

## 국내 콩(*Glycine max*) 품종 형질전환 초기조건 확립

이기정<sup>†</sup> · 서진경<sup>†</sup> · 이혜영 · 전은희 · 신상현 · 이재현 · 김도훈 · 고종민<sup>1</sup> · 한원영<sup>1</sup> · 백인열<sup>1</sup> · 오병준<sup>2</sup> · 정영수\*

동아대학교 생명자원과학대학 유전공학과, <sup>1</sup>영남농업연구소 전특작과 두류육종연구실, <sup>2</sup>전남생물산업연구센터

Received January 9, 2006 / Accepted March 29, 2006

**Optimization of Genetic Transformation Conditions for Korean Soybean Cultivars.** Ki-Jung Lee<sup>†</sup>, Jen-Kyung Seo<sup>†</sup>, Hye-young Lee, Eun-Hee Jeon, Sang-Hyun Shin, Jai-Heon Lee, Doh-Hoon Kim, Jong-Min Ko<sup>1</sup>, Won Young Hahn<sup>1</sup>, In-Youl Baek<sup>1</sup>, Boung-Jun Oh<sup>2</sup> and Young-Soo Chung\*. Dept. of Genetic Engineering, Dong-A University, Busan, 604-714, Korea, <sup>1</sup>Yeongnam Agricultural Research Institute, NICS, RDA, Milyang, 627-803, Korea, <sup>2</sup>Jeonnam Biotechnology Research Center, Gwangju 501-180, Korea – In order to establish highly efficient gene transfer condition at early stage of soybean transformation, various experiments were performed and compared their efficiencies by transient GUS analysis; those conditions are genotype determination of Korean soybean cultivars for amenability to *Agro*-infection, appropriate agar and selective agent concentration, orientation of explant placement, hormone pre-culture, and liquid selection condition. In the genotype screen of Korean soybean varieties, 14 amenable genotypes were selected. For efficient *Agrobacterium* washing, cefotaxime was chosen and hygromycin at the concentration of 10 and 15 ppm was used as selection agent in the media. Agar concentration was slightly better in 0.6% and 0.8% for both shoot and callus formation, and explant placement with adaxial side down showed high frequency of GUS expression. For wounding treatment, oriental needle was efficient than scalpel for shoot formation and gene transfer. To increase the frequency of gene transfer, hormone pre-treatment was applied. BA at the concentration of 5 and 10 ppm resulted in better survival at the late stage of selection in shoot elongation media. Selection in liquid media after hormone pre-treatment seemed to be effective to remove the escaped non-transformants at early stage of procedure. Considering the results obtained, Eunhakong could be the first choice as a material for soybean transformation among Korean soybean genotypes.

**Key words** – Gene transformation, soybean, GUS, *Agrobacterium*

콩(*Glycine max*, 2n=40)은 장미목 콩과의 한해살이 쌍떡잎 식물로 만주와 한반도가 원산지이며 세계 각지에서 재배되는 경제적으로 중요한 식용작물이다. 콩은 생육기간이 비교적 짧아 만파가 가능하며 공중질소의 고정능력과 토양미생물의 증가를 가능케 함으로써 토양의 이화학적 성질을 개선시켜 지력을 증대시킨다. 쌀을 주식으로 하는 동양인에게 경제적인 단백질원인 동시에 여러 가지 생리적 기능성 물질이 풍부하게 들어 있어서 세계의 작물로 주목받고 있다.

콩 형질전환은 약 15년 전 처음 보고 된 이래, 다양한 방법이 보고되었다[3,4,8]. Shoot 분열조직에 microprojectile bombardment를 사용하기도 하였고[4] embryogenic suspension culture[2], 미성숙한 cotyledon에 *Agrobacterium tumefaciens*를 통해 T-DNA를 전이시키는 실험[8,11]이 실시되었다. 또한 *vir* gene의 유도인자의 첨가로 *Agrobacterium*의 감염력을 증가시키거나[1], 초음파로 explant의 상처를 증가시키는 등 형질전환 효율을 높이기 위한 다양한 노력이 기울여져 왔다[10]. 그러나 이러한 노력에도 불구하고 콩 형질전

환은 여전히 저효율과 성공이 보고된 품종 또한 극소수로 제한되어 왔다. 이러한 저효율을 극복하기 위하여 최근에는 L-cysteine과 같은 황화합물을 공배양 배지에 첨가하여 식물의 저항성 거부반응을 낮추고 T-DNA 전이를 향상시키는 새로운 방법이 모색되기도 하였다[5-7]. 현재 전 세계적으로 이미 생산되어 판매되고 있는 형질전환 콩 품종들의 경우는 거의가 미성숙 배아를 이용하여 체세포 배를 만든 후, 유전자총을 이용하여 형질전환을 한 것이고 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환으로 생산한 콩 품종은 아직 보고되지 않았으나, 이 방법의 높은 효율성과 잠재성 때문에 많은 연구 논문이 발표되고 있다[5-7].

