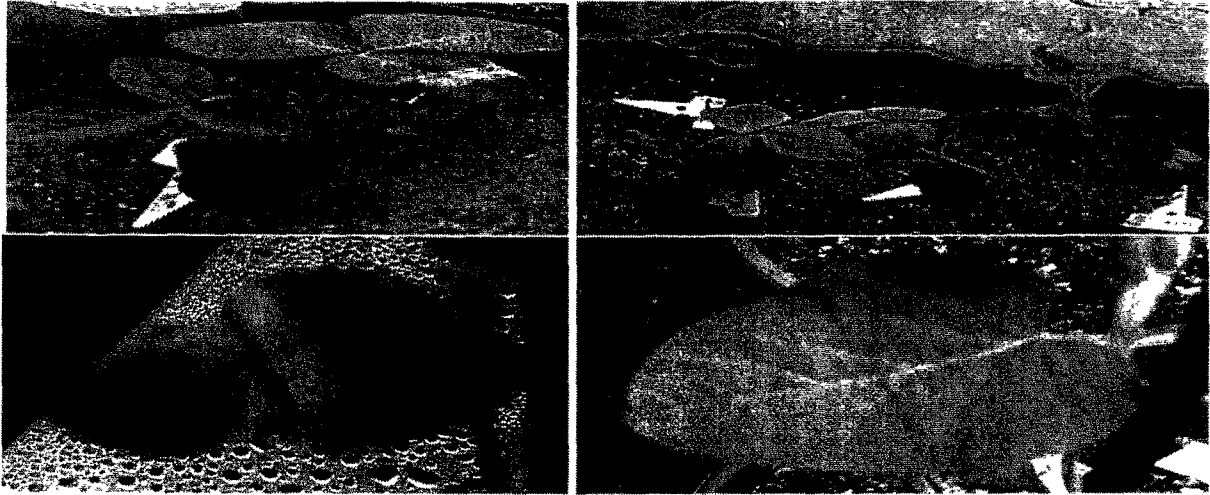


그림 14. 대두 형질전환체(F1)에서 제초제 저항성 테스트

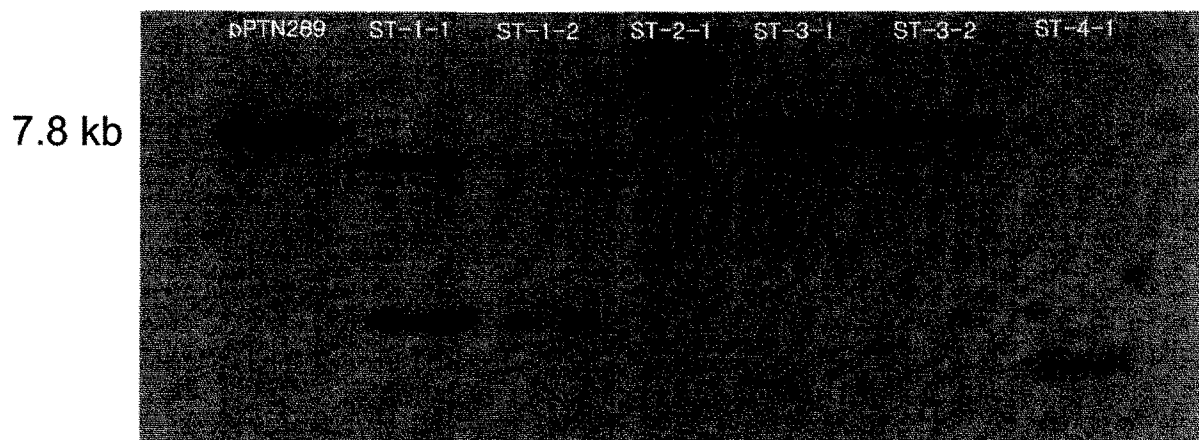


그림 15. 대두 형질전환체 (F1세대)에서 Southern blot analysis

기내에서 성숙한 유식물체 (약 10 cm)를 토양에 이식하여 성숙 시킨 후 4개의 GUS양성반응을 나타내는 식물체 (ST-1, ST-2, ST-3, ST-4)로부터 후대 종자 (T1)를 얻었다. 각 형질전환체로부터 수확한 종자 (T1세대) 중 무작위로 1개에서 5개씩 토양에 파종하여 성숙한 식물체를 얻었고 3주정도 자란 식물체의 1차엽에 바스타 (basta)처리를 하여 제초제에 대한 저항성을 조사한 결과 ST-1계통의 5개체 중 4개체에서, ST-2계통 5개체 모두, ST-3계통에서 1개체에서, ST-4계통 4개체 모두에서 저항성이 갖는 것으로 나타났다. 그러나 대조군의 경우 basta가 처리된 잎의 경우 3일째부터 잎이 갈변되면서 점차 괴사되어 저항성이 없는 것으로 나타났다 (그림 14). 또한 이러한 저항성을 갖는 식물의 잎 (6개체)으로부터 추출한 genomic DNA를 Southern분석 결과 ST-1-1과 ST-1-2에서는 2 copy가, ST-3-1, ST-3-2, ST-4-1에서는 1 copy가 식물체 genome에 삽입되어 있었으나, ST-2-1의 경우는 확인 할 수 없었다 (그림 15). 따라서 자연 절 공동배양법에 의해 도입된 bar유전자가 대두 genome에 삽입되어 다음 세대로 유전되어 후대에서도 안정적으로 발현되고 있음을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 확립한 대두의 안정적 형질전환방법은 향후 새로운 대두 신품종 개발을 더욱 촉진시킬 수 있을 뿐 아니라 대두 기능유전체 연구를 수행하기 위한 insertion mutant line개발에도 이용될 수 있을 것으로 사료 된다.

사사. 본 연구는 과학기술부 작물유전체기능연구사업단 과제 (CG2121)로부터 지원받았으며, 네브라스카대학 Tom Clemente박사로부터 대두 (throne)품종과 pPTN289벡터를 그리고 Takao Komatsuda박사로부터 #1049 genotype을 공급 받아 수행하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

번호	세부연구목표	달성내용	달성도 (%)
1	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기관분화 연구 - genotype Screening (800 품종 이상) - 최적 Genotype 선정 - 최적배지 선정 - 배양절편 선정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기관분화 연구 - genotype Screening 완료 (800 품종) - 최적 Genotype 선정 - 최적배지 선정 - 최적 호르몬 종류 선정 - 최적 배양절편 선정 	100
2	<ul style="list-style-type: none"> ○ 체세포배를 이용한 형질전환 연구 - 배발생캘러스 유지 및 증식 - 정상자엽발생을 위한 배양조건 - Agrobacterium법 및 Particle bombardment법으로 형질전환 - 최적 항생제 농도 선정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 체세포배를 이용한 형질전환 연구 - 충분한 배발생캘러스 유지 및 증식 - 정상 체세포배 발생을 위한 2,4-D 농도 - Agrobacterium법 형질전환 - 최적 항생제 농도 선정 	100
3	<ul style="list-style-type: none"> 1. Consensus 형질전환시스템 개발 ○ 최적 Agrobacterium strain 선정 ○ 최적 대두 형질전환 조건 확립 ○ 모델 형질전환시스템 확립 	<ul style="list-style-type: none"> ○ pPTN289와 pCAMBIA3301로 형질전환된 EHA101, EHA105, GV3101, LBA4404를 이용하여 대두 자엽절과 공동배양한 결과 EHA101균주에서 3.6%의 형질전환율을 얻었음. ○ 최적선발배지선정과 최적 공동배양조건은 자엽절공동배양법(1999)을 기본으로 이용하여 Thorne품종에서 5개체, 1049품종에서 5개체, 백운콩에서 1개체를 각각 얻었음. ○ 본 연구과제 수행을 통해서 대두의 안정적형질전환시스템(최저 0.1%, 최대 8%) 	80
4	<ul style="list-style-type: none"> ○ 논문 출판 3건 ○ 특허 1건 ○ 형질전환율 (>15%) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 논문 출판 5건 (국외 2건, 국내 3건) ○ 국내 학술발표 1건 (식물형질전환 연구회) ○ 국내 특허 출원 1건 ○ 형질전환빈도 (최저 0.1%, 최대 8%) 	80

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구과제에서 확립된 대두의 안정적 형질전환시스템을 이용하여 2단계에서

- 대두의 형질전환시스템을 이용하여 유용유전자 도입을 통한 신품종육성연구를 수행할 수 있음.
- 대두 functional genomics 연구를 위한 T-DNA tagging line를 생산할 수 있음.
- 대두 형질전환을 필요로 하는 국내 연구진을 중심으로 대두 형질전환 service를 수행함.
- 대두 기능 유전체 연구를 위한 T-DNA tagged mutant line data base를 확립할 수 있음.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 대두형질전환 수집문헌 목록

- Arag, F. J. L., Sarokin, L., Vianna, G. R., and Rech, E. L. 2000. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. *Theor Appl Genet* 101:1-6.
- Cahoon EB, Marillia E-F, Stecca KL, Hall SE, Taylor DC, Kinney AJ (2000) Production of fatty acid components of meadowfoam oil in somatic soybean embryos. *Plant Physiol* 124:243-251.
- Clemente TE, LaVallee BJ, Howe AR, Conner-Ward D, Rozman RJ, Hunter PE, Broyles DL, Kasten DS, Hinchee MA (2000) Progeny analysis of glyphosate-selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. *Crop Sci* 40:797-803.
- de Ronde, J.A., M.H. Spreeth, and W.A. Cress. 2001. Effect of antisense L-Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate reductase transgenic soybean plants subjected to osmotic and drought stress. *Plant Growth Reg* 32:13-26.
- Donaldson PH, Simmonds DH (2000) Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. *Plant Cell Rep* 19:478-484.
- Simmonds DH, Donaldson PA (2000) Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes. *Plant Cell Rep* 19:485-490.
- Xing, A.Q., Z.G. Zhang, S. Sato, P. Staswick, and T. Clemente. 2000. The use of the two T-DNA binary system to derive marker-free transgenic soybeans. *In Vitro Cell Dev. Biol. - Plant* 36:456-463.
- Cahoon, E.B., T.J. Carlson, K.G. Ripp, B.J. Schweiger, G.A. Cook, S.E. Hall, and A.J. Kinney. 1999. Biosynthetic origin of conjugated double bonds: Production of fatty acid components of high-value drying oils in transgenic soybean embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:12935-12940.
- Hu, C.-Y. and L. Wang. 1999. In planta soybean transformation technologies developed in China: procedure, confirmation and field performance. *In Vitro Cell Dev. Biol. - Plant* 35:417-420.
- Maughan, P.J., R. Philip, M.-J. Cho, J.M. Widholm, and L.O. Vodkin. 1999. Biolistic transformation, expression, and inheritance of bovine β -casein in

- soybean (*Glycine max*). *In Vitro Cell Dev. Biol.- Plant* 35:334-349.
- Mazur, B., E. Krebbers, and S. Tingey. 1999. Gene discovery and product development for grain quality traits. *Science* 285:372-375.
- Ponappa, T., A.E. Brzozowski, and J.J. Finer. 1999. Transient expression and stable transformation of soybean using jellyfish green fluorescent protein. *Plant Cell Rep.* 19:6-12.
- Santar, E.R., and J.J. Finer. 1999. Transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using proliferative embryogenic tissue maintained on semi-solid medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 35:451-455.
- Su, Y.-H., H.-L. Wang, M.-M. Yu, D.-Y. Lu, and S.-D. Guo. 1999. Studies on transfer of Bt into *Glycine max*. *Acta Bot. Sin.* 41:1046-1051.
- Zhang, Z., A. Xing, P. Staswick, and T.E. Clemente. 1999. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 56:37-46.
- Denbow, D.M., E.A. Grabau, G.H. Lacy, E.T. Kornegay, D.R. Russell, and P.F. Umbeck. 1998. Soybeans transformed with a fungal phytase gene improve phosphorus availability for broilers. *Poultry Science* 77:878-881.
- Hazel, C.B., T.M. Klein, M. Anis, H.D. Wilde, and W.A. Parrott. 1998. Growth characteristics and transformability of soybean embryogenic cultures. *Plant Cell Rep.* 17:765-772.
- Kinney, A.J. 1998. Plants as industrial chemical factories-- new oils from genetically engineered soybeans. *Fett/Lipid* 100:173-176.
- Meurer, C.A., R.D. Dinkins, and G.B. Collins. 1998. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. *Plant Cell Rep.* 18:180-186.
- Santar, E.R., H.N. Trick, J.S. Essig, and J.J. Finer. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Rep.* 17:752-759.
- Singh, R.J., T.M. Klein, C.J. Mauvais, S. Knowlton, T. Hymowitz, and C.M. Kostow. 1998. Cytological characterization of transgenic soybean. *Theor. Appl. Genet.* 96:319-324.
- Trick, H.N. and J.J. Finer. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 17:482-488.
- Zeitlin, L., S.S. Olmsted, T.R. Moench, M.S. Co, B.J. Martinell, V.M. Paradkar, D.R. Russell, C. Queen, R.A. Cone, and K.J. Whaley. 1998. A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nat. Biotechnol.*

- 16:1361-1364.
- Christou, P. 1997. Biotechnology applied to grain legumes. *Field Crops Res.* 53:83-97.
- Jahreis, G. 1997. Transgenic soybeans- composition and use of soybean oil and soybean flour in nutrition [Die gentechnisch veränderte Sojabohne-Zusammensetzung und Nutzung von Soja und Sojamehl in der Ernährung]. *Fett/Lipid* 99:32-34.
- Trick, H.N., R.D. Dinkins, E.R. Santarem, R. Di, V.M. Samoylov, C. Meurer, D. Walker, W.A. Parrott, J.J. Finer, and G.B. Collins. 1997. Recent advances in soybean transformation. *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.* 3:9-26.
- Cho, M.-J., J.M. Widholm, and L.O. Vodkin. 1996. Cassettes for seed-specific expression tested in transformed embryogenic cultures of soybean. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13:255-269.
- Chowrira, G.M., V. Akella, P.E. Fuerst, and P.F. Lurquin. 1996. Transgenic grain legumes obtained by in planta electroporation-mediated gene transfer. *Mol. Biotechnol.* 5:85-96.
- Christou, P. 1996. Electric discharge particle acceleration (AccellR) technology for the creation of transgenic plants with altered characteristics. *Field Crops Res.* 45:143-151.
- Di, R., V. Purcell, G.B. Collins, and S.A. Ghabrial. 1996. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. *Plant Cell Rep.* 15:746-750.
- Hadi, M.Z., M.D. McMullen, and J.J. Finer. 1996. Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 15:500-505.
- Kinney, A.J. 1996. Development of genetically engineered soybean oils for food applications. *J. Food Lipids* 3:273-292.
- Liu, W., R.S. Torisky, K.P. McAllister, S. Avdiushko, D.F. Hildebrand, and G.B. Collins. 1996. Somatic embryo cycling: evaluation of a novel transformation and assay system for seed-specific gene expression in soybean. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 47:33-42.
- Nordlee, J.A., S.L. Taylor, J.A. Townsend, L.A. Thomas, and R.K. Bush. 1996. Identification of Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *N. Engl. J. Med.* 334:688-692.
- Stewart, C.N., Jr., M.J. Adang, J.N. All, H.R. Boerma, G. Cardineau, D. Tucker, and W.A. Parrott. 1996. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean (*Glycine max* L.) Merrill) transgenic

- for a synthetic *Bacillus thuringiensis* CRYIA(c) gene. *Plant Physiol.* 112:121-129.
- Chowrira, G.M., V. Akella, and P.F. Lurquin. 1995. Electroporation-mediated gene transfer into intact nodal meristems in planta. *Mol. Biotechnol.* 3:17-23.
- Christou, P. 1995. Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment. *Euphytica* 85:13-27.
- Falco, S.C., T. Guida, M. Locke, J. Mauvais, C. Sanders, R.T. Ward, and P. Webber. 1995. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Bio/Technol.* 13:577-582.
- Xie, W., B. Wang, L. Bojun, X. Li, C. Lu, H. Qian, and S. Zhou. 1995. Introduction of wild soybean DNA into cultivated soybean and RAPD molecular verification. *Sci.Chin.Ser.B.* 38:1195-1201.
- Parrott, W.A., J.N. All, M.J. Adang, M.A. Bailey, H.R. Boerma, and C.N. Stewart,Jr. 1994. Recovery and evaluation of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insecticidal gene. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30P:144-149.
- Sato, S., C. Newell, K. Kolacz, L. Tredo, J. Finer, and M. Hinchee. 1993. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Rep.* 12:408-413.
- Christou, P. 1992. Soybean and other *Glycine* species. p. 37-127. In: *Genetic Engineering and In Vitro Culture of Crop Legumes*. Technomic Publishing Co., Inc. Lancaster Basel.
- Christou, P. and D.E. McCabe. 1992. Prediction of germ-line transformation events in chimeric R0 transgenic soybean plantlets using tissue-specific expression patterns. *Plant J.* 2:283-290.
- Dhir, S.K., S. Dhir, M.A. Savka, F. Belanger, A.L. Kriz, S.K. Farrand, and J.M. Widholm. 1992. Regeneration of transgenic soybean (*Glycine max*) plants from electroporated protoplasts. *Plant Physiol.* 99:81-88. [Retracted. 1993. *Plant Physiol.* 102:331].
- McKenzie, M.A. and W.A. Cress. 1992. The evaluation of South African cultivars of soybean for their susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and the production of transgenic soybean. *S. A. J. Sci.* 88:193-196.
- Widholm, J.M., S.K. Dhir, and S. Dhir. 1992. Production of transformed soybean plants by electroporation of protoplasts. *Plant Physiol.* 85:357

P. M. Olhoft · D. A. Somers

L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells

Received: 12 February 2001 / Revision received: 15 June 2001 / Accepted: 27 June 2001 / Published online: 13 October 2001
© Springer-Verlag 2001

Abstract A major limitation in producing transgenic soybeans [*Glycine max* (L.) Merrill] using the *Agrobacterium*-mediated cotyledonary-node method is low-frequency T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* into cotyledonary-node cells. We increased *Agrobacterium* infection from 37% to 91% of explants in the cotyledonary-node region by amending the solid co-cultivation medium with L-cysteine, which resulted in a fivefold increase in stable T-DNA transfer in newly developed shoot primordia. Southern analysis detected greater than a twofold increase in transformation efficiency, as determined by the number of independent fertile, transgene plants per explants inoculated. Enzymatic browning on explant tissue was also reduced, which suggests cysteine may interact with wound- and pathogen-defense responses in the soybean explant, resulting in an increased T-DNA delivery into the cotyledonary-node cells.

Keywords *Agrobacterium tumefaciens* · *Glycine max* · Transformation · Enzymatic browning · Wound- and pathogen-defense response

Abbreviations BAP: 6-Benzylaminopurine · GA₃: Gibberellic acid · GUS: β-Glucuronidase · IAA: Indole-3-acetic acid · MES: 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid · NAA: Naphthaleneacetic acid · PPT: Phosphinothricin

Introduction

Transgenic soybean (*Glycine max*) plants are produced using both microprojectile bombardment (McCabe et al.

1988; Christou et al. 1989) and various *Agrobacterium*-mediated transformation methods (Hinchee et al. 1988; Chee et al. 1989; Parrott et al. 1989; Di et al. 1996; Santarem et al. 1998; Clemente et al. 2000). However, soybean remains extremely recalcitrant to transformation (Trick et al. 1997). The cotyledonary-node (cot-node) method is a frequently used soybean transformation system based on *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into regenerable cells in the axillary meristems of the cotyledonary-node (Hinchee et al. 1988). The efficiency of this transformation system remains low, apparently because of infrequent T-DNA delivery to cells in the cotyledonary-node axillary meristem (cot-node cells), inefficient selection of transgenic cells that give rise to shoot meristems, and low rates of transgenic shoot regeneration and plant establishment. Improvements have been reported in these three components of the cot-node transformation system. For example, improved selection and plant regeneration have been developed (Zhang et al. 1999). Considerable effort also has been applied to increasing *Agrobacterium* virulence by the addition of chemical inducers of the *vir* genes (Bolton et al. 1986; Dyé et al. 1997), improvements in *vir* gene constructs (Hansen et al. 1994; Palanichelvam et al. 2000), identification and selection of susceptible soybean genotypes (Byrne et al. 1987; Delzer et al. 1990; Meurer et al. 1998; Cho et al. 2000), and increasing the wounding of explants by either microprojectile bombardment or sonication (Bidney et al. 1992; Santarem et al. 1998). While these studies represent substantial progress towards improving the cot-node system, the production of transgenic soybean plants remains inefficient.

In the soybean cot-node transformation system, target cells for transformation are prepared from 5-day-old germinated seedlings that are bisected between the cotyledons along the embryonic axis. The epicotyl is excised, and cot-node cells are wounded with a scalpel by slicing the node at the base of the cotyledon. Following inoculation with *Agrobacterium* cultures, the cot-node explants are co-cultivated on solid medium for 5 days. While investigating the cot-node transformation system, we ob-

Communicated by W. Parrott

P.M. Olhoft · D.A. Somers (✉)
Department of Agronomy and Plant Genetics,
University of Minnesota, 411 Borlaug Hall,
1991 Upper Buford Circle, St. Paul, MN 55108, USA
e-mail: somers@biosci.cbs.umn.edu
Tel.: +1-612-6255769, Fax: +1-612-6251268

served that cot-node explants exhibited enzymatic browning and tissue necrosis at the wound sites following co-cultivation. The soybean cotyledon is known to be extremely responsive to pathogen attack, as exemplified by the synthesis of phytoalexins upon exposure to fungal elicitors (Boué et al. 2000). The observation of explant browning led us to hypothesize that explant wounding and infection likely activates wound- and pathogen-defense responses that may limit *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery to cot-node cells. Attempts to reduce tissue browning and necrosis during *Agrobacterium*-mediated transformation have been reported in other plants, but not in soybean. The antioxidants dithiothreitol and polyvinylpyrrolidone increased *Agrobacterium*-mediated transformation efficiencies in grape when applied to the solid co-cultivation medium (Perl et al. 1996), and L-cysteine and ascorbic acid decreased tissue necrosis of Japonica rice meristem cultures used for *Agrobacterium*-mediated transformation (Enriquez-Obregon et al. 1999).

Since poor *Agrobacterium* infection ultimately limits the production of transgenic plants, we focused on improving T-DNA transfer into cot-node cells. During the course of the investigation reported here, we observed that the addition of L-cysteine to the solid co-cultivation medium following the inoculation of cot-node explants with *Agrobacterium* resulted in increased T-DNA transfer and, subsequently, an increased production of fertile transgenic soybean plants.

Materials and methods

Agrobacterium strains

Agrobacterium tumefaciens strain AGL1 (Hellens and Mullineaux 2000) was transformed with a binary plasmid, BBSF16, that contains the *bar* gene for resistance to the herbicide Liberty (AgrEvo USA; *bar* codes for phosphinothricin acetyltransferase, which detoxifies phosphinothricin) and the phenotypic marker *gusA* gene that encodes for β -glucuronidase (Fig. 1) (Molvig et al. 1997). The *gusA* expression occurs only in plant cells but not bacteria due to an altered 5'-leader sequence. The constitutive promoter CaMV 35S drives both the *gusA* and the *bar* gene in pBSF16.

Agrobacterium preparation

Agrobacterium preparation and the cot-node method were performed according to Zhang et al. (1999). The *Agrobacterium* strain AGL1 was prepared by first streaking it on YEP agar-solidi-

fied medium [10 g/l peptone, 5 g/l NaCl, 5 g/l yeast extract, 1.5% agar (pH 7.0)] containing 5 mg/l rifampicin and 5 mg/l tetracycline. After incubation at 25°C for 2 days, 50 ml of liquid YEP medium containing antibiotics was inoculated with a single colony and allowed to shake at 25°C for approximately 2 days until saturation was reached. On the day before explant inoculation, 3 ml of the YEP culture was added to 200 ml liquid YEP medium with appropriate antibiotics. The cultures were grown at 25°C until the OD₆₅₀ reached 0.8–1.0. Before inoculation, 50-ml aliquots of the liquid culture were placed into centrifuge tubes and spun for 10 min at 3,270 g at 20°C to pellet the cells. The pellet was resuspended in 25 ml liquid co-cultivation medium comprised of 1/10-strength B5 salts and MSIII iron stock, 3% sucrose, 20 mM MES (pH 5.4), and filter-sterilized B5 vitamins, 200 μ M aceto-syringone, 1.67 mg/l BAP, and 0.25 mg/l GA₃.

Explant preparation

Seeds from soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cv. Bert were sterilized using chlorine gas according to Di et al. (1996). Sterilized seeds were germinated on Gamborg's B5 medium (Gamborg et al. 1968) containing B5 salts and vitamins, MSIII iron stock, 2% sucrose, and 0.8% Purified Agar, BBL (Cockeysville, Md.), pH 5.8. Three plates were stacked, wrapped in bags with ventilation, and incubated in a growth room in which the temperature averaged 24°C under fluorescent lighting (90–150 μ E/m²s) and a 18/6 h (light/dark) photoperiod for 5–7 days, or until the cotyledons turned green but before the first leaves grew out of the cotyledon.

Agrobacterium infection

For each seedling, the roots and the majority of the hypocotyl were removed approximately 3–5 mm below the cotyledonary node by cutting the hypocotyl with a scalpel according to Hinchee et al. (1988). Two explants were obtained by separating the cotyledons and cutting vertically through the hypocotyl region. The epicotyl was subsequently removed, and both the axillary bud and cotyledonary node were wounded by cutting about ten times with a scalpel blade perpendicular to the hypocotyl. The explants were then inoculated in the 25-ml co-cultivation/*Agrobacterium* suspension. After 30 min, five explants (adaxial side down) were randomly placed on a sterile filter paper on top of co-cultivation medium solidified with 0.5% agar with or without L-cysteine (catalog no. C-7352, Sigma, St. Louis, Mo.). Stacks of five 100×15-mm petri dishes each were incubated at 25°C for 5 days in the dark.

GUS staining, selection, and plant regeneration

After 5 days, the explants were washed in a liquid shoot induction medium [B5 salts, MSIII iron stock, 3% sucrose, 3 mM MES (pH 5.6), and filter-sterilized B5 vitamins, 1.67 mg/l BAP, 100 mg/l cefotaxime, and 500 mg/l ticarcillin] to remove excess *Agrobacterium*. Seven or ten explants from each treatment level were placed in GUS histochemical stain (80 mM Na₂HPO₄, 8 mM Na₂EDTA, 0.8% Triton-X, 1.6% dimethyl sulfoxide, 20% methanol, 0.38 mM K₄Fe(CN)₆, 1 mM X-glucuro CHA salt (Inalco, Milan, Italy), pH 8.0) for 2 days at 37°C, after which the explants were washed in 70% ethanol and stored in 95% ethanol (Jefferson et al. 1987; Kosugi et al. 1990).

For selection of transgenic shoots, explants were imbedded into a solid shoot induction medium (0.8% agar) containing PPT in concentrations of 1.33 mg/l, 3.33 mg/l, or 5.0 mg/l (Zhang et al. 1999). The plates were incubated in a growth room in which the temperature averaged 24°C under fluorescent lighting (90–150 μ E/m²s) and an 18/6 h (light/dark) photoperiod. After 14 days, the explants were sub-cultured into new shoot induction medium after careful removal of the hypocotyl and placed back into the growth chamber for an additional 14 days.

Cotyledons were excised from the callus/shoot pad after 28 days, and the callus was trimmed before transferring into shoot

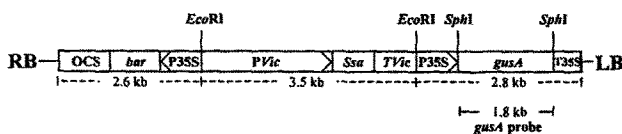


Fig. 1 Structure of T-DNA region in pBSF16. RB Right border, OCS octopine synthase, *bar* PPT resistance gene, P35S CaMV 35S promoter, PVic vicilin promoter, Ssa sunflower seed albumin, TVic vicilin terminator, *gusA* GUS gene, LB left border. The GUS probe used for Southern hybridizations is *underlined*

elongation medium [MS salts (Murashige and Skoog 1962), MSIII iron stock, 3% sucrose, 3 mM MES, 0.8% agar (pH 5.6), and filter-sterilized B5 vitamins, 0.1 mg/l IAA, 0.5 mg/l GA₃, 1 mg/l zeatin-riboside, 100 mg/l pyroglutamic acid, 50 mg/l asparagine, 100 mg/l cefotaxime, 500 mg/l ticarcillin, 1.3–5 mg/l PPT]. At this time, a portion of the explants in each cysteine treatment was also sacrificed for GUS staining after slicing the explant into approximately 5-mm sections for analysis. Elongated shoots were placed into a rooting medium containing MS salts, MSIII iron stock, 2% sucrose, 3 mM MES, 0.8% agar (pH 5.8) and filter-sterilized B5 vitamins, 50 mg/l asparagine, 100 mg/l pyroglutamic acid, and 0.5 mg/l NAA. Rooted T₀ plants and T₁ progeny were grown in the greenhouse to maturity under a 16/8 h (light/dark) photoperiod under natural light supplemented with 1,000-W high-pressure sodium lamps.

Southern blot analysis

Total DNA was extracted from soybean tissue (Sambrook et al. 1989). Ten-microliter aliquots of DNA were digested with the restriction enzyme *EcoRI*, and digested DNA was separated on a 0.8% agarose gel and Southern-blotted according to Sambrook et al. (1989). DNA was transferred onto an Immobilon-Ny⁺ membrane (Millipore, Bedford, Mass.), and all hybridization and wash conditions were as described by the manufacturer. The pBSF16 binary plasmid was digested with *SphI* to produce a 1.8-kb fragment, which contains the *gusA* coding region, to be used as a probe. The fragment was separated on a 1.2% agarose gel, purified using a phenol/chloroform extraction, and labeled using the *RediPrime* random prime labeling system (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.). Autoradiographic exposures were overnight using the Storm#840 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Calif.).

Experimental design and statistical analysis

Explants for the 5-day transient assays were randomly placed onto solid co-cultivation medium containing 11 cysteine treatments. Experiments were based on a randomized complete-block design with seven replicates. Average scores were determined by two evaluators, each taking two independent sets of scores. Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) (SAS, Cary, N.C.). For each experiment, the treatment, evaluator, and treatment × evaluator effects were calculated. Means and least significant difference (LSD) were also determined for each treatment ($\alpha=0.05$).

Results and discussion

To investigate the effect of L-cysteine on *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cot-node cells, we used a transient *Agrobacterium*-infection assay (Meuer et al. 1998). Wounded soybean cot-node explants were inoculated with *Agrobacterium* and co-cultured for 5 days on solid co-cultivation medium supplemented with different levels of cysteine. Following co-cultivation, T-DNA transfer to cells at the cot-node was determined by scoring GUS transient expression (GUS⁺) using GUS histochemical staining (Fig. 2 A–E). The mean frequency of explants that contained at least a single focus of GUS-staining cells (GUS⁺ focus) in the cot-node region was determined for each level of cysteine tested. GUS staining was scored only in the cot-node region, which is defined as the tissue between the junction of the epicotyl and the cotyledon on the hypocotyl, because these cells proliferate to form plant-regenerating tissues.

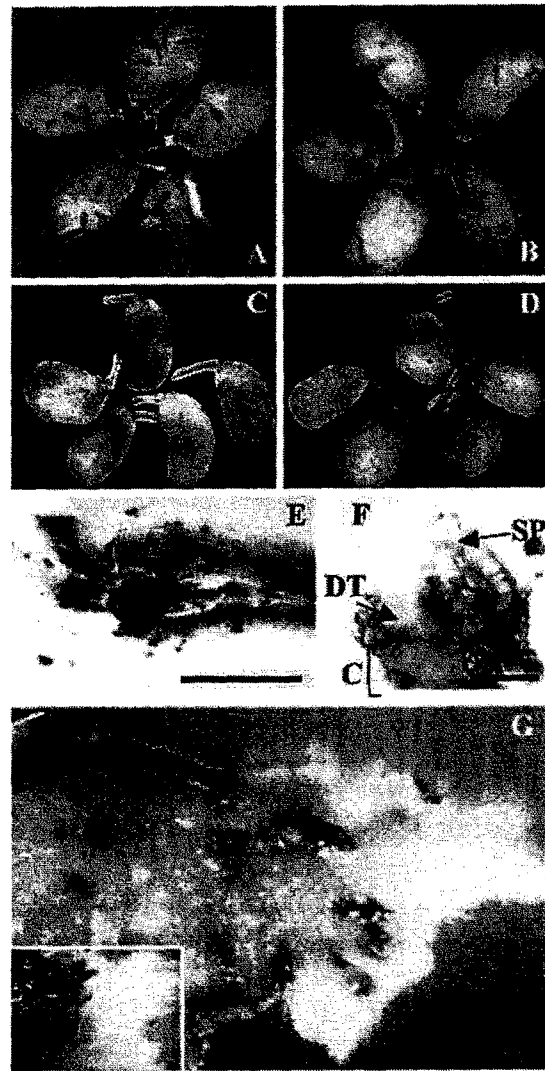


Fig. 2 Explants from Bert soybean infected with *Agrobacterium* exhibit more tissue browning on wounded surfaces when co-cultivated on solid co-cultivation medium without cysteine (A) than explants co-cultivated with 400 mg/l cysteine (B) after 5 days. The appearance of GUS⁺ sectors is less frequent on those explants co-cultivated on solid co-cultivation medium with no cysteine (C) than those explants co-cultivated with 400 mg/l cysteine (D) after 5 days. E Cot-node region of a GUS-stained explant after 5 days on solid co-cultivation medium with 400 mg/l cysteine. F Whole shoot/callus pads were stained with GUS after 28 days growth in shoot induction medium amended with PPT. G An example of a callus/shoot pad with multiple GUS⁺ shoot primordia. *Inset* shows additional GUS⁺ shoot primordia present on the opposite side of the explant. DT Differentiating tissue, SP shoot primordia, C callus. Bar: 0.2 mm (E), 0.3 mm (F), 0.1 mm (G)

The addition of cysteine to the solid co-cultivation medium increased the average frequency of explants containing a GUS⁺ focus at the cot-node from 37% in explants cultured on medium containing no cysteine to 91% in those cultured on medium containing between 600 and 1,000 mg/l cysteine (Fig. 3A). The physical appearance

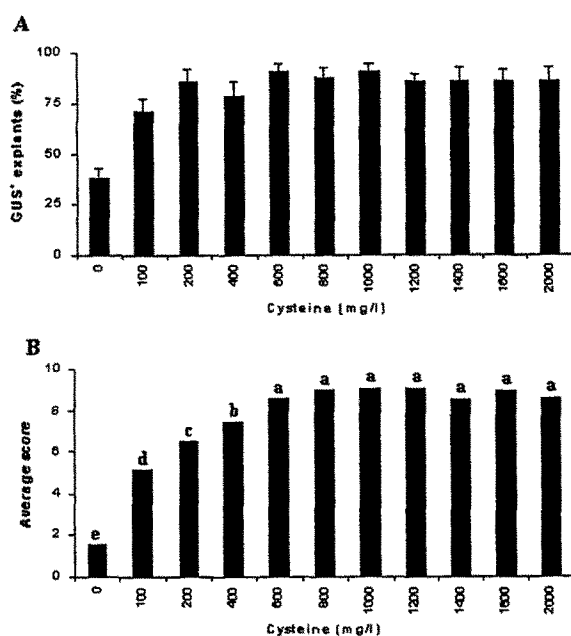


Fig. 3A,B The effect of cysteine on T-DNA delivery into Bert soybean cot-node cells as determined by transient expression of the *gusA* gene. **A** The average frequency of explants exhibiting at least one GUS⁺ focus in the cot-node region across seven experiments after 5 days. The bar above each cysteine treatment represents standard error between experiments. All cysteine treatments were significantly different from 0 mg/l cysteine at $\alpha=0.05$. **B** Scores were determined from GUS histological staining on 5-day-old explants. The scores were based on the following ranking system: 0 = no GUS⁺ foci on explant, 2 = less than 50% of the explants have fewer than ten discrete foci on the cot-node region, 4 = more than 50% of the explants have fewer than 20 foci at the cot-node region, 6 = more than 75% of the explants have more than 20 foci at the cot-node region, 8 = more than 75% of the explants have significant staining at the hypocotyl, the entire cot-node region, and on the cotyledons, 10 = all explants have extensive staining on the hypocotyl, cot-node region, and cotyledons, including areas of complete staining. Bars topped with the different letters show significant differences among treatments according to LSD ($\alpha=0.05$). No significant differences were found between evaluators or treatments \times evaluators ($P>0.05$)

of the explants co-cultured in cysteine was also improved; specifically, there was less browning on the cut and damaged surfaces of the hypocotyl, cot-node region and on the cotyledon of the explants (Fig. 2A, B).

The most striking feature of these explants was the increased numbers of GUS⁺ cells observed on explants co-cultured in cysteine compared to explants co-cultivated without cysteine (Fig. 2C–E). Scores were assigned that ranged from 0 to 10; 0 for no GUS-staining on any explant and 10 for all explants exhibiting extensive staining on the cot-node region, hypocotyls, and cotyledons, including areas of complete staining. For example, the cysteine-treated explants shown in Fig. 2D were scored as 9. On this basis of this ranking system, explants co-cultured in the absence of cysteine had an average score of 1.5, whereas explants co-cultured in medium containing from 400 mg/l to 2,000 mg/l cysteine scored signifi-

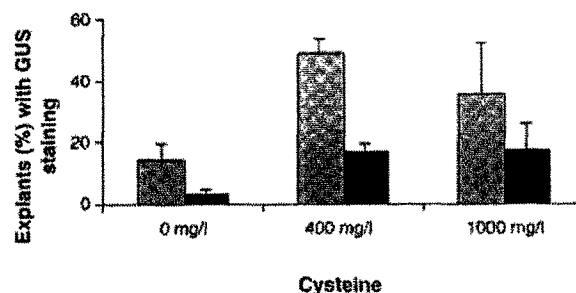


Fig. 4 The average percentage of Bert soybean explants with either GUS⁺ shoot primordia (black columns) or differentiated sectors (hatched columns) after 28 days on shoot induction medium. The average percentage was calculated for 0 mg/l cysteine ($r=9$, $n=88$), 400 mg/l cysteine ($r=8$, $n=105$), and 1,000 mg/l cysteine ($r=4$, $n=34$). Standard error between experiments is represented by a bar above each cysteine treatment. Both 400 mg/l averages (shoot primordia and differentiated sectors) and 1,000 mg/l (shoot primordia only) differed significantly from 0 mg/l cysteine at $\alpha=0.05$ ($P<0.001$ and $0.05\geq P>0.01$, respectively) using Student's *t*-test

cantly higher – in the range between 7.5 and 9 (Fig. 3B). Therefore, the addition of cysteine to the co-cultivation medium increased the frequency of T-DNA delivery when the latter was expressed per explant and as a function of the numbers of GUS⁺ cells per explant.

To ensure that our results measured an increase in T-DNA delivery frequency and not an accumulation of GUS caused by the addition of cysteine (Pifheiro et al. 1999), explants co-cultured on 0, 400, and 1,000 mg/l cysteine were GUS-stained after 28 days growth on shoot induction medium to assay for stable transformation. During the 28 days, explants formed de novo callus and shoots in the cot-node region in a structure referred to as a callus/shoot pad (Fig. 2F). These callus/shoot pads were immersed into GUS histochemical stain and scored for the formation of transgenic shoot primordia and sectors extending into developing shoot tissues (Fig. 4). Only those GUS⁺ shoot primordia with obvious trichomes, a characteristic of leaf tissue, or GUS⁺ sectors originating and extending into the tissue at the base of developing shoots (referred to hereafter as differentiating tissue) were scored (Fig. 2F). The frequency of explants with a GUS⁺ sector in differentiating tissue was 3.5-fold greater when the explants were treated with 400 mg/l than with no cysteine. The increase in explants with GUS⁺ shoot primordia was even greater. For example, explants treated with 400 mg/l cysteine exhibited five-fold more GUS⁺ shoot primordia than those explants not co-cultured with cysteine. Interestingly, those explants with GUS⁺ shoot primordia had single shoots in only 40% of the explants, while the remaining explants possessed multiple GUS⁺ shoot primordia. Of the 29 explants with multiple shoot masses, 15 had more than five GUS⁺ shoot primordia in a cluster, with some explants containing up to 25 shoot primordia (Fig. 2G). These results indicated that the cysteine-mediated increase in GUS⁺ foci detected after 5 days resulted in increased transformed cot-node cells and tissue.

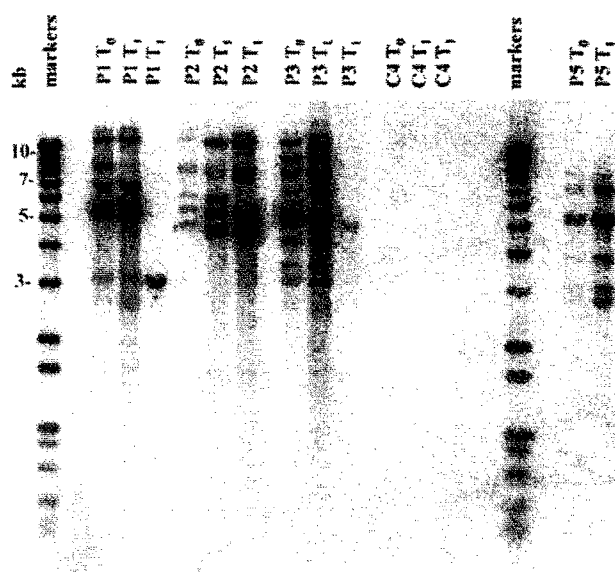


Fig. 5 Southern blot analysis of transgenic T_0 Bert soybean plants and their T_1 progeny. DNA was isolated, digested with *EcoRI*, and probed with GUS (Fig. 1). Four independent transformed plants and their progeny (P1, P2, P3, P5) are shown alongside a negative control plant (C4). The transformed plants were all from explants treated with 400 mg/l cysteine

To determine plant regeneration and transformation efficiently, GUS^+ elongated shoots were transferred to rooting medium. From our experiments in which a total of 385 inoculated explants underwent a cysteine treatment during co-cultivation, eight independent fertile transgenic plants (2.1% transformation efficiency) were recovered and confirmed by Southern blot analysis (Fig. 5). By comparison, the non-cysteine control explants produced two independent fertile transgenic plants from a total of 218 inoculated explants – a 0.9% transformation efficiency. Although the percentage efficiency was improved to some degree in the cysteine-treated explants, the potential to produce more transgenic plants is implied by the high frequency of GUS^+ shoot primordia on cysteine-treated explants. Further improvements in selection and plant regeneration may increase the final transformation efficiency when used in conjunction with co-cultivation medium amended with cysteine.

Southern blot analysis was conducted on GUS^+ transgenic plants and their progeny using the restriction enzyme *EcoRI*, which cleaves the T-DNA at a site adjacent to the *gusA*-hybridizing probe. Thus, transgene-hybridizing fragments may represent unique integrations of the T-DNA or tandem repeats. All of the T_0 plants analyzed exhibited numerous transgene-hybridizing fragments with multiple copies, suggesting that the transgene loci were complex and possibly in tandem repeats (Fig. 5). Of particular interest is the strongly hybridizing fragment of approximately 5.5 kb that was detected in the primary transformants. The size of this fragment and its intensity of hybridization are consistent with the presence of T-DNA repeats released by digestion of the inter-

nal *EcoRI* sites within the borders of the T-DNA (Fig. 1). In addition to these repeats, the presence of multiple, unlinked transgene loci was evident in the progeny of three transgenic lines, which clearly segregated for transgene-hybridizing fragments. Although the T_0 plants had complex T-DNA patterns, GUS^+ progeny were observed that had simple transgene loci in lines P1 and P3, indicating that in some cases T_1 progeny can be identified with a single, simple transgene locus.

The complex T-DNA integration patterns seen in this study are somewhat unusual when compared to the simple insertion patterns commonly seen using *Agrobacterium* transformation. However, such complex patterns do occur and have been shown to be mainly due to the formation of direct and indirect repeats around either the right or left T-DNA border (Krizkova and Hroudá 1998; De Buck et al. 1999). We believe that the multiple integrations of the T-DNA in our experiments are due to the nature of the binary plasmid rather than the cysteine treatment since prior experiments using pBSF16 without cysteine treatment also resulted in primary transformants containing complex T-DNA integration patterns (Khan and Somers, unpublished).

This study showed that the addition of cysteine to the solid co-cultivation medium increased *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery to the cot-node cells with a notable decrease in enzymatic browning on wounded and infected soybean explants. Since both *Agrobacterium* infection and tissue browning were affected, it is possible that cysteine interacts with the plant's response to wound and pathogen infection during co-cultivation, resulting in an increase in T-DNA delivery. Further research into the interactions between cysteine, *Agrobacterium*, and the soybean explant during co-cultivation may lead to even greater increases in T-DNA delivery and, ultimately, greater increases in fertile transgenic soybean plants.

Acknowledgements We are grateful to Christopher M. Donovan for his technical assistance with the cot-node method, and Drs. C.P. Vance and G.J. Muehlbauer for critical review of the manuscript. This study was funded in part by the Minnesota Soybean Research and Promotion Council and the Minnesota Agricultural Experiment Station.

References

- Bidney D, Scelonge C, Martich J, Burrus M, Sims L, Huffman G (1992) Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* 18:301–313
- Bolton GW, Nester EW, Gordon MP (1986) Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. *Science* 232:983–985
- Boué SM, Carter CH, Ehrlich KC, Cleveland TE (2000) Induction of the soybean phytoalexins coumestrol and glyceollin by *Aspergillus*. *J Agric Food Chem* 48:2167–2172
- Byrne MC, McDonnell RE, Wright MS, Carnes MG (1987) Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium*-soybean interaction. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 8:3–15
- Chee PP, Fober KA, Slightom JL (1989) Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 91:1212–1218

- Cho H-J, Farrand SK, Noel GR, Widholm JM (2000) High-efficiency induction of soybean hairy roots and propagation of the soybean cyst nematode. *Planta* 210:195–204
- Christou P, Swain WF, Yang N-S, McCabe DE (1989) Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7500–7504
- Clemente TE, LaVallee BJ, Howe AR, Conner-Ward D, Rozman RJ, Hunter PE, Broyles DL, Kasten DS, Hinchee MA (2000) Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. *Crop Sci* 40:797–803
- De Buck S, Jacobs A, Van Montagu M, Depicker A (1999) The DNA sequences of T-DNA junctions suggest that complex T-DNA loci are formed by a recombination process resembling T-DNA integration. *Plant J* 20:295–304
- Delzer BW, Somers DA, Orf JH (1990) *Agrobacterium tumefaciens* susceptibility and plant regeneration of 10 soybean genotypes in maturity groups 00 to II. *Crop Sci* 30:320–322
- Di R, Purcell V, Collins GB, Ghabrial SA (1996) Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. *Plant Cell Rep* 15:746–750
- Dyé F, Berthelot K, Griffon B, Delay D, Delmotte FM (1997) Alkylsyringamides, new inducers of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes. *Biochimie* 79:3–6
- Enríquez-Obregón GA, Prieto-Samsónov DL, de la Riva GA, Pérez M, Selman-Housein G, Vázquez-Padrón RI (1999) *Agrobacterium*-mediated Japonica rice transformation: a procedure assisted by an antineoplastic treatment. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 59:159–168
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151–158
- Hansen G, Das A, Chilton MD (1994) Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7603–7607
- Hellens R, Mullineaux P (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci* 5:446–451
- Hinchee MAW, Connor-Ward DV, Newell CA, McDonnell RE, Sato SJ, Gasser CS, Fischhoff DA, Re DB, Fraley RT, Horsch RB (1988) Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Biotechnology* 6:915–922
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901–3907
- Kosugi S, Ohashi Y, Nakajima K, Arai Y (1990) An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. *Plant Sci* 70:133–140
- Krizkova L, Hroudá M (1998) Direct repeats of T-DNA integrated in tobacco chromosome: characterization of junction regions. *Plant J* 16:673–680
- McCabe DE, Swain WF, Martinell BJ, Christou P (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Biotechnology* 6:923–926
- Meurer CA, Dinkins RD, Collins GB (1998) Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. *Plant Cell Rep* 18:180–186
- Molvig L, Tabe LM, Eggum BO, Moore AE, Craig S, Spencer D, Higgins TJV (1997) Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupines (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed albumin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8393–8398
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Palanichelvam K, Oger P, Clough SJ, Cha C, Bent AF, Farrand SK (2000) A second T-region of the soybean-supervirulent chrysope-type Ti plasmid pTiChry5, and construction of a fully disarmed vir helper plasmid. *Mol Plant Microbe Interact* 13:1081–1091
- Parrott WA, Hoffman LM, Hildebrand DF, Williams EG, Collins GB (1989) Recovery of primary transformants of soybean. *Plant Cell Rep* 7:615–617
- Perl A, Lotan O, Abu-Abied M, Holland D (1996) Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): the role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. *Nat Biotechnol* 14:624–628
- Pifeiro M, Alamillo JM, García-Olmedo F, Díaz I (1999) Dithiothreitol increases β -glucuronidase accumulation in transformed tobacco (*Nicotiana tabacum*) protoplasts without altering their viability or the synthesis and export of cellular proteins. *Plant Cell Rep* 18:505–508
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Santarém ER, Trick HN, Essig JS, Finer JJ (1998) Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Rep* 17:752–759
- Trick HN, Dinkins RD, Santarem ER, Di R, Samoylov V, Meurer C, Walker D, Parrott WA, Finer JJ, Collins GB (1997) Recent advances in soybean transformation. *Plant Tissue Cult Biotechnol* 3:9–26
- Zhang Z, Xing A, Staswick P, Clemente TE (1999) The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 56:37–46

P.M. Olhoft · K. Lin · J. Galbraith · N.C. Nielsen
D.A. Somers

The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells

Received: 12 June 2001 / Revision received: 14 August 2001 / Accepted: 15 August 2001 / Published online: 13 October 2001
© Springer-Verlag 2001

Abstract *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cells and the production of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants using the cotyledonary-node (cot-node) method were improved by amending the solid co-cultivation medium with L-cysteine. The goal of this study was to investigate the role of cysteine and other thiol compounds in increasing the frequency of transformed soybean cot-node cells. The frequency of transformed cells was increased only when L-cysteine was present during co-cultivation of *Agrobacterium* and cot-node explants. This effect was due to the thiol group since D-cysteine and other thiol compounds also increased the frequency of transformed cells. Copper and iron chelators also increased the frequency of transformed cells, indicating an association with inhibition of polyphenol oxidases and peroxidases. Thiol compounds likely inhibit wound- and pathogen-induced responses, thereby increasing the capacity for *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cells. The increases in transformed cot-node cells were independent of soybean genotype, *Agrobacterium* strain, and binary plasmid.

Keywords *Agrobacterium tumefaciens* · L-Cysteine · *Glycine max* · Transformation · Plant wound and pathogen defense

Abbreviations *BAP*: 6-Benzylaminopurine · *DTT*: Dithiothreitol · *GA₃*: Gibberellic acid · *GUS*: β-Glucuronidase · *MES*: 2-[*N*-morpholino]ethane-

sulfonic acid · *PODs*: Peroxidases · *PPOs*: Polyphenol oxidases · *PPT*: Phosphinothricin

Introduction

The production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium tumefaciens* was recently improved by increasing the transformation of cotyledonary-node (cot-node) cells through the addition of L-cysteine to medium used for the co-cultivation of *Agrobacterium* with the cot-node explant (Olhoft and Somers 2001). Similar results have been reported for grape (*Vitis vinifera* L.) in that transformation efficiency was increased when a combination of the antioxidant, dithiothreitol, and the phenol-absorbing compound, polyvinylpyrrolidone, was added to the solid co-cultivation medium (Perl et al. 1996). In both studies, a reduction in browning and necrosis of the plant tissue undergoing co-cultivation with *Agrobacterium* occurred in conjunction with increased transformation efficiencies. These observations suggest that processes associated with tissue browning and necrosis may limit the successful transfer of T-DNA into viable cells of these explants.

The tissue browning and necrosis observed on soybean cot-node explants following *Agrobacterium* infection are likely defense responses to wounding and/or pathogen infection common to many plants. Upon wounding or pathogen infection, one of the earliest defense mechanisms activated is the production of reactive oxygen species, referred to as an oxidative burst (reviewed in Wojtaszek 1997). The reactive oxygen intermediates produced during the oxidative burst are thought to activate programmed cell death, or the hypersensitive response, to generate a barrier of dead cells around the site of infection. Also activated by wounding are the deposition of tannins and the release of phytoalexins by phenolic oxidation via the coordinated action of polyphenol oxidases (PPOs) and peroxidases (PODs) (reviewed in Vámos-Vigyázó 1981), presumably to provide further protection against pathogen infection. The enzy-

Communicated by W. Parrott

P.M. Olhoft · D.A. Somers (✉)
Department of Agronomy and Plant Genetics,
University of Minnesota, 411 Borlaug Hall,
1991 Upper Buford Circle, St. Paul, MN 55108, USA
e-mail: somers@biosci.cbs.umn.edu
Tel.: +1-612-6255769, Fax: +1-612-6251268

K. Lin · J. Galbraith · N.C. Nielsen
USDA-ARS, Agronomy Department, Purdue University,
West Lafayette, IN 47907, USA

matic production of tannins results in the browning of wounded tissues. Cysteine is a known inhibitor of PPOs and PODs and enzymatic browning, either directly or indirectly, through the action of its thiol group (Mayer and Harel 1979; Richard-Forget et al. 1992; Negishi and Ozawa 2000). By reducing wound- and pathogen-defense responses in plants, inhibitors have the potential to increase the capacity of *Agrobacterium* to infect plant tissues and stably transfer its T-DNA and to increase the frequency of infected cells that remain viable and become transformed.

We report here the results of our investigation on the role of cysteine and other thiol compounds in increasing the frequency of transformed soybean cot-node cells. Olhoft and Somers (2001) showed that adding cysteine to the solid co-cultivation medium resulted in significant increases in the transformation of cot-node cells 5 days after inoculation, in the stable transformation of cot-node explant tissues, including shoot primordia, at 28 days, and in the production of fertile transgenic plants. Since cysteine increased both the frequency of transformed cells and the production of fertile, transgenic soybean plants, in the present study we focused on transformation assays on explants 5 days after inoculation and stable transformations after 28 days to investigate the role of thiol compounds in increasing the frequency of transformed cells.

Materials and methods

Soybean genotypes

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cvs. Bert, Lambert, Granite, MN0301, MN0901, MN1301, MN1401, MN1801, A3237, Thorne, Jack, and Resnik were used.

Agrobacterium strains, explant preparation, and *Agrobacterium*-infection

The *Agrobacterium* strains and binary vectors used are shown in Table 1. *Agrobacterium* cultures were grown according to Olhoft and Somers (2001) and prepared for infection by suspending the *Agrobacterium* in 25 ml liquid co-cultivation medium comprising

1/10-strength B5 salts and MSIII iron stock, 3% sucrose, 20 mM MES (pH 5.4), and filter-sterilized B5 vitamins, 200 μ M acetosyringone, 1.67 mg/l BAP, and 0.25 mg/l GA₃.

Sterilized seeds were germinated on Gamborg's B5 medium (Gamborg et al. 1967) containing B5 salts and vitamins, MSIII iron stock, 2% sucrose, and 0.8% Purified Agar (BBL, Cockeysville, Md.), pH 5.8. Three plates were stacked, wrapped in bags with ventilation, and incubated in a growth room at an average temperature of 24°C under an 18/6-h (light/dark) photoperiod with light supplied by fluorescent lamps at an intensity of 90–150 μ E/m²s for 5–7 days, or until the cotyledons turned green but before the first true leaves were visible.

For each seedling, the roots and the majority of the hypocotyl were removed approximately 3–5 mm below the cotyledonary node by cutting the hypocotyl with a scalpel according to Hinchey et al. (1988). Two explants were obtained by separating the cotyledons and cutting vertically through the hypocotyl region. The epicotyl was subsequently removed, and both the axillary bud and cotyledonary node were wounded by slicing about ten times with a scalpel blade perpendicular to the hypocotyl. The explants were then inoculated in the 25-ml co-cultivation/*Agrobacterium* suspension. After 30 min, five explants (adaxial side down) were randomly placed on a sterile filter paper on top of co-cultivation medium solidified with 0.5% agar. Stacks of five 100×15-mm petri dishes each were incubated at 25°C for 5 days in the dark.

For experiments testing for stable transformation, the explants were washed in a liquid shoot induction medium [B5 salts, MSIII iron stock, 3% sucrose, 3 mM MES (pH 5.6) and filter-sterilized B5 vitamins, 1.67 mg/l BAP, 100 mg/l cefotaxime, and 500 mg/l ticarcillin] after 5 days on solid co-cultivation medium to remove excess *Agrobacterium* and imbedded into a solid shoot induction medium (0.8% agar) containing PPT in concentrations of 1.33 mg/l, 3.33 mg/l, or 5.0 mg/l for selection (Zhang et al. 1999). The plates were incubated in a growth room at an average temperature of 24°C under an 18/6-h (light/dark) photoperiod with light supplied by fluorescent lamps at an intensity of 90–150 μ E/m²s. After 14 days, the explants were sub-cultured into new shoot induction medium after careful removal of the hypocotyl and placed back into the growth chamber for an additional 14 days.

β -Glucuronidase assays

Soybean explants were assayed for GUS 5 days after inoculation with *Agrobacterium* (5-day GUS assays). Eight explants from each treatment were rinsed with water and incubated with 7 ml GUS histochemical stain [80 mM Na₂HPO₄, 8 mM Na₂EDTA, 0.8% Triton-X, 1.6% dimethyl sulfoxide, 20% methanol, 0.38 mM K₄Fe(CN)₆, 1 mM X-glucuro CHA salt (Inalco, Milan, Italy), pH 8.0] for 2 days at 37°C, after which the explants were washed in 70% ethanol and stored in 95% ethanol (Jefferson et al. 1987; Kosugi et al. 1990). The GUS assay scores on explants were based

Table 1 *Agrobacterium* strains and binary plasmids used in experiments

<i>Agrobacterium</i> strain/ binary vector	Phenotypic selection; herbicide selection genes ^a	<i>Agrobacterium</i> selection	Reference
AGL1/pBSF16	<i>gusA</i> ; <i>bar</i>	50 mg/l hygromycin	Molvig et al. 1997; Hellens and Mullineaux 2000;
LBA4404/pTOK233	<i>gusA</i> ; <i>hpt</i>	5 mg/l rifampicin 5 mg/l tetracycline	Hiei et al. 1994
EHA101/pZY102	<i>gusA</i> ; <i>bar</i>	50 mg/l kanamycin 25 mg/l chloramphenicol	Shanyuan Zhang (unpublished)
EHA105/pBISN1	<i>gusA</i> ; <i>nptII</i>	10 mg/l rifampicin	Hood et al. 1993; Narasimhulu et al. 1996
GV3101/pBISN1	<i>gusA</i> ; <i>nptII</i>	10 mg/l rifampicin	Koncz and Schell 1986; Narasimhulu et al. 1996

^a*gusA*: β -glucuronidase (GUS) gene, *hpt*: hygromycin phosphotransferase gene, *bar*: phosphinothricin acetyltransferase gene, *nptII*: neomycin phosphotransferase gene

on the following ranking system: 0 = no GUS staining on explants; 2 = fewer than 50% of the explants have fewer than ten discrete GUS⁺ foci on the cot-node region; 4 = more than 50% of the explants have fewer than 20 foci at the cot-node region; 6 = more than 75% of the explants have more than 20 foci at the cot-node region; 8 = more than 75% of the explants have significant staining at the hypocotyl, the entire cot-node region, and on the cotyledons; and 10 = all explants have extensive staining on the hypocotyl, cot-node region, and cotyledons, including areas of intense staining.

To determine stable transformation frequencies, we assayed GUS expression after 28 days on shoot induction medium on explant tissue derived from the cot-node region, which had formed de novo callus and shoots that is also referred to as the callus/shoot pad. The callus/shoot pads were sliced into approximately 5-mm sections, immersed into GUS histochemical stain, and the number of GUS-staining (GUS⁺) sectors counted. Only the wedge-shaped sectors of actively dividing GUS⁺ cells, not small foci, were counted.

Experimental design

Five-day GUS assays were performed on explants exposed to 400 mg/l cysteine at three different time points during *Agrobacterium* preparation and inoculation. First, two 200-ml overnight cultures for the *Agrobacterium*/binary plasmid LBA4404/pTOK233 were prepared, with one containing YEP and the other YEP plus 400 mg/l L-cysteine. For each culture, the broth was divided into two cultures, and the *Agrobacterium* was pelleted and then resuspended with liquid co-cultivation medium containing either 0 mg/l or 400 mg/l cysteine. Finally, wounded explants were inoculated with one of the four treatments for 30 min, after which one-half of the explants from each treatment were placed onto solid co-cultivation medium with 400 mg/l cysteine and the other half onto solid co-cultivation medium without cysteine.

Three experiments were conducted to investigate the effects of a 5-day-long incubation of explants on solid co-cultivation medium containing compounds other than L-cysteine in the presence of *Agrobacterium* strain/binary plasmid LBA4404/pTOK233. In the first experiment, eight wounded explants were randomly placed onto solid co-cultivation medium containing sodium thiosulfate, L-cysteine, D-cysteine, DTT, glutathione, or no additives as a control. In the remaining two experiments, GUS assays were carried out on explants co-cultivated in medium containing metal chelators. Five concentrations of bathocuproline disulfonic acid or bathophenanthroline disulfonic acid and four levels of copper (cupric sulfate) or iron (ferrous sulfate), respectively, were evaluated. Both experiments contained the positive and negative controls, 400 mg/l cysteine and no amendments, respectively.

To assess whether the effect of cysteine in increasing the frequency of transformed cells was dependent upon an *Agrobacterium* strain/binary plasmid combination, we inoculated explants from soybean cv. Bert with either LBA4404/pTOK233 or AGL1/pBSF16 and randomly placed the explants on solid co-cultivation plates containing 0, 400, or 1,000 mg/l cysteine. For each treatment, explants were scored for GUS⁺ foci following co-cultivation. In a separate experiment, explants from cv. Jack were inoculated with the *Agrobacterium* strain/binary plasmid EHA101/pZY102, EHA105/pBISN1, and GV3101/pBISN1 and scored for GUS⁺ foci after exposure to either 0.7 mM (154 mg/l) DTT or no amendments in the solid co-cultivation medium.

The frequency of explants with GUS⁺ foci after co-cultivation on medium containing either 0 mM or 0.7 mM DTT was calculated for the soybean genotypes A3237, Thorne, Jack, and Resnik. Explants were inoculated with the *Agrobacterium* strain/binary plasmid EHA101/pZY102. To test the effect of cysteine on the stable transformation of different genotypes, we inoculated explants of different genotypes from eight experiments and incubated these with AGL1/pBSF16 on solid co-cultivation medium containing either 0 mg/l cysteine or cysteine between the levels of 400 mg/l and 1,000 mg/l. GUS⁺ foci were determined on callus/shoot pads

of various genotypes after 28 days of growth on shoot induction medium containing the selection agent PPT.

Statistical analysis

All experiments measuring GUS⁺ foci on explants 5 days after co-cultivation were based on a randomized complete-block design with three replications, except for two replications in the experiments that scored GUS⁺ foci on explants using various genotypes or *Agrobacterium* strains/binary plasmids when co-cultivated with 0.7 mM DTT. Average scores were determined by two evaluators, each taking two independent sets of scores. Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) (SAS, Cary, N.C.). For each experiment, the treatment, evaluator, and treatment × evaluator effects were calculated, and the means and least significant difference (LSD) were determined for each treatment ($\alpha = 0.05$). No significant differences were found between evaluators or treatments × evaluators ($P > 0.05$) in any of the experiments.

Results and discussion

To investigate whether cysteine increases the *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cot-node cells by directly interacting with *Agrobacterium*, the soybean explant, or a combination of both components of the transformation system, cysteine was added to the YEP overnight medium, the liquid co-cultivation medium, or the solid co-cultivation medium in all possible combinations (Fig. 1). The addition of cysteine to the solid co-cultivation medium consistently resulted in a significantly greater frequency of GUS⁺ foci than did the addition

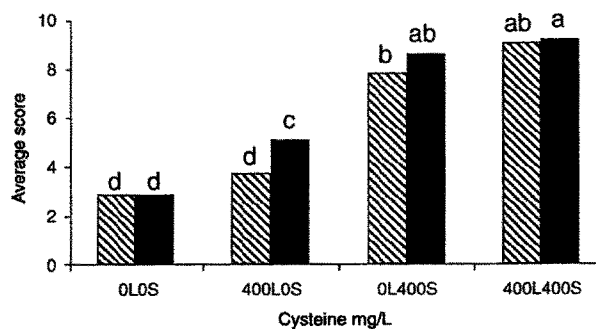


Fig. 1 GUS assays on 5-day-old soybean cv. Bert explants performed to determine when the addition of cysteine during *Agrobacterium* preparation and explant inoculation increases transformation of cot-node cells. Explants were inoculated with *Agrobacterium* (LBA4404) that was grown overnight in YEP medium amended with either 0 mg/l (hatched bar) or 400 mg/l (solid bar) cysteine and resuspended in liquid co-cultivation medium containing either 0 mg/l or 400 mg/l cysteine. After inoculation in *Agrobacterium*, the explants were incubated for 5 days on solid co-cultivation medium containing 0 mg/l or 400 mg/l cysteine. Bars topped with different letters show significant differences among treatments according to LSD ($\alpha = 0.05$). 0LOS 0 mg/l cysteine in liquid co-cultivation, 0 mg/l cysteine in solid co-cultivation medium; 400LOS 400 mg/l cysteine in liquid co-cultivation, 0 mg/l cysteine in solid co-cultivation medium; 0L400S 0 mg/l cysteine in liquid co-cultivation, 400 mg/l cysteine in solid co-cultivation medium; 400L400S 400 mg/l cysteine in liquid co-cultivation, 400 mg/l cysteine in solid co-cultivation medium

Table 2 The effect of various thiol-containing compounds on *Agrobacterium*-mediated transformation of cot-node cells in soybean cv. Bert explants as determined by 5-day GUS assays. Scores from three replicate experiments were assigned and the mean and the least significant difference (LSD) calculated. Different letters show significant differences among treatments according to LSD ($\alpha=0.05$)

Treatment	Concentration	Mean	LSD
Na-thiosulfate	248 mg/l (1 mM)	9.6	a
L-Cysteine	1,000 mg/l (8.3 mM)	9.3	a
DTT	154 mg/l (1 mM)	9.3	a
D-Cysteine	1,000 mg/l (8.3 mM)	9.0	a,b
L-Cysteine	400 mg/l (3.3 mM)	8.3	b,c
Glutathione	307 mg/l (1 mM)	7.5	c
Control	0	3.6	d

of cysteine to either the YEP or liquid co-cultivation medium in combination with the solid co-cultivation medium without cysteine. We also observed that the addition of cysteine to the shoot induction medium for 28 days did not increase the number of GUS⁺ sectors on the callus/shoot pad (data not shown). This suggests that cysteine has no direct effect on the capacity of *Agrobacterium* to infect the explant and transfer its T-DNA, but it does increase the frequency of transformed cells by either directly affecting the soybean explant or affecting the interaction between the *Agrobacterium* and soybean explant at some stage during co-cultivation.

Cysteine may increase the frequency of transformed cells by either acting as a nutritional supplement during the co-cultivation step or by acting through its thiol group. To test this, explants incubated for 5 days on co-cultivation medium supplemented with 1,000 mg/l of the metabolically inactive D-cysteine were compared to those incubated on co-cultivation medium containing 400 mg/l and 1,000 mg/l L-cysteine as well as on a 0 mg/l cysteine control (Table 2). The frequency of GUS⁺ foci was not significantly different between explants subjected to either the L-cysteine treatments or D-cysteine, thereby eliminating the possibility that cysteine acts as a nutritional supplement throughout co-cultivation.

Other thiol compounds were added to the solid co-cultivation medium to establish whether thiol groups are actively involved in increasing the frequency of transformed cells during co-cultivation. Significant increases in GUS⁺ foci at the cot-node region were found in all explants treated with all thiol compounds compared to the no amendment control (Table 2). For example, DTT, sodium thiosulfate, and L-cysteine (1,000 mg/l) all resulted in scores ranging between 9 and 10, indicating intense staining in the cot-node region, as well as on the hypocotyl and cotyledon, as compared to a score of 3.6 for control explants. These results further indicate that the thiol group was active in increasing the frequency of transformed cells.

Despite the stress conditions that plant cells undergo during *Agrobacterium*-mediated transformation methods,

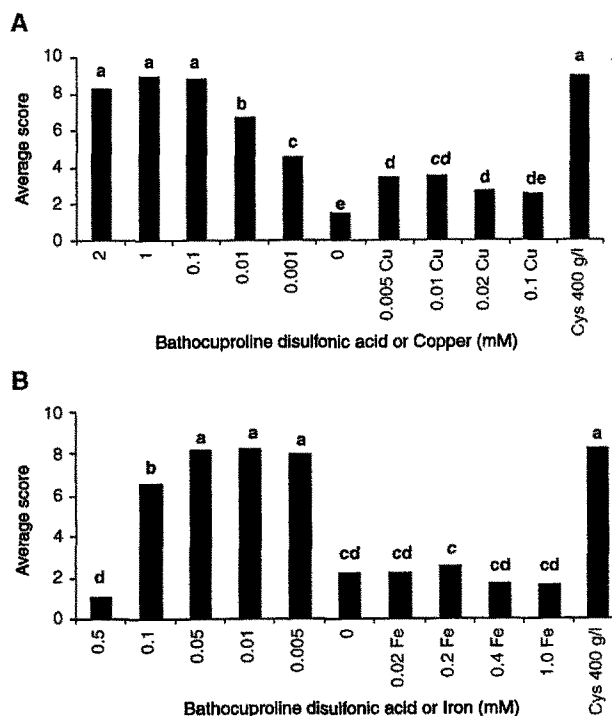


Fig. 2 GUS assays conducted on 5-day-old soybean cv. Bert explants exposed to various levels of copper or bathocuproline disulfonic acid (A) or iron or bathophenanthroline disulfonic acid (B), which were amended to the solid co-cultivation medium. Both experiments included a negative control (no cysteine, iron or copper) and a positive control (400 mg/l cysteine). Bars topped with different letters show significant differences among treatments according to LSD ($\alpha=0.05$)

there has been little attention focused on investigating the use of antioxidants or inhibitors of wound- and pathogen- defense response enzymes in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of plant cells (Perl et al. 1996). Antioxidants, in general, are known to reduce pathogen-induced programmed cell death (Mittler et al. 1999). Inhibitors of PPOs and PODs, such as cysteine and other thiol compounds, are routinely used to reduce enzymatic browning in food processing caused by the deposition of tannins (Nicolas et al. 1994; Walker and Ferrar 1998). Copper and iron chelators also inhibit PPOs and PODs, respectively, since PPOs are copper metalloproteins and PODs contain ferriprotoporphyrin III (hematin) as a prosthetic group. The addition of bathocuproline disulfonic acid (copper chelator) and bathophenanthroline disulfonic acid (iron chelator) to the solid co-cultivation medium increased the number of GUS⁺ foci on 5-day-old explants compared to explants incubated on unmodified co-cultivation medium (0.01 mM cupric sulfate and 0.02 mM ferrous sulfate) and on medium containing varying amounts of copper or iron (Fig. 2). This result indicates that once activated by tissue wounding or pathogen infection, copper- and iron-containing enzymes, such as PPOs and PODs, reduce the transformation of cot-node cells. We hypothesize that cysteine

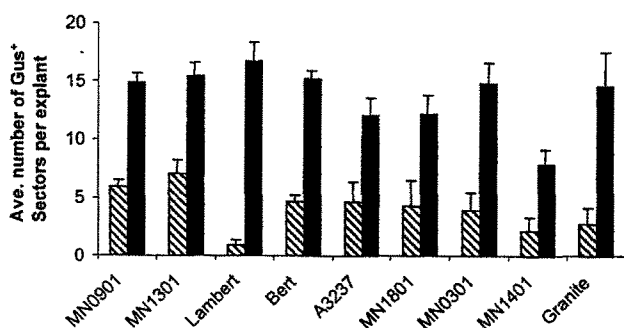


Fig. 3 The average number of GUS⁺ sectors per explant after 28 days on shoot induction medium across a variety of soybean genotypes. Each genotype was incubated on solid co-cultivation medium containing either 0 mg/l (hatched bar) or between 400 and 1,000 mg/l (solid bar) cysteine. For each genotype, the number of explants sampled were as follows (*n* = -cysteine, *n* = +cysteine): MN0901 (38, 72), MN1301 (21, 49), Lambert (11, 36), Bert (85, 176), A3237 (3, 13), MN1801 (3, 12), MN0301 (4, 13), MN1401 (10, 11), Granite (4, 5). The bar above each cysteine treatment represents the standard error between explants

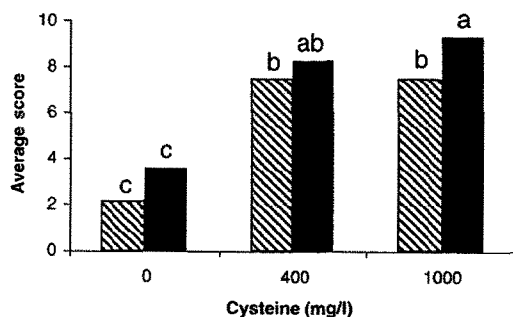


Fig. 4 The average GUS score on soybean cv. Bert explants 5 days after inoculation with either the *Agrobacterium* strain AGL1 carrying pBSF16 (hatched bar) or LBA4404 carrying pTOK233 (solid bar) and incubated on 0, 400, or 1,000 mg/l cysteine. Bars topped with different letters show significant differences among treatments according to LSD ($\alpha=0.05$)

and other thiol compounds inhibit wound- and plant pathogen-induced responses, rendering the cot-node cells more susceptible to *Agrobacterium* infection and thereby increasing the capacity for *Agrobacterium*-mediated transformation of these totipotent soybean cells.

The practicality of using thiol compounds as additives in the solid co-cultivation medium is, in part, contingent upon this treatment increasing the frequency of transformed cells in a wide variety of soybean genotypes, *Agrobacterium* strains, and binary plasmids. To determine whether the increase in the frequency of transformed cells is independent on soybean genotype, we conducted GUS assays on explants of different genotypes following co-cultivation on medium containing either 0 mM or 0.7 mM DTT. Soybean genotypes A3237, Thorne, Jack, and Resnik all showed an increase in the frequency of explants with GUS⁺ foci compared to explants co-cultivated on unmodified medium (data not

shown). Stable transformation was also tested by staining explants after 28 day on shoot induction medium. Nine different genotypes were co-cultivated on medium containing either 0 mg/l or 400–1,000 mg/l cysteine and the number of GUS⁺ sectors recorded (Fig. 3). GUS assay of the callus/shoot pad showed that all of the genotypes tested responded to the cysteine treatment with a significant increase in GUS⁺ sectors over the 0 mg/l cysteine control regardless of the differences in susceptibility to *Agrobacterium* infection that have been reported for soybean genotypes (Byrne et al. 1987; Delzer et al. 1990; Meurer et al. 1998; Cho et al. 2000).

Experiments were also conducted to establish whether the increase in transformed cells in explants treated with cysteine is dependent upon the particular *Agrobacterium* strain/binary plasmid by inoculating explants with either LBA4404/pTOK233 or AGL1/pBSF16. Scores for GUS assays were determined on 5-day-old explants that were inoculated with each *Agrobacterium* strain and incubated on co-cultivation plates containing 0, 400, or 1,000 mg/l cysteine (Fig. 4). Both *Agrobacterium* strains carrying different binary vectors responded to the cysteine treatments with a significant increase in GUS⁺ foci compared to explants co-cultured on no cysteine. A slight but significant increase in GUS⁺ foci was detected using the strain LBA4404/pTOK233 plasmid when the explants were incubated with 1,000 mg/l cysteine, which was probably due to the additional *virG* gene incorporated into pTOK233 (Ishida et al. 1996). This *Agrobacterium* strain/binary plasmid independence appears to extend to all thiol compounds since the addition of 0.7 mM DTT to the solid co-cultivation medium also resulted in an increased frequency of explants containing GUS⁺ foci at the cot-node region following inoculation with EHA101/pZY102, EHA105/pBISN1, and GV3101/pBISN1 (data not shown).

The results show that thiol compounds, copper-chelators, and iron-chelators increased the frequency of transformed cot-node cells during the interaction between the soybean explant and *Agrobacterium*. Since the explant undergoes wounding, pathogen infection, and environmental stresses throughout co-cultivation with *Agrobacterium*, it is expected that a myriad of wound- and pathogen-defense response pathways are active. These defense mechanisms function both by producing phytoalexins and secondary metabolites that serve as repellants or fungicidal/bactericidal agents and by inducing cell death in wounded and infected plant tissue such that a barrier of dead cells is created to protect the adjacent healthy tissue (reviewed in Heath 2000). The increase in the frequency of transformed soybean cot-node cells is indicative of a reduced plant defense response to pathogen attack and wounding, consequently resulting in a reduction in plant cell death and an increase in bacterial susceptibility. Whether the thiol compounds increase the frequency of transformed cells through reducing death of cot-node cells or *Agrobacterium* is uncertain.

The reduction of enzymatic browning in conjunction with the increase in the frequency of transformed cells

when cysteine is applied during co-cultivation favors the view that the enzymes PPOs and PODs are being inhibited, thereby increasing *Agrobacterium* infection and reducing enzymatic browning on the explant. Results from the addition of D-cysteine, DTT, glutathione, bathocuproline disulfonic acid, and bathophenanthroline disulfonic acid to the solid co-cultivation medium support this hypothesis. However, we observed that even though explants co-cultivated on medium containing sodium thiosulfate showed a significant increase in GUS⁺ foci, the browning on wounded explant surfaces remained significant. Why sodium thiosulfate did not entirely inhibit enzymatic browning like the other compounds tested is unclear; however, the thiol compounds and metal chelators studied may inhibit either the plant defense response enzymes or secondary metabolites in very different ways but nonetheless all increase the frequency of transformed cells. For instance, the concentration of various plant-derived phenolic compounds has been shown to influence the virulence of *Agrobacterium* and delivery of T-DNA into plant cells in a threshold-dependent manner (Bolton et al. 1986; Lee et al. 1995). Alternatively, sodium thiosulfate may slowly oxidize during co-cultivation, thereby leading to enzymatic browning of wounded plant cells but not before the increase in transformed cells is effected. Whatever the circumstance, it is apparent that the reduction of enzymatic browning throughout the entire 5-day co-cultivation period is not a prerequisite for the increased frequency of transformed cot-node cells mediated by sodium thiosulfate.

Our results indicate that thiol compounds, copper chelators, and iron chelators increase the frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cot-node cells, most likely by acting as inhibitors of plant defense response mechanisms. The increase in the frequency of transformed cells obtained by the addition of thiol compounds to the solid co-cultivation medium is independent of soybean genotypes and *Agrobacterium* strains, as well as of binary vectors, making this approach to improving *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cot-node cells generally useful. Further research into the inhibition of explant wound and pathogen responses may lead to even greater increases in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean and other recalcitrant plant species, especially legumes. The increased frequency of transformed cells combined with improvements in the other steps of the transformation system will increase the efficiency of producing transgenic soybean plants using the cot-node method.

Acknowledgements We would like to thank David W. Plank for the discussions on subjects presented in this paper, Christopher M. Donovan for his technical assistance with the cot-node method, and Paul D. Matthews for critical review of this manuscript. This study was funded in part by the Minnesota Soybean Research and Promotion Council, North Central Soybean Research Program and the Minnesota Agricultural Experiment Station.

References

- Bolton GW, Nester EW, Gordon MP (1986) Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. *Science* 232:983–985
- Byrne MC, McDonnell RE, Wright MS, Carnes MG (1987) Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium*-soybean interaction. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 8:3–15
- Cho H-J, Farrand SK, Noel GR, Widholm JM (2000) High-efficiency induction of soybean hairy roots and propagation of the soybean cyst nematode. *Planta* 210:195–204
- Delzer BW, Somers DA, Orf JH (1990) *Agrobacterium tumefaciens* susceptibility and plant regeneration of 10 soybean genotypes in maturity groups 00 to II. *Crop Sci* 30:320–322
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151–158
- Heath MC (2000) Non-host resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* 3:315–319
- Hellens R, Mullineaux P (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci* 5:446–451
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6:271–282
- Hinchee MAW, Connor-Ward DV, Newell CA, McDonnell RE, Sato SJ, Gasser CS, Fischhoff DA, Re DB, Fraley RT, Horsch RB (1988) Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Biotechnology* 6:915–922
- Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res* 2:208–218
- Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat Biotechnol* 14:745–750
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901–3907
- Koncz C, Schell J (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* 204:383–396
- Kosugi S, Ohashi Y, Nakajima K, Arai Y (1990) An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. *Plant Sci* 70:133–140
- Lee Y-W, Jin S, Sim W-S, Nester EW (1995) Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:12245–12249
- Mayer AM, Harel E (1979) Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18:193–215
- Meurer CA, Dinkins RD, Collins GB (1998) Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. *Plant Cell Rep* 18:180–186
- Mittler R, Herr EH, Orvar BL, van Camp W, Willekens H, Inzé D, Ellis BE (1999) Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14165–14170
- Molvig L, Tabe LM, Eggum BO, Moore AE, Craig S, Spencer D, Higgins TJV (1997) Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupines (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed albumin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8393–8398
- Narasimhulu SB, Deng X-B, Sarria R, Gelvin SB (1996) Early transcription of *Agrobacterium* T-DNA genes in tobacco and maize. *Plant Cell* 8:873–886
- Negishi O, Ozawa T (2000) Inhibition of enzymatic browning and protection of sulfhydryl enzymes by thiol compounds. *Phytochemistry* 54:481–487

- Nicolas JJ, Richard-Forget FC, Goupy PM, Amiot M-J, Aubert SY (1994) Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 34:109–157
- Olhofs PM, Somers DA (2001) L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep* DOI 10.1007/s002990100379 (this issue)
- Perl A, Lotan O, Abu-Abied M, Holland D (1996) Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for grape (*Vitis vinifera* L.): the role of antioxidants during grape-*Agrobacterium* interactions. *Nat Biotechnol* 14:624–628
- Richard-Forget FC, Goupy PM, Nicolas JJ (1992) Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. 2. Kinetic studies. *J Agric Food Chem* 40:2108–2113
- Vámos-Vigyázó L (1981) Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 15:49–127
- Walker JRL, Ferrar PH (1998) Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnol Gen Eng Rev* 15:457–498
- Wojtaszek P (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* 322:681–692
- Zhang Z, Xing A, Staswick P, Clemente TE (1999) The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 56:37–46

제 2 절 전 세계로부터 수집한 대두 품종 목록

	ACCE NO.	CULTIVAR NAME	JAPANESE NAME	ORIGIN	SOUR
1	00034053	1040-3-23-1		SWEDEN	
2	00034056	1040-3-23-4		SWEDEN	
3	00034763	3802		FOREIGN(UNKNOWN)	
4	00034396	49 S 103 DL/63/160 G.m		JAPAN(UNKNOWN)	
5	00034394	53 S 44 DL/64/162		SOUTH AFRICA	
6	00034395	53 S 59 DL/64/163		SOUTH AFRICA	
7	00034393	54 S 114 DL/64/164		SOUTH AFRICA	
8	00032732	55-2 G.m		AI CHI	
9	00032730	56-2		AI CHI	
10	00030619	5919-1		CHINA	
11	00034058	827-4-23-46		SWEDEN	
12	00034051	990-13-2-5-3-1		SWEDEN	
13	00031819	A 100		USA	
14	00034115	A 38		JAPAN(UNKNOWN)	
15	00034098	A 383		GERMANY	
16	00034099	A 386		GERMANY	
17	00034112	A 403		GERMANY	
18	00034100	A 425		GERMANY	
19	00034101	A 438		GERMANY	
20	00034102	A 448		GERMANY	
21	00034103	A 455		GERMANY	
22	00034089	A 560		GERMANY	
23	00034108	A 568		GERMANY	
24	00031864	A 576		GERMANY	ASIA
25	00034096	A 602		GERMANY	
26	00034111	A 606		GERMANY	
27	00034097	A 609		GERMANY	
28	00034634	A 62-1		USA	
29	00034635	A 62-2		USA	
30	00033751	A 92		TAIWAN	
31	00030884	A-B(SHIROGE) G.m	A-b (白毛)	AKITA	
32	00034755	ABURA G.m	油	JAPAN(UNKNOWN)	
33	00031625	ABURA DAIZU	油大豆	MIYAZAKI	ASIA
34	00031044	ABURA MAME	油豆	FUKUSHIMA	
35	00034399	ACME		FOREIGN(UNKNOWN)	
36	00030469	ADAMS		USA	
37	00034686	ADELPHIA		USA	
38	00034515	AGATE		USA	
39	00032968	AKA DAIZU (ODA DENZOU) G.m	赤大豆 (小田伝蔵)	TOTTORI	
40	00031447	AKASAYA (AOMORI) G.m	赤莢 (青森)	AOMORI	
41	00032159	AKASAYA (FUKUI) G.M	赤莢 (福井)	IBARAKI	
42	00032161	AKASAYA (IBARAKI) G.m	赤莢 (茨城)	IBARAKI	
43	00032160	AKASAYA (ISHIOKA) G.m	赤莢 (石岡)	IBARAKI	
44	00031876	AKASAYA (MATSUO) G.m	赤莢 (松尾)	NAGANO	
45	00031567	AKASAYA (MEJIRO) G.m	赤莢 (目白)	NAGANO	ASIA
46	00031432	AKASAYA (NAGANO) G.m	赤莢 (長野)	GIFU	
47	00032156	AKASAYA (TOYAMA) G.m	赤莢 (富山)	JAPAN(UNKNOWN)	
48	00032955	AKASAYA (YAMAGUCHI) G.m	赤莢 (山口)	YAMAGUCHI	
49	00032107	AKASAYA (ZAKOUJI) G.m	赤莢 (座光寺)	NAGANO	
50	00058944	AKASAYA 1 G.m	赤莢 1号	HOKKAIDOU	
51	00034743	AKSARBEN		FOREIGN(UNKNOWN)	
52	00030734	AMAKUSA G.m	天草	KUMAMOTO	
53	00033144	AMAKUSA NOUICHI G.m	天草農一	KUMAMOTO	ASIA
54	00034704	AMCOR		USA	
55	00034365	AMERICAN JELLOW		FOREIGN(UNKNOWN)	
56	00034131	AMERICAN YELLOW		POLAND	
57	00034671	AMSOY		USA	
58	00034622	AMSOY 71		USA	
59	00034332	AMURSKA 41		USSR	
60	00034384	AMURSKY		USSR	
61	00034175	AMURSZKAJA 41		USSR	
62	00034084	AMUJURU SUKAYA	アムールスカヤ	USSR	
63	00034132	AMUYSKAJE		POLAND	
64	00033700	AN TU XIAD HEI DOU	安 小黑豆	CHINA	
65	00033343	ANBYONTAE	安 豆	REP. KOREA	
66	00033945	ANKUR		INDIA	
67	00033263	ANZUN DAIPIP		FOREIGN(UNKNOWN)	
68	00031004	AO BISHI G.m	青莢	IWATE	
69	00032498	AO CHOUHIN 1 G.m	青長品 1号	NAGANO	
70	00032513	AO CHOUHIN 15(MURASAKI BANA) G.m	青長品 15号 (紫花)	NAGANO	
71	00032514	AO CHOUHIN 15(SHIRO BANA) G.m	青長品 15号 (白花)	NAGANO	

72	00031266	AO CHOUHIN 17 G.m	青良品17号	FUKUSHIMA
73	00033722	AO HIGUU	青ヒグー	TAIWAN
74	00031144	AO HIRA G.m	青平	IWATE
75	00033726	AO KAWAMAME(UNRIN) G.m	青皮豆(雲林)	OKINAWA
76	00031163	AO SHOURYUU G.m	青小粒	AOMORI
77	00033014	AOCHI(NATSU) G.m	青地(夏)	MIYAZAKI
78	00034415	ARISOY		USA
79	00034551	ARKSOY		USA
80	00030817	ARLINGTON		USA
81	00032829	ASAHI NAME(TAIRYUU) G.m	旭豆(大粒)	JAPAN(UNKNOWN)
82	00032951	ASAJIRO G.m	朝白	HIROSHIMA
83	00030816	AUSTIN		USA
84	00034082	AUSTRALIA		USSR
85	00034766	AVOYELLES		USA
86	00032975	AZE DAIZU G.m	畦大豆	NAGASAKI
87	00031522	AZE MINORI G.m	あぜみのり	NIGATA
88	00034114	B 31		GERMANY
89	00034095	B 52		GERMANY
90	00034296	BAJ MEJ		CHINA
91	00034424	BANSEI	晩生	USA
92	00033107	BANSEI 30 G.m	晩生30号	FUKUOKA
93	00033695	BE DI GAO	薄地高	CHINA
94	00034694	BEDFORD		USA
95	00034623	BEESON		USA
96	00034718	BEESON 80		USA ASIA
97	00033697	BEILIANG 8	北良8号	CHINA
98	00034282	BELIKA LATE		YUGOSLAVIA
99	00034311	BELJUSKA 636		USSR
100	00034670	BETHEL		USA
101	00034425	BETHEL(PERRY/F.C.33243)		USA
102	00033738	BIENVILLE		USA
103	00030462	BIKUNI PI 238926		TAIWAN
104	00034767	BILOXI		USA
105	00034768	BILOXI 1/56		USA
106	00034769	BILOXI 1/57		USA
107	00030645	BILOXI(BEIKOKU)		USA
108	00034770	BILOXI/EASYCOOK		USA
109	00033579	BISHUU DAIZU	徽州大豆	CHINA
110	00034343	BITTERHOF		FRANCE
111	00034243	BITTERHOF A		HUNGARY
112	00034177	BITTERHOF C		FOREIGN(UNKNOWN)
113	00034374	BITTERHOF S GELBRUHE		FRANCE
114	00031980	BLACK EYEBLOW		USA
115	00034426	BLACK EYEBROW		USA
116	00030508	BLACK HAWK		USA
117	00034134	BLACK TOKIO		POLAND
118	00034387	BLY VOOR DL/64/179		SOUTH AFRICA
119	00034689	BOMBAY		USA
120	00033675	BONGCHUNBAEKIMI	奉天白眉	CHINA
121	00031753	BONMINORI G.m	ボンミノリ	IBARAKI
122	00034629	BONUS		USA
123	00034427	BOONE PI(USA)54563-3		USA
124	00034615	BOSSIER		USA
125	00034657	BRAGG		USA
126	00034135	BRILLMEYEROVA GIESSERISKA		FOREIGN(UNKNOWN)
127	00034388	BROWNIE DL/64/177		SOUTH AFRICA
128	00034706	BSR 302		USA
129	00034517	BURWELL		FOREIGN(UNKNOWN)
130	00034093	C 4		GERMANY
131	00034757	C N S		BRAZIL
132	00034215	CABOTT		HUNGARY
133	00034314	CALBENA ROMINASCA L 22		RUMANIA
134	00034313	CALBENA ROMINASCA L 605		RUMANIA
135	00034312	CALBENA ROMINASCA L 620		RUMANIA
136	00034626	CALLAND		USA
137	00034428	CARLIN		USA
138	00034672	CATLER 71		USA
139	00054956	CENTENIAL		PARAGUAY
140	00034719	CENTURY		USA ASIA
141	00031597	CHA MAME SHOURYUU	茶豆小粒	SHIZUOKA ASIA
142	00033569	CHA MASSHOKUTOU G.m	茶? 食豆	CHINA
143	00033629	CHA MASSOKUTOU	茶? 食豆	CHINA
144	00030835	CHA SHOURYUU G.m	茶小粒	KANTOU TOUZAN(UNKNOWN)

145	00034136	CHABA RO WEKOYU		FOREIGN (UNKNOWN)	
146	00034179	CHARGINSZKAJA 111		HUNGARY	
147	00033762	CHAU GIANG		VIETNAM	
148	00033328	CHEONGYE MYONGTAE		REP. KOREA	
149	00034557	CHEROKEE		USA	
150	00034429	CHESTNUT		USA	
151	00034172	CHESTNUT WASHINGTON		USA	
152	00031667	CHIEF		USA	
153	00033765	CHIENGMAI PALMETTO		THAILAND	
154	00033772	CHIENGMAI S B 60		THAILAND	
155	00033773	CHIENGMAI S K 6		THAILAND	
156	00034292	CHINA		CHINA	
157	00034253	CHINA BLACK		YUGOSLAVIA	
158	00031821	CHIPPEWA		USA	
159	00039067	CHOGETSU G.m		JAPAN (UNKNOWN)	
160	00030805	CHOUTAN	長湍	KOREA	
161	00031645	CHOUTAN SHIROME	長湍白目	KOREA	ASIA
162	00032675	CHUU TEPPU G.m	中鉄砲	KOREA	
163	00033718	CHUUGOKU 58-161	中国58-161	CHINA	ASIA
164	00033719	CHUUGOKU SOTOU 1	中国麻豆1号	CHINA	ASIA
165	00032954	CHUJUKU DAIZU G.m	中熟大豆	SHIMANE	
166	00033749	CHUJUKU 1	中熟1号	TAIWAN	
167	00034431	CLARK		USA	
168	00033756	CLARK 63		PHILIPPINES	
169	00034558	CLEMSON		USA	
170	00034432	CLOUD		USA	
171	00034559	CNS		USA	
172	00031383	COL/AOMORI/1983-1 G.m	COL青森1983-1号	AOMORI	
173	00031419	COL/AOMORI/1983-39 G.m	COL青森1983-39号	AOMORI	
174	00032894	COL/EHIME/1983/UTSUNOMIYA 1 G.m	COL愛媛1983宇都宮1	EHIME	
175	00032930	COL/EHIME/1983/UTSUNOMIYA 37	COL愛媛1983宇都宮37	EHIME	
176	00031542	COL/FUKUI/1983/MAWAKI 1 G.m	COL福井1983間脇1号	FUKUI	
177	00031544	COL/FUKUI/1983/MAWAKI 4 G.m	COL福井1983間脇4号	FUKUI	
178	00034045	COL/NEPAL/1978/WATANABE 1		NEPAL	
179	00034046	COL/NEPAL/1978/WATANABE 5		NEPAL	
180	00030713	COLUMBIA		USA	
181	00040138	COMET (PAGADA MANDARIN)		USA	
182	00034624	CORSOY		USA	
183	00034560	CREOLE		USA	
184	00034235	CREST		USA	
185	00034796	CRISTALINA		BRAZIL	
186	00034707	CUMBERLAND		USA	
187	00034616	CURTIS		USA	
188	00032353	CLUSTER		USA	
189	00034433	CYPRESS 1		USA	
190	00034138	CZAVNA S W H N		POLAND	
191	00034294	CZI HUA 4		CHINA	
192	00033137	D 4 (SHIROBESO)	D 4 (白膳)	JAPAN (UNKNOWN)	
194	00031663	DAIOUTOU	大豆	CHINA	ASIA
195	00033759	DALAT A		VIETNAM	
196	00033760	DALAT B		VIETNAM	
197	00034362	DANS DESMARAIS		FRANCE	
198	00034667	DARE		USA	
199	00033764	DAU NANH		VIETNAM	
200	00034698	DAVIS		USA	
201	00034666	DELMAR		USA	
202	00034744	DELSOY		USA	
203	00031360	DEWAMUSUME G.m	デワムスメ	AKITA	
204	00034180	DIECKMANN'S HELLGELBE		HUNGARY	
205	00034139	DIECKMANN'S GRUNGELBE		YUGOSLAVIA	
206	00034285	DIECKMANN'S GRUNGELBE		GERMANY	
207	00034140	DIECKMANN'S SCHWARZE		POLAND	
208	00030714	DIKUSHI	ディクシー	USA	
209	00034352	DIPPE FRUHEGELB 14/9		FRANCE	
210	00034213	DIPPES		HUNGARY	
211	00031972	DIXIE		USA	
212	00034079	DNEPROVSKAJA 12		USSR	
213	00034212	DOBROGEANA		HUNGARY	
214	00034795	DOKO		BRAZIL	
215	00034223	DOMACA		HUNGARY	
216	00034274	DOMESTIC BIJELJINA		YUGOSLAVIA	
217	00034273	DOMESTIC VERUSIC		YUGOSLAVIA	
218	00032423	DORMAN		USA	

219	00034753	DORTCHSOY 2		USA
220	00034129	DORUBINGEV WEISSBLUHEWDA		POLAND
221	00040130	DR BRILIMAYER 2800		FRANCE
222	00034171	DR EASY COOK		HUNGARY
223	00033833	DS 73-16		INDIA
224	00033823	DS 74-57-2		INDIA
225	00030470	DUNFIELD		USA
226	00034369	DUNFIELD SOY BEAN		USA
227	00032281	DYER		USA
228	00033733	E 86		TAIWAN
229	00033960	E C 101880		INDIA
230	00033874	E C 114524		INDIA
231	00034130	EARLY BROWN		POLAND
232	00034143	EARLY MANDARIN		POLAND
233	00034521	EARLY WHITE EYEBROW G.m		JAPAN(UNKNOWN)
234	00034754	EASYCOOK		USA
235	00030715	EBONY		USA
236	00034747	EDNA G.m		JAPAN(UNKNOWN)
237	00032065	EMPEROR		USA
238	00033678	ENNOU 3	緑農3号	CHINA
239	00032237	ENREI G.m	エンレイ	NAGANO
240	00034674	EVANS		FOREIGN(UNKNOWN)
241	00034509	FC 33243		USA
242	00034072	FISKEBY 5		SWEDEN
243	00034065	FISKEBY V		SWEDEN
244	00031993	FISKELY		USA
245	00034214	FLAMBEAU		USA
246	00034337	FLORA		RUMANIA
247	00034436	FORD		USA
248	00034669	FORREST		USA
249	00034733	FOSTER		USA ASIA
250	00034709	FRANKLIN		USA
251	00034803	FT 2		BRAZIL
252	00033018	FUJIMISUME G.m	フジスミ	SAGA
253	00030628	FUKUNAGAHA G.m	フクナガハ	JAPAN(UNKNOWN)
254	00033204	FUKUYUTAKA G.m	フクユタカ	KUMAMOTO
255	00034438	FUNK DELICIOUS		USA
256	00031463	FUSANARI G.m	房成	NIIGATA
257	00032997	FUFU DAIZU G.m	夫婦大豆	KAGOSHIMA
258	00034606	G GRACILIS T 135-589		FOREIGN(UNKNOWN)
259	00034607	G GRACILIS T 135-590		FOREIGN(UNKNOWN)
260	00034608	G GRACILIS T 34		FOREIGN(UNKNOWN)
261	00034599	G USSURIENSIS 203246 G.m		JAPAN(UNKNOWN)
262	00034596	G USSURIENSIS T 106-2 G.m		JAPAN(UNKNOWN)
263	00034597	G USSURIENSIS T 106-6 G.m		JAPAN(UNKNOWN)
264	00034609	G USSURIENSIS T 133 G.m		JAPAN(UNKNOWN)
265	00033745	G GRACILIS		USA
266	00033746	G USSURIENSIS		USA
267	00033747	G USSURIENSIS		USA
268	00033748	G USSURIENSIS		USA
269	00034080	G USSURIENSIS		USSR
270	00031816	G USSURIENSIS GIKEN		JAPAN(UNKNOWN)
271	00033616	GAKUZU 2	鄂豆2号	CHINA
272	00034315	GALBEN DE PLATT		RUMANIA
273	00034183	GALBENA DE PLATT		HUNGARY
274	00032959	GANKU MAME G.m	ガンクイ豆	OKAYAMA
275	00034372	GAROLA ROUEST		FRANCE
276	00030957	GEDEN SHIRAZU G.m	下田不知	AKITA
277	00030958	GEDEN SHIRAZU 1 G.m	ゲデンシラズ1号	AKITA
278	00034389	GEDLILD DL/64/174		SOUTH AFRICA
279	00033562	GENHOUKIN	元守金	CHINA
280	00030724	GEORGE WASHINGTON		USA
281	00034565	GEORGIAN		USA
282	00034290	GESSENER		FRANCE
283	00033335	GEUMHWAJAEAE	纒屯在来	REP. KOREA
284	00034523	GIANT GREEN		USA
285	00034145	GISSSENSKA		POLAND
286	00034353	GISSNER STAMM 63		FRANCE
287	00032773	GIFU WASE SENSUTSU G.m	岐阜早生選出	GIFU
288	00033155	GIN DAIZU(OKAYAMA)	銀大豆(岡山)	OKAYAMA
289	00034720	GNOME		USA ASIA
290	00034439	GOKU		USA
291	00033645	GOU 76-6296	喰76-6296号	CHINA

292	00034440	GRANGER		USA
293	00034441	GREEN AND BLACK		USA
294	00034356	GRIGNON 41		FRANCE
295	00034238	GRIGNON 4B		HUNGARY
296	00034442	QUELPH		USA
297	00034808	H 15		TAIWAN
298	00033989	H 16264		INDIA
299	00033916	H 34065		INDIA
300	00034659	H L 62-973		USA
301	00034085	HABAROSUKAYA	ハバロスカヤ	USSR
302	00030644	HAKKA ZASHI	白花?子	CHINA
303	00034443	HAKOTE		USA
304	00033571	HAKUBI	白眉	CHINA
305	00034146	HALFON 502		POLAND
306	00034373	HALTON 502-2		FRANCE
307	00039639	HAMAHINDAELIP		REP. KOREA
308	00034309	HARBINSKA 231		USSR
309	00032546	HARBINSOY		USA
310	00034693	HARDEE		USA
311	00034664	HARLY		USA
312	00030471	HAROSDY		USA
313	00031196	HATO GOROSHI 12 G.m	鳩殻し12	JAPAN(UNKNOWN)
314	00031539	HATSUKOGANE G.m	はつこがね	NIIGATA
315	00034348	HATTO JAUNE		FRANCE
316	00031668	HAWKEYE		USA
317	00034567	HAYSEED		USA
318	00033691	HEJIAO 6	合交6号	CHINA
319	00034184	HERB 22		RUMANIA
320	00034185	HERB MULLER 861		HUNGARY
321	00034448	HIGAN		USA
322	00032983	HIGOMUSUME	ヒゴムスメ	SAGA
323	00031259	HILL		USA
324	00030636	HIMEYUTAKA G.m	ヒメユタカ	HOKKAIDOU
325	00034364	HISPIDA A GRAIN JAUNE		FRANCE
326	00033947	HM 1		INDIA
327	00054948	HODGSON		USA
328	00034242	HODONINSKA ZLUTA		HUNGARY
329	00030484	HON-1KU 85 G.M	本育65号	HOKKAIDOU
330	00033577	HOOCHIOU	豊地黄	CHINA
331	00034749	HOOD		USA
332	00034418	HOOD(ROANOKE/N45-745)		USA
333	00034526	HOOSIER		USA
334	00033676	HOOSIRE		CHINA
335	00033566	HOUCHI DAIZU	豊地大豆	CHINA
336	00033073	HOUGYOKU G.m	ホウギョク	KUMAMOTO
337	00032131	HOUJAKU G.m	ほうじゃく	NAGANO
338	00033754	HSI HSI		TAIWAN
339	00034451	HURRELBRINK(B)		USA
340	00033958	I C 24069		INDIA
341	00034802	IAC 8		BRAZIL
342	00034317	IASI 50-2		RUMANIA
343	00033661	ICHIGUOHOU	一萬峰	CHINA
344	00034254	IKAR 111		YUGOSLAVIA
345	00034452	ILLINGTON(A)		USA
346	00030725	ILSOY		USA
347	00034076	IMNERTINSKAJA		USSR
348	00032371	IMPERIAL		USA
349	00033739	IMPROVED PELICAN		USA
350	00033815	INDIA(IC 16811)		INDIA
351	00033830	INDIA(IC 24527)		INDIA
352	00034241	IREGI KORONA		HUNGARY
353	00034174	IREGI UNIVERSAL		HUNGARY
354	00031239	IWATE 2 G.m	岩手2号	IWATE
355	00030990	IWATE YAGI 1 G.m	岩手野起1号	IWATE
356	00034793	J 289		BRAZIL
357	00033949	J S 72-3		INDIA
358	00034570	JACKSON		USA
359	00034349	JAUNE DE DESME		FRANCE
360	000338	JAVA (BORNEO)		
361	00034455	JEFFERSON		USA
362	00034571	JEW 45		USA
363	00033705	JILIN 1B	吉林18号	CHINA
364	00033864	JS 72-5		INDIA

365	00034297	JUAN BAO CZIN		CHINA
366	00034527	KASOTT		USA
367	00034019	KADI BHATTO		NEPAL
368	00032825	KAIJU GYUUMOU OU 1	開封牛毛黄1号	CHINA
369	00033009	KAIKEN HAKKA	開原白花	CHINA
370	00033025	KANEKO G.m	金子	SAGA
371	00034457	KANRICH		USA
372	00032271	KANTOU 6 G.m	関東6号	IBARAKI
373	00031854	KANTOU 65 G.m	関東65号	IBARAKI
374	00033727	KARASUMAME(SHINCHIKU)	烏豆(新竹)	TAIWAN
375	00031533	KARIHA TAKIYA G.m	刈羽薄谷	NIIGATA
376	00030478	KARIKACHI	カリカチ	HOKKAIDOU
377	00031368	KARIKEI 102 G.m	刈系102号	AKITA
378	00031329	KARUMA G.m	カルマイ	AKITA
379	00032583	KEBURI G.m	毛振	SAITAMA
380	00033628	KEI 348	系348	CHINA
381	00033826	KHSE 2		INDIA
382	00033646	KICHIRIN 3	吉林3号	CHINA
383	00034461	KIM(RINCHLAND/SAC//SAC)		USA
384	00031763	KIMUSUME IBARAKI 1 G.m	生娘茨城1号	IBARAKI
385	00033568	KIN OU 1	金黄1号	CHINA
386	00034462	KINGSTON		USA
387	00033682	KIRIN 15	吉林15号	CHINA
388	00034300	KIROVGRADSKA 5		USSR
389	00030554	KITAHOMARE G.m	キタホマレ	HOKKAIDOU
390	00030481	KITAMI NAGAHA G.m	北見長葉	HOKKAIDOU
391	00030482	KITAMI NAGAHA(SHIROME) G.m	北見長葉(白目)	HOKKAIDOU
392	00030487	KITAMI SHIRO G.m	北見白	HOKKAIDOU
393	00030530	KITAMUSUME G.m	キタムスメ	HOKKAIDOU
394	00031234	KIZUKURI ZAIRAI G.m	不選在来	AOMORI
395	00033016	KOGANEDAIZU G.m	コガネダイズ	SAGA
396	00030513	KOGANEJIRO G.m	コガネジロ	HOKKAIDOU
397	00039467	KOHACHI DAIZU L 166-2 G.m	小八大豆	AKITA
398	00039468	KOHACHI DAIZU L 167 G.m	小八大豆	AKITA
399	00033729	KOHAMASHU(MURASAKI BANA)	小浜種(紫花)	TAIWAN
400	00033730	KOHAMASHU(SHIRO BANA)	小浜種(白花)	TAIWAN
401	00031766	KOKESHIJIRO G.m	コケシジロ	IBARAKI
402	00033673	KOKUIKU 44	国育44号	CHINA
403	00030627	KOMAMUSUME G.m	コマムスメ	JAPAN(UNKNOWN)
404	00034464	KOREAN		USA
405	00031458	KOU 103 G.m	交103号	NIIGATA
406	00031343	KOU 262	公262号	CHINA
407	00034345	KOUBAN O 375		FRANCE
408	00033641	KOUKOU 6514-2	公交6514-2号	CHINA
409	00030657	KOUSHUREI 235	公主銀235号	CHINA
410	00034251	KROMERIZAKA		RUMANIA
411	00034158	KRUSOLIA		POLAND
412	00030737	KUMA G.m	球磨	KUMAMOTO
413	00034306	KUPESKA 77		USSR
414	00034465	KURA		USA
415	00033051	KURO DAIZU	黒大豆	KUMAMOTO
416	00032346	KURO DAIZU G.m	黒大豆	KANTOU TOUZAN(UNKNOWN)
417	00032535	KURO DAIZU G.m	黒大豆	IBARAKI
418	00031284	KURO DAIZU G.m	黒大豆	AOMORI
419	00033981	L 188		INDIA
420	00034277	L 244		YUGOSLAVIA
421	00033985	L 643		INDIA
422	00034732	LABOTO		USA
423	00034711	LAKOTA		USA
424	00034750	LEE		USA
425	00030721	LEXINGTON		USA
426	00031670	LINCOLN		USA
427	00034467	LINDARIN		USA
428	00034468	LITTLE WONDER		USA
429	00033993	M 101		INDIA
430	00033844	M 327		INDIA
431	00034469	MACOUPIN		USA
432	00031671	MANDARIN		USA
433	00034351	MANDARIN YOWA		FRANCE
434	00034529	MANDARIN(OTTAWA)		USA
435	00034358	MANDCHU HUDSON		FRANCE
436	00034474	MANDELL		USA
437	00034530	MANITOBA BROWN		USA

438	00033677	MANJUTAE	満州大	CHINA
439	00033141	MANSHU MASSHOKUTOU	満州?食豆	CHINA
440	00031227	MASSHOKU MAME(KOU 504)	?食豆(公504号)	CHINA
441	00030710	MASSHOKUTOU ROSHIYASHU	?食豆ロシヤ種	CHINA
442	00030711	MASSHOKUTOU(KOU 502)	?食豆(公502号)	CHINA
443	00030709	MASSHOKUTOU(KOU 503)	?食豆(公503号)	CHINA
444	00034390	MASTERPIECE DL/64/174		SOUTH ASIA(UNKNOWN)
445	00033023	MATSUBA DAIZU G.m	松葉大豆	SAGA
446	00031627	MATSUBA DAIZU G.m	松葉大豆	KAGOSHIMA ASIA(UNKNOWN)
447	00032977	MATSUURA G.m	松浦	SAGA
448	00034371	MEDIASCHER BRAUNE		FRANCE
449	00034531	MEDIUM GREEN		USA
450	00034404	MERIT		USA
451	00034691	MILLER 67		USA
452	00032231	MISUZUDAIZU G.m	ミスズダイズ	NAGANO
453	00031029	MIYAGI SHIROME G.m	ミヤギシロメ	MIYAGI
454	00032673	MIYAGIJOJIRO G.m	ミヤギオオジロ	NAGANO
455	00031760	MIYASHIRO JUN 1 G.m	御社純1号	IBARAKI ASIA(UNKNOWN)
456	00034535	MONROE(MUKDEN/MANDARIN)		USA
457	00034224	MONTREAL		HUNGARY
458	00031672	MONTREAL MANCHU		USA
459	00030722	MORSE		USA
460	00030979	MUTSUMEJIRO G.m	ムツメジロ	AKITA
461	00030981	MUTSUSHIRATAMA G.m	ムツシラタマ	AKITA
462	00034739	N 45-2994		USA
463	00032649	NAKASENNARI G.m	ナカセンナリ	NAGANO
464	00031357	NANBUSHIROME G.m	ナンブシロメ	AKITA
465	00032232	NASUSHIROME	ナスシロメ	NAGANO
466	00034613	NC 1-2-2		FOREIGN(UNKNOWN)
467	00030818	NEMASHIRAZU G.m	ネマシラス	AKITA
468	00034033	NEPAL(ACC 0162)		NEPAL
469	00034034	NEPAL(ACC 0164)		NEPAL
470	00034041	NEPAL(ACC 0192)		NEPAL
471	00034042	NEPAL(ACC 0197)		NEPAL
472	00031461	NEZUMI SAYA G.m	鼠莢	NIIGATA
473	00034536	NORCHIEF(FLAMB./HAWKEYE)		USA
474	00034640	NORMAN		USA
475	00034801	NUMBAIRA		BRAZIL
476	00033752	O 3B		TAIWAN
477	00034537	OAC 211		USA
478	00032490	OGAWA ZAIRAI(1) G.m	小川在来(1)	NAGANO
479	00032523	OGAWA ZAIRAI(11) G.m	小川在来(11)	NAGANO
480	00032184	OGURA DAIZU G.m	小倉大豆	NAGANO
481	00032118	OGURA DAIZU(SHIRO) G.m	小倉大豆(白)	NAGANO
482	00032119	OGURA OODAMA DAIZU G.m	小倉大玉大豆	NAGANO
483	00033041	OKA DAIZU G.m	岡大豆	JAPAN(UNKNOWN)
484	00030515	OKUHARA 1 G.m	奥原1号	HOKKAIDOU
485	00030821	OKUHARA DAIZU G.m	奥原大豆	HOKKAIDOU
486	00031212	OKUSHIROME G.m	オクシロメ	AKITA
487	00034539	ONTARIO		USA
488	00030936	OODATE 1 G.m	大館1号	AKITA
489	00030823	OYACHI G.m	大谷地	HOKKAIDOU
490	00038901	OYACHI 2 G.m	大谷地2号	HOKKAIDOU
491	00033153	ORIHIME G.m	オリヒメ	KUMAMOTO
492	00030492	OSHIHASHIROME G.m	オシマシロメ	HOKKAIDOU
493	00033564	OUHOUSHU	黄味	CHINA
494	00030926	OUU 13 G.m	奥羽13号	AKITA
495	00034540	PAGODA		FOREIGN(UNKNOWN)
496	00034206	PALMETTO		USA
497	00033761	PALMETTO(U 67-8)		VIETNAM
498	00034199	PANNONIA 10		HUNGARY
499	00031682	PEKING		USA
500	00034480	PENNSOY		USA
501	00031679	PETTEN		USA ASIA(UNKNOWN)
502	00034604	PI(USA)84751		USA
503	00034751	PIONEIRA		FOREIGN(UNKNOWN)
504	00033836	PK 327		INDIA
505	00033865	PK 73-54		INDIA
506	00033868	PK 74-258		INDIA
507	00034190	PLATTER GELBE		RUMANIA
508	00034806	POCHAL		TAIWAN
509	00034639	PRIZE		USA
510	00034752	R 466 G.m		JAPAN(UNKNOWN)

511	00030819	RAIDEN G.m	ライデン	AKITA
512	00031149	RAIKOU G.m	ライコウ	AKITA
513	00034582	RALSOY		FOREIGN(UNKNOWN)
514	00033576	RANSEI	■ 膳	CHINA
515	00030917	RIKUU 27 G.m	陸羽27号	AKITA
516	00034484	ROSS		USA
517	00031674	S 100		USA ASIA(UNKNOWN)
518	00034333	SALUIT		RUMANIA
519	00034383	SALUT		FRANCE
520	00033768	SAN SAI		THAILAND
521	00033763	SANDEK SIENG		CAMBODIA
522	00034485	SANGA		USA
523	00034778	SANTA MARIA	サンタマリア	FOREIGN(UNKNOWN)
524	00034794	SANTA ROSA		BRAZIL
525	00030666	SATOU DAIZU G.m	砂糖大豆	JAPAN(UNKNOWN)
526	00074133	SATOU DAIZU(OTARI) G.m	砂糖大豆(小谷)	NAGANO
527	00030788	SATOU IRAZU G.m	砂糖いらず	JAPAN(UNKNOWN)
528	00034804	SAVANA		BRAZIL
529	00034360	SCHEOKEN		FRANCE
530	00034487	SCIOTO		USA
531	00030650	SCOTT		USA
532	00031805	SEIAN SHOUOUTOU	成安小黄豆	CHINA
533	00034489	SENECA		USA
534	00034490	SHELBY		USA
535	00031445	SHERWOOD		USA
536	00031451	SHIN 1 G.m	新1号	NIIGATA
537	00031452	SHIN 3 G.m	新3号	NIIGATA
538	00031453	SHIN 4 G.m	新4号	NIIGATA
539	00030643	SHINROKU G.m	新六	JAPAN(UNKNOWN)
540	00032943	SHIRO DAIZU 3 G.m	白大豆3号	OKAYAMA
541	00031336	SHIRO HACHIKOKU 2 G.m	白八石2号	FUKUSHIMA
542	00030489	SHIRO TSURUNOKU G.m	白鶴の子	HOKKAIDOU
543	00032050	SHIROGE 9 G.m	白毛9号	FUKUSHIMA
544	00031768	SHIROHANA SAI 1 G.m	白花崎1号	SAITAMA
545	00032236	SHIROMYUTAKA G.m	シロメユタカ	NAGANO
546	00030465	SHIROSAWA G.m	白莢	HOKKAIDOU
547	00033118	SHIROSAWA 1 G.m	白莢1号	KUMAMOTO
548	00033780	SJ 1		THAILAND
549	00033635	SL 19		INDIA
550	00034272	SMALL SEEDS ZOBNATICA		YUGOSLAVIA
551	00034279	SOJA 108/10/2		YUGOSLAVIA
552	00034280	SOJA 121/6/9		YUGOSLAVIA
553	00034379	SOJA 2		FOREIGN(UNKNOWN)
554	00034123	SOJA 26/60 PERAGIS ST II		GERMANY
555	00034121	SOJA 27/60 HEIMKRAFT		GERMANY
556	00034122	SOJA 35/60 KIRSCHES STA 200 G.m		JAPAN(UNKNOWN)
557	00034118	SOJA 38/60 DIPPES FRUHGELBE		GERMANY
558	00034126	SOJA 540/60		FOREIGN(UNKNOWN)
559	00034124	SOJA 542/60		FOREIGN(UNKNOWN)
560	00034125	SOJA 547/60		FOREIGN(UNKNOWN)
561	00034120	SOJA 55/60 DORNBURGER WEISS		GERMANY
562	00040082	SOJA 74-60 DORNBURGERST 150		GERMANY
563	00034278	SOJA 82/5/16		YUGOSLAVIA
564	00034268	SOJA H 1		YUGOSLAVIA
565	00034782	SOJA IAC 70-25		BRAZIL
566	00034783	SOJA IAC 70-559		BRAZIL
567	00034267	SOJA L 17		YUGOSLAVIA
568	00032389	SOUGA ZAIRAI G.m	宗黄在来	NAGANO
569	00030443	SOUTHERN PROLIFIC		USA
570	00034069	SOYBEANS 882-27		SWEDEN
571	00034341	STARACKRANISKAYA		FRANCE
572	00034621	STEELE		USA
573	00030638	SUZUHIME G.m	スズヒメ	HOKKAIDOU
574	00034633	T 201		USA
575	00034642	T 207		USA
576	00033755	T K 5		TAIWAN
577	00031752	TACHISUZUNARI G.m	タチスズナリ	IBARAKI
578	00031066	TAKIYA G.m	滝谷	YAMAGATA
579	00032233	TAMAHIKARI G.m	タマヒカリ	NAGANO
580	00031749	TAMAMUSUME G.m	タムムスメ	IBARAKI
581	00030999	TAMATSUKURI G.m	玉造	MIYAGI
582	00032674	TANREI G.m	タンレイ	NAGANO
583	00033720	TEI ANDAA	低アンダー	TAIWAN

584	00034221	TERRASOL		HUNGARY
585	00034078	TIMIRIAZEREVSKAJA 144		USSR
586	00030526	TOIKU 129 G.m	十育129号	HOKKAIDOU
587	00030516	TOKACHI NAGAHA G.m	十勝長葉	HOKKAIDOU
588	00030639	TOKACHIKURO G.m	トカチクロ	HOKKAIDOU
589	00030532	TOSHI DAI 7910 G.m	十支第7910	HOKKAIDOU
590	00031961	TOUHOKU 41 G.m	東北41号	AKITA
591	00032191	TOUSAN 25	東山25号	NAGANO
592	00030641	TOYOMUSUME G.m	トヨムスメ	HOKKAIDOU
593	00030640	TOYOSUZU G.m	トヨスズ	HOKKAIDOU
594	00034697	TRACY		USA
595	00034632	TRAVERSE		USA
596	00030490	TSURUNOKO G.m	鶴の子	HOKKAIDOU
597	00033837	UPSM 19		INDIA
598	00034074	USSURIJSKAJA 155		USSR
599	00031580	USUAO G.m	薄青	NAGANO ASIA(UNKNOWN)
600	00034497	VIKING(A)		USA
601	00034498	VIKING(B)		USA
602	00031680	VIRGINIA BROWN		USA
603	00034302	VNIIMK 80-72		USSR
604	00034653	W L 49-4124		USA
605	00031676	WABASH		USA
606	00034686	WARE		USA
607	00034665	WILLIAMS		USA
608	00034502	WILLOMI		USA
609	00034503	WILSON		USA
610	00034252	WISCONSIN BLACK		YUGOSLAVIA
611	00034197	WISCONSIN EARLY BLACK		HUNGARY
612	00034506	WOLVERINE(A)		USA
613	00034628	WOODWORTH		USA
614	00093818	XIAOHUANGKE	小黃粉	CHINA
615	00030989	YAMA SHIRATAMA G.m	山白玉	IWATE
616	00030452	YAMAJIRUSHI(CHINA)	やまじるし(中共)	CHINA
617	00030451	YAMAJIRUSHI(USA)	やまじるし(米国)	USA
618	00031810	YASEI DAIZU G.m	野生大豆	OOSAKA ASIA(UNKNOWN)
619	00033630	YASEITOU	野生豆	CHINA
620	00034508	YELLOW MARVEL		USA
621	00033470	YOOKWOO 312-4		REP. KOREA
622	00034668	YORK		USA
623	00030629	YUUHIME G.m	ユウヒメ	HOKKAIDOU
624	00030630	YUUZURU G.m	ユウヅル	HOKKAIDOU
625	00034405	BETHEL (PERRY/F C 33243) G.m		JAPAN(UNKNOWN)
626	00079832	BETTARA MAME G.m	ベッタラマメ	FUKUSHIMA
627	00058958	BIBUNDAIZU G.m	甚分大豆	HOKKAIDOU
628	00031989	BLACK HAWKS		USA
629	00033944	BLACK TUR		INDIA
630	00033689	BONGCHUNBAEKJAM	奉天白?	CHINA
631	00030652	BONJIRO 55	盆白55号	YAMANASHI
632	00044817	BONNAME L 107	盆豆L107	ACMORI
633	00034645	C L 62-1251		USA
634	00034646	C L 63-1677		USA
635	00034647	C L 63-3016		USA
636	00034518	CAPITAL		USA
637	00031736	CHA	茶	GUNMA
638	00031598	CHA MAME	茶豆	HYOUGO ASIA(UNKNOWN)
639	00039424	CHA MAME L 103	茶豆L103	ACMORI
640	00030792	CHA MAME(NOU)	茶豆(濃)	JAPAN(UNKNOWN)
641	00030791	CHA MAME(TAN)	茶豆(淡)	JAPAN(UNKNOWN)
642	00032198	CHAKURAN DAIZU	鵞卵大豆	JAPAN(UNKNOWN)
643	00039290	GAN KUI		JAPAN(UNKNOWN)
644	00032264	GANKUI	雁?	NAGANO
645	00031013	GANKUI 1	雁食1号	TOUHOKU(UNKNOWN)
646	00031014	GANKUI 3	雁食3号	TOUHOKU(UNKNOWN)
647	00034339	ORIGNON 45		FRANCE
648	00033683	GUNSEN 1	群洗1号	CHINA
649	00033201	H 25		KUMAMOTO
650	00031669	HABERLANDT		USA ASIA(UNKNOWN)
651	00031217	HABIKI 1	葉引1号	IWATE
652	00032857	HACHIGATSU DAIZU	八月大豆	TOKUSHIMA
653	00039416	HACHIGATSU MAME L 96	八月豆L96	ACMORI
654	00031385	HACHIMEI MAME	八平豆	NAGANO
655	00058947	HADAKAKURO 1	裸黒1号	HOKKAIDOU
656	00031742	HAGA ZAIRAI	芳賀在来	TOCHIGI

657	00034566	HAHTO		USA
658	00034578	HAMPTON 265 A		USA
659	00034619	HARK		USA
660	00034637	HARWOOD		FOREIGN(UNKNOWN)
661	00032256	HASHIRI	ハシリ	NAGANO
662	00032390	HATA ZAIRAI	畑在来	JAPAN(UNKNOWN)
663	00034147	HEIMKRAFT II		POLAND
664	00034161	HEIMKRAFT I		POLAND
665	00032827	HERBERLANDT		USA
666	00034525	HIDATSA		USA
667	00032782	HISHIUMI ZAIRAI	萋海在来	JAPAN(UNKNOWN)
668	00059029	HOROKANAI ZAIRAI	幌加内在来	HOKKAIDOU
669	00032940	ICHINOMIYA ZAIRAI 1	一の宮在来1	OKAYAMA
670	00032941	ICHINOMIYA ZAIRAI 2	一の宮在来2	OKAYAMA
671	00032942	ICHINOMIYA ZAIRAI 3 G. II	一の宮在来3	OKAYAMA
672	00033220	ICHINOMIYA ZAIRAI 83A	一の宮在来83 A	KUMAMOTO
673	00033221	ICHINOMIYA ZAIRAI 83B	一の宮在来83 B	KUMAMOTO
674	00033222	ICHINOMIYA ZAIRAI 83C	一の宮在来83 C	KUMAMOTO
675	00033223	ICHINOMIYA ZAIRAI 83D	一の宮在来83 D	KUMAMOTO
676	00033224	ICHINOMIYA ZAIRAI 83E	一の宮在来83 E	KUMAMOTO
677	00032125	ICHITA ZAIRAI	市田在来	NAGANO
678	00032140	IYAMA ZAIRAI	飯山在来	NAGANO
679	00032485	INA ZAIRAI (HORI MAME)	伊那在来(のり豆)	NAGANO
680	00032117	INASATO ZAIRAI	伊那里在来	NAGANO
681	00032290	INASATO ZAIRAI II	伊那里在来2	NAGANO
682	00031469	ISHITSUTSUMI (TOYAMA ZAIRAI)	石堤(富山在来)	TOYAMA
683	00033237	IZUMI ZAIRAI 83A	泉在来83 A	KUMAMOTO
684	00033238	IZUMI ZAIRAI 83B	泉在来83 B	KUMAMOTO
685	00033239	IZUMI ZAIRAI 83C	泉在来83 C	KUMAMOTO
686	00033240	IZUMI ZAIRAI 83D	泉在来83 D	KUMAMOTO
687	00033241	IZUMI ZAIRAI 83E	泉在来83 E	KUMAMOTO
688	00039487	JAGETSU ZAIRAI-1	蛇穴在来1	IBARAKI
689	00039488	JAGETSU ZAIRAI-2	蛇穴在来2	IBARAKI
690	00031330	JOUHOUJI ZAIRAI SHU	浄法寺在来種	IWATE
691	00031424	JUUMONJI ZAIRAI	十文字在来	IWATE
692	00052361	KAKIHEI ZAIRAI 7	柿平在来7号	YAMANASHI
693	00032192	KAMIFUKUZAWA ZAIRAI (2)	上磯波在来(2)	JAPAN(UNKNOWN)
694	00032944	KAMIFUSA ZAIRAI (A)	上房在来(A)	JAPAN(UNKNOWN)
695	00032945	KAMIFUSA ZAIRAI (B)	上房在来(B)	OKAYAMA
696	00031901	KAMIHISAKATA ZAIRAI	上久堅在来	NAGANO
697	00031825	KAMIWASHITA ZAIRAI	上岩下在来	JAPAN(UNKNOWN)
698	00031830	KAMIYUZUKI ZAIRAI	上柚木在来	JAPAN(UNKNOWN)
699	00031028	KANNARI ZAIRAI	金成在来	MIYAGI
700	00033234	KAOU ZAIRAI 83A	鹿央在来83 A	KUMAMOTO
701	00033235	KAOU ZAIRAI 83B	鹿央在来83 B	KUMAMOTO
702	00033236	KAOU ZAIRAI 83C	鹿央在来83 C	KUMAMOTO
703	00030771	KASHIMADAI ZAIRAI SHU	鹿島台在来種	JAPAN(UNKNOWN)
704	00033021	KASUGA ZAIRAI	春日在来	SAGA
705	00032652	KITA AIKI ZAIRAI 3	北相木在来3号	NAGANO
706	00032653	KITA AIKI ZAIRAI 4	北相木在来4号	NAGANO
707	00032405	KOBAMAKI ZAIRAI (Y)	吉馬牧在来(Y)	JAPAN(UNKNOWN)
708	00031437	KOBAN MAME(ZAIRAI)	小判豆(在来)	JAPAN(UNKNOWN)
709	00032687	KODANE	小種	AICHI
710	00083073	KOISHIBARA ZAIRAI 90B-a(WASE)	小石原在来90 B-a(早生)	OOITA
711	00083075	KOISHIBARA ZAIRAI 90C	小石原在来90 C	OOITA
712	00083057	KOISHIBARA ZAIRAI 90E	小石原在来90 E	OOITA
713	00083058	KOISHIBARA ZAIRAI 90F	小石原在来90 F	OOITA
714	00083076	KOISHIBARA ZAIRAI 90G	小石原在来90 G	OOITA
715	00083077	KOISHIBARA ZAIRAI 90H	小石原在来90 H	OOITA
716	00031593	KOKASA ZAIRAI	小笠在来	SHIZUOKA ASIA(UNKNOWN)
717	00031421	KUMATSU ZAIRAI	小松在来	IWATE
718	00058972	KONSENZAIRAI 1	糠縄在来1号	HOKKAIDOU
719	00058976	KONSENZAIRAI 3	糠縄在来3号	HOKKAIDOU
720	00030967	KOSAKA ZAIRAI (KATSUBESO)	小坂在来(穂麩)	AKITA
721	00031153	KOSAKA ZAIRAI (KUROBESO)	小坂在来(黒麩)	AKITA
722	00031312	KOTANE	小種	AICHI
723	00033295	KUMKANG SOLIP	金剛小粒	JAPAN(UNKNOWN)
724	00030799	KURO SHOURYUU	黒小粒	JAPAN(UNKNOWN)
725	00032247	MAEDAMURA ZAIRAI	前田村在来	YAMANASHI ASIA(UNKNOWN)
726	00083069	MAETUE ZAIRAI 90A	前津江在来90 A	OOITA
727	00083070	MAETUE ZAIRAI 90B	前津江在来90 B	OOITA
728	00083071	MAETUE ZAIRAI 90C	前津江在来90 C	OOITA
729	00055045	MAGARIKAWA ZAIRAI	曲川在来	JAPAN(UNKNOWN)

730	00032135	MENNAI ZAIRAI	麵内在米	NAGANO
731	00032130	MIRU ZAIRAI	禾生在米	YAMANASHI
732	00033233	MIKAWA ZAIRAI B3	三加和在米 B 3	KUMAMOTO
733	00032486	MISATO ZAIRAI	三郷在米	NAGANO
734	00031826	MIYAHARA ZAIRAI	宮原在米	JAPAN(UNKNOWN)
735	00031439	MOCHI MAME(ZAIRAI)	もち豆(在米)	JAPAN(UNKNOWN)
736	00033108	NAGANO ZAIRAI(YAMAGUCHI)	長野在米(山口)	JAPAN(UNKNOWN)
737	00032690	NAKAHATA ZAIRAI	中畑在米	SHIZUOKA
738	00032589	NAKAJOU ZAIRAI	中条在米	NAGANO
739	00032400	NAKANO ZAIRAI	中野在米	JAPAN(UNKNOWN)
740	00032379	NAKASATO ZAIRAI(C)	中里在米(C)	JAPAN(UNKNOWN)
741	00091913	NAKASATO ZAIRAI(C)-A	中里在米(C) -A	JAPAN(UNKNOWN)
742	00091314	NAKASATO ZAIRAI(C)-B	中里在米(C) -B	JAPAN(UNKNOWN)
743	00032380	NAKASATO ZAIRAI(E)	中里在米(E)	JAPAN(UNKNOWN)
744	00031483	NANGYO ZAIRAI	南魚在米	NIIGATA
745	00033232	NANKAN ZAIRAI B3	南関在米 B 3	KUMAMOTO
746	00032623	NATTOU KOTSURU	納豆小粒	IBARAKI
747	00031365	NINOHE ZAIRAI	二戸在米	IWATE
748	00030857	NISHITSUGARU ZAIRAISHU	西津糖在米	AGORI
749	00030986	OBONAI ZAIRAI	生保内在米	AKITA
750	00031867	ODAGIRI ZAIRAI	小田切在米	NAGANO
751	00031327	OGE ZAIRAI	小出在米	AKITA
752	00032315	OGASAWARA ZAIRAI	小笠原在米	KANTOU TOUZAN(UNKNOWN)
753	00033251	OKAHARA ZAIRAI	岡原在米 B 3	KUMAMOTO
754	00032962	ONNO ZAIRAI	大野在米	OKAYAMA
755	00032938	ONNO ZAIRAI(B)	大野在米(B)	OKAYAMA
756	00032939	ONNO ZAIRAI(C)	大野在米(C)	OKAYAMA
757	00032768	SAGA ZAIRAI	佐賀在米	SAGA
758	00032780	SAISHUUTOU TANSEI ZAIRAI	海州島淡青在米	JAPAN(UNKNOWN)
759	00032528	SAKU ZAIRAI(1)	佐久在米(1)	NAGANO
760	00032529	SAKU ZAIRAI(2)	佐久在米(2)	NAGANO
761	00032116	SASAGA ZAIRAI(BAN)	笹賀在米(晩)	NAGANO
762	00031872	SASAGA ZAIRAI(SOU)	笹賀在米(早)	NAGANO
763	00031890	SEINAJI ZAIRAI	清内糖在米	NAGANO
764	00033227	SHICHIJOU ZAIRAI B3	七城在米 B 3	KUMAMOTO
765	00033256	SHICHIJOU ZAIRAI B3A	七城在米 B 3 A	KUMAMOTO
766	00033257	SHICHIJOU ZAIRAI B3C	七城在米 B 3 C	KUMAMOTO
767	00033258	SHICHIJOU ZAIRAI B3D	七城在米 B 3 D	KUMAMOTO
768	00032044	SHINANOJIRI ZAIRAI	信濃尻在米	NAGANO
769	00031824	SOUKOU ZAIRAI	相興在米	JAPAN(UNKNOWN)
770	00031513	SUMOTO ZAIRAI	穗在米	JAPAN(UNKNOWN)
771	00031352	TAIRADATE ZAIRAISHU	手籠在米	IWATE
772	00032588	TAKAYAMA ZAIRAI	高山在米	NAGANO
773	00031889	TOMIKUSA ZAIRAI	富草在米	NAGANO
774	00033242	TOMOCHI ZAIRAI B3A	砥用在米 B 3 A	KUMAMOTO
775	00033243	TOMOCHI ZAIRAI B3B	砥用在米 B 3 B	KUMAMOTO
776	00033244	TOUYOU ZAIRAI B3A	東陽在米 B 3 A	KUMAMOTO
777	00033245	TOUYOU ZAIRAI B3B	東陽在米 B 3 B	KUMAMOTO
778	00033246	TOUYOU ZAIRAI B3C	東陽在米 B 3 C	KUMAMOTO
779	00032632	UDA ZAIRAI	宇田在米	NAHA
780	00031136	UDAIZAKI ZAIRAISHU	右大崎在米	MIYAGI
781	00032225	UEKI ZAIRAI B3	植木在米 B 3	KUMAMOTO
782	00032591	USUDA ZAIRAI	白田在米	NAGANO
783	00032524	USUDA ZAIRAI(1)	白田在米(1)	NAGANO
784	00032525	USUDA ZAIRAI(2)	白田在米(2)	NAGANO
785	00032526	USUDA ZAIRAI(3)	白田在米(3)	NAGANO
786	00032497	USUDA ZAIRAI(4)	白田在米(4)	NAGANO
787	00034654	W L 72-1419		USA
788	00032527	YACHIHO ZAIRAI(AO MAME)	八千穂在米(青)	NAGANO
789	00031904	YAMATO ZAIRAI	大和在米	NAGANO
790	00032398	YONEZAWA ZAIRAI	米沢在米	YAMAGATA
791	00032089	YORIIMACHI ZAIRAI(1)	寄居町在米(1)	IBARAKI
792	00032724	ZAIRAI 51-1-1 G.m	在米 51-1-1	AICHI
793	00032733	ZAIRAI 51-1-2(MURASAKIBANA)	在米 1-1-2(紫花)	AICHI
794	00032712	ZAIRAI 51-1A	在米 51-1A	AICHI
795	00033149	ZAIRAI KURO DAIZU	在米 黒豆	KUMAMOTO ASIA(UNKNOWN)
796	00032043	ZAIRAI MISONIMAME	在米 味噌豆	NAGANO
797	00031814	ZAIRAISHU AKI DAIZU	在米 秋大豆	OKAYAMA ASIA(UNKNOWN)
798	00033228	ARAO ZAIRAI B3	荒尾在米 B 3	KUMAMOTO
799	00032693	ASABA ZAIRAI	浅羽在米	SHIZUOKA
800	00058912	CHASHOURYU	茶小粒	HOKKAIDOU
801	00032487	CHINO ZAIRAI(1)	茅野在米(1)	NAGANO
802	00032488	CHINO ZAIRAI(2)	茅野在米(2)	NAGANO

803	00032483	CHINO ZAIRAI(3)	茅野在来(3)	NAGANO
804	00032494	CHINO ZAIRAI(4) G.m	茅野在来(4)	NAGANO
805		KM 001 F14 SEEDS FROM (SELF) F13 PLATS		
806		KM 002		
807		KM 004		
808		KM 005		
809		KM 006		
810		KM 007		
811		KM 009		
812		KM 010		
813		KM 011		
814		KM 012		
815		KM 014		
816		KM 015		
817		KM 016		
818		KM 018		
819		KM 019		
820		KM 020		
821		KM 021		
822		KM 022		
823		KM 023		
824		KM 025		
825		KM 026		
826		KM 030		
827		KM 031		
828		KM 032		
829		KM 033		
830		KM 034		
831		KM 036		
832		KM 037		
833		KM 038		
834		KM 039		
835		KM 040		
836		KM 041		
837		KM 042		
838		KM 045		
839		KM 046		
840		KM 047		
841		KM 048		
842		KM 049		
843		KM 050		
844		KM 051		
845		KM 054		
846		KM 056		
847		KM 057		
848		KM 058		
849		KM 060		
850		KM 062		
851		KM 063		
852		KM 064		
853		KM 066		
854		KM 067		
855		KM 068		
856		KM 069		
857		KM 075		
858		KM 079		
859		KM 080		
860		KM 081		
861		KM 082		
862		KM 083		
863		KM 085		
864		KM 086		
865		KM 088		
866		KM 089		
867		KM 092		
868		KM 093		
869		KM 094		
870		KM 096		
871		KM 097		
872		KM 098		
873		KM 099		
874		KM 100		
875		KM 101		

876	KM 102								
877	KM 103								
878	KM 104								
879	KM 105								
880	KM 106								
881	KM 107								
882	KM 108								
883	KM 109								
884	KM 110								
885	KM 111								
886	KM 112								
887	KM 114								
888	KM 115								
889	KM 116								
890	KM 117								
891	KM 118								
892	KM 120								
893	KM 121								
894	KM 122								
895	KM 123								
896	KM 124								
897	KM 125								
898	KM 126								
899	KM 127								
900	KM 128								
901	KM 129								
902	KM 130								
903	KM 132								
904	KM 133								
905	KM 134								
906	KM 135								
907	KM 136								
908	KM 137								
909	KM 138								
910	FAYETTE 1ST FROM OCTOBER 10'95), 2ND FROM DR. KOMATSTA NOV. 16 2001								
911	KEBURI								
912	MASSHOUKUTOU 502								
913	NIPPONBARE								
914	경상 002 T56								
915	경상 004 T145								
916	경상 006 T176								
917	경상 007 T280								
918	경상 009								
919	경상 010 HAYSOY								
920	경상 001 T54								
921	경상 008 T310								
922	경상 005 T171								
923	경상 019								
924	경상 020 IT191204								
925	경상 021 GMO RR12								
926	경상 022 GMO RR9								
927	경상 023 GMO RR4								
928	경상 003 T136								
929	경상 013								
930	경상 012 부채콩								
931	경상 018 SOJA(S-65)								
932	경상 014								
933	경상 015(약콩)								
934	경상 016 m120								
935	경상 017								
936	경상 018 IT182305								
937	KM 008								
938	KM 013								
939	KM 017								
940	KM 029								
941	KM 035								
942	KM 043								
943	KM 055								
944	KM 059								
945	KM 061								
946	KM 070								
947	KM 071								
948	KM 072								

1022	원 608-6								
1023	원 608-8								
1024	원 608-12								
1025	원 608-17								
1026	원 609-4								
1027	원 609-6								
1028	원 610-7								
1029	원 610-8								
1030	원 612-2								
1031	원 612-5								
1032	원 612-7								
1033	원 612-8								
1034	원 612-11								
1035	원 612-12								
1036	원 612-17								
1037	원 612-18								
1038	원 613-5								
1039	원 613-6								
1040	원 613-7								
1041	원 613-11								
1042	원 614-6								
1043	원 614-7								
1044	원 614-9								
1045	원 615-2								
1046	원 615-4								
1047	원 621-5								
1048	원 681-30								
1049	원 683-6								
1050	원 683-7								
1051	원 683-8								
1052	원 683-9								
1053	원 683-10								
1054	원 683-11								
1055	원 683-13								
1056	원 684-3								
1057	원 684-6								
1058	경상020		활업	꽃	공				
1059	경상021		태광	공					
1060	경상022		대원	공					
1061	경상023		황금	공					
1062	경상024		백운	공					
1063	경상025		만리	공					
1064	경상026		소원	공					
1065	경상027		검정	공	1호				
1066	경상028		진품	공					
1067	경상029		다원	공					
1068	경상030		장원	공					
1069	경상031		진품	공	2호				
1070	경상032		석량	꽃	공				
1071	경상033		신평	달	2호				
1072	경상034		소명	공					
1073	경상035		진을	공					
1074	경상036		무한	공					
1075	경상037		장수	공					
1076	경상038		선혹	공					
1077	경상039		검정	공	2호				
1078	경상040		푸른	공					
1079	경상041		장업	공					
1080	경상042		단백	공					
1081	경상043		보광	공					
1082	경상044		소담	공					
1083	경상045		광안	공					
1084	경상046		명주	니	물	공			
1085	경상047		신록	공					

제 7 장 참고문헌

- Allavena A (1984) Beans(*Phaseolus*). In Section III Legumes. Sharp, W.R Evans, D.A., Ammirato, P.V., Yamada, Y., Macmillan Publ. Co. NY. pp 137-168
- Amitha K and Reddy TP (1996) Regeneration of plantlets from different explants and callus cultures of cowpea(*Vigna unguiculata* L.). *Phytomorphology* 46: 207-211
- Ana MV , Jesus B (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryonic tissues of *Camellia japonica* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* 21: 267-274
- Arya ID, Chandra N (1989) Organogenesis in anther-derived callus culture of cowpea(*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *Curr Sci* 58: 257-259
- Ashis TR, Deepesh ND (1990) Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of *Calotropis gigantea* (Linn.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 20: 229-233
- Bajaj YPS (1984) Peanut. In Handbook of Plant Cell Culture. Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R., Yamada, Y., Macmillan Publ. Co. NY. pp 193-225
- Burger DW, Liu L, Zary KW, Lee CI (1990) Organogenesis and plant regeneration from immature embryos of *Rosa Hybrid* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* 21: 147-152
- Bauer N, Levanic DL, Mihaljevic S, Jelaska S (2002) Genetic transformation of *Coleus blumei* Benth. using *Agrobacterium*. *Food Technol Biotechnol* 40 : 163-169.
- Buchheim JA, Colburn SM, Ranch JP (1989) Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol* 89 : 768-775
- Chandra IF, Tony NT, Robert AG (1991) Plant regeneration from seedling explants of green bean(*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 24: 199-206
- Cheah KT, Cheng TY(1987) Histological analysis of adventitious bud formation in cultured Douglas fir cotyledon. *Amer J Bot* 65: 845-849
- Cheng TY (1975) Adventitious bud formation in culture of Douglas-fir *Pseudotsuga menziesii* (MIRB)FRANCO. *Plant Sci Lett* 5: 97-102
- Cheng TY (1977) Factors affecting adventitious bud formation of cotyledon culture of Douglas-fir . *Plant Sci Lett* 9: 179-187
- Cho DY, Choi PS, Soh WY, Ladeinde TAO (1991) Effects of cytokinin on

- rhizogenesis in callus cultures of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. 91 World Congress on Cell and Tissue Culture, Anaheim, USA(abstract)
- Cahoon EB, Marillia EF, Stecca KL, Hall SE, Taylor DC, Kinney AJ (2000) Production of fatty acid components of meadowfoam oil in somatic embryos. *Plant Physiol* 124: 243-251.
- Choi PS, Komatsuda T, Kim MH, Choi KM, Choi DW, Liu JR (2002) Screening of soybean recombinant inbred lines for high competence somatic embryogenesis. *Korean J. Plant Biotech* 29 : 135-138.
- Choi PS, Soh WY, Cho DY, Liu JR (1994) Somatic embryogenesis in immature zygotic embryo cultures of Korean soybean (*Glycine max* L.) cultivars and effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on somatic embryo morphology. *Korean J Plant Tiss Cult* 21 : 7-13
- Christianson ML, Warnick DA, Carlson PS (1983) A morphogenetically competent soybean suspension culture. *Science* 22 : 632-634
- Clemente TE, LaVallee BJ, Howe AR, Conner-Ward D, Rozman RJ, Hunter PE, Broyles DL, Kasten DS, Hinchee MA (2000) Progeny analysis of glyphosate-selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. *Crop Sci* 40: 797-803.
- Di R, Purcell V, Collins GB, Ghabrial SA (1996) Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. *Plant Cell Rep* 15: 746-750.
- Falco SC, Guida T, Locke M, Mauvais J, Sanders C, Eard RT, Webber P (1995) Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Bio/Technology* 13: 577-582
- Foroughi-Wehr B, Frriedt W (1981) Responsiveness to anther culture of *Hordeum vulgare* cv. "Dissa" and its parents. *Barley Genet Newsl* 11 : 50-53
- Finer JJ, Nagasawa A (1988) Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill). *Plant Cell Tissue Org Cult* 15 : 125-136
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp cell Res* 50 : 151-158
- Green CE (1982) Somatic embryogenesis and plant regeneration from the friable callus of *Zea mays*. *Plant Tissue Culture 1982* (ed., Fujiwara A). 107-108. Maruzen, Tokyo.

- Gantotti BV, Kartha KK (1986) Pea. In Handbook of Plant Cell Culture. Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V., Macmillan Publ. Co. N.Y. pp 370- 418
- Goodwin BC, Pateromichelakis S (1979) The role of electrical field ions and cortex in the morphogenesis of *Acetabularia*. *Planta* 145: 427-435
- Hadi MZ, McMullen MD, Finer JJ (1996) Transformation of 12 different plasmids into soybean *via* particle bombardment. *Plant Cell Rep* 15: 500-505.
- Hazel CB, Klein TM, Anis M, Wilde HD, Parrott WA (1998) Growth characteristic and transformability of soybean embryogenic cultures. *Plant Cell Rep* 17: 765-772.
- Hinchee MAW, Connor-Ward DV, Newell CA, McDonnell RE, Sato SJ, Gasser CS, Fischhoff DA, Re DB, Fraley RT, Horsch RB (1988) Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Bio/Technol* 6: 915-922.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907.
- Kamiya M, Yamanaka H, Oono K (1988) Intervarietal variations in somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* L.). , Natl. Inst. Agrobiol. Resources (Japan) Ann. Rep. No. . 127-161
- Komatsuda T, Ohyama K (1988) Genotype of high competence for somatic embryogenesis and plant *Glycine max* tissue culture. *Theor Appl Genet* 75 : 695-700
- Komatsuda T, Kaneko K, Oka S (1991) Genotype x sucrose interactions for embryogenesis in soybean. *Crop Sci* 31 : 333-337
- Komatsuda T 1992 Research on somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean, Natl. Inst. Agrobiol. Resources (Japan) Ann. Rep. No. 7. 1-78
- Komatsuda T (1995) Somatic embryogenesis in soybean (*Glycine* species). In Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II, Bajaj, Y.P.S (ed.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 239-255
- Lazzeri PA, Hildebrand DF, Collins GB (1985) A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean. *Plant Mol Biol Rep* 3 : 160-167
- Lee SH, Shon YG, Lee SI, Kim CY, Koo JC, Lim CO, Choi YJ, Han CD, Chung CH, Choe ZR, Cho MJ (1999) Cultivar variability in the

Agrobacterium-rice cell interaction and plant regeneration. *Physiologia Plantarum* 107: 338-340.

- Ladeinde TAO, Soh WY (1991) Effect of different growth regulators on organogenesis and total fresh weight gain in cultured leaf tissue of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Phytomorphology* 41: 199-207
- Lee-Stadelmann OY, Lee SY, Hackett WP, Read PE (1989) The formation of adventitious buds *in vitro* on micro-cross sections of hybrid populus leaf midveins. *Plant Sci* 61: 263-427
- Liu W, Moore PJ, Collins GB (1992) Somatic embryogenesis in soybean via somatic embryo cycling propagation. *In vitro Cell Dev Biol* 28 : 153-160
- Luhrs R, Lorz H (1987) Plant regeneration *in vitro* from embryogenic cultures of spring-and winter-type barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. *Theor Appl Genet* 75 : 16-25
- McCabe DE, Swain WF, Martinell BJ, Christou P (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technol* 6: 923-926.