이 실험에서는 국내 콩 품종을 재료로 형질전환 방법을 확립하기 위하여 일품 검정콩을 포함한 32개의 한국 콩 품종을 가지고 형질전환 실험을 수행하였다. 형질전환 방법은 콩 형질전환에 관한 성공적인 논문을 발표한 미국대학 현지방문을 통하여 최근에 개발되어 확립된 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법을 기초하여 수행하였으며 국내 콩 품종에 보다 적합한 방법을 찾기 위하여 호르몬 전처리와 액체배지 선발 등 다양한 조건 확립실험을 수행하였다.

\*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7510, Fax : +82-51-200-6536

E-mail : chungys@dau.ac.kr

<sup>†</sup> Both authors contributed equally

## 재료 및 방법

### 식물재료

국내 콩 품종 형질전환 genotype 스크린을 위한 식물재료로 검정콩 1호, 검정콩 2호, 진품종, 무한콩, 소담콩, 진품종 2호, 선흑콩, 푸른콩, 단백질, 장엽콩, 광안콩, 황금콩, 보광콩, 만리콩, 소명콩, 장수콩, 백운콩, 대황콩, 소백나물콩, 장미콩, 금강콩, 일품검정콩, 은하콩, 일미콩, 새울콩, 큰울콩, 새알콩, 대원콩, 다원콩, 태광콩, 신팔달콩, PI 416937 등 32개의 품종을 사용하였다. Hygromycin 농도가 형질전환체 선발 및 재분화에 미치는 영향에 대한 실험 식물재료로는 소백나물콩, 은하콩, 무한콩, 백운콩의 떡잎을 사용하였으며, agar 농도, 치상방향, 상처방법이 형질전환체 선발효율에 미치는 영향을 알기 위한 실험에서는 소백나물콩과 은하콩이 사용되었다. 호르몬 BA 전처리와 관련한 실험에서는 은하콩이 사용되었다. 종자는 70% 에탄올에 30초간 담궈 1차 표면살균을 하고 1% sodium hypochlorite에 30분간 shaking하면서 소독한 후, 10분 간격으로 멸균수로 3회 수세하였다. 페트리디쉬에 파종 후 24℃ 배양실에서 16시간 광조건과 8시간 암조건으로 5일간 발아시켰다.

### Agrobacterium 준비 및 감염

콩의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 super-vector pTOK233을 가지고 있는 LBA4404를 사용하였다(Fig. 1). *Agrobacterium*은 형질전환 3일 전 hygromycin 50 mg/l가 포함된 고체 YEP 배지(Table 1)에 streaking 한 후, 28℃ 배양기에서 3일간 배양하였다.

공배양 배지로는 100 μM의 acetosyringone이 포함된 AAM 배지를 사용하였다. 형질전환 당일 왕성히 자란 *Agrobacterium*을 50 ml tube에 AAM-액체배지를 30 ml 채운 후 spatula를 이용하여 OD값 0.5 정도의 혼탁액이 되도록 풀어 넣었다. 발아한 식물체의 하배축을 떡잎 밑 약 1 cm되는 곳에서 자른 후 양 떡잎 사이로 scalpel를 넣어 하배축까지 수직으로 자르고 새로 나온 본엽을 제거하였다. 떡잎 기부에서 위로 약 0.5 cm와 아래 하배축쪽으로 약 0.1 cm 이내의 부위를 scalpel과 동양침 두 가지로 나눠 7-12회 반복하여 상처를

내었다. *Agrobacterium*을 희석시킨 AAM 배지에 상처를 낸 떡잎을 20분간 접촉시킨 후 향배측면(flat side)을 배지방향 또는 반대로 하여 치상하여 3일 간 24℃에서 암배양시켰다.

### BA (6-benzylaminopurine) 전처리

호르몬(BA)의 전처리가 형질전환 효율증대에 미치는 영향을 알아보기로 실험을 수행하였다. 전처리를 위한 호르몬은 준비된 AAM배지에 BA 5 mg/l와 10 mg/l의 농도로 첨가하였다(Table 1).

### 액체배지 선발

호르몬 전처리 후 액체 진탕 배양이 형질전환체 선발에 얼마나 효과가 있는지 알아보기로 실험을 수행하였다. 100 μM acetosyringone이 포함된 AAM배지와 AAM+BA 5 mg/l, AAM+BA 10 mg/l의 배지를 준비하여 수행하였다(Table 1).

### 제균 및 치상

3일간 공배양 후 *Agrobacterium*의 제균을 위하여 멸균수로 2회 세척한 후 500 mg/l의 cefotaxime과 0.05%의 Triton X-100이 포함된 멸균수로 5회 세척하였다. 30 ml의 세척 용액을 넣은 50 ml tube에 떡잎을 넣었으며, mini 3D-shaker를 이용하여 매회 20분간 상하로 shaking 하였다. 유전자형 스크린을 위한 실험에서는 5회 세척된 떡잎은 SI (shoot induction; B5 salt 3.16 g/l, BAP 1.67 mg/l, sucrose 3%, Agar 0.8%, cefotaxime 500 mg/l, hygromycin 30 mg/l)-① 배지에 치상하여 24℃ 배양실에서 신초발생을 관찰하였다. 계균항생제 선발실험에서는 같은 조건의 SI배지를 사용하였고, 계균항생제의 농도만 다른 2가지의 배지(cefotaxime 500 mg/l 또는 timentin 200 mg/l)를 사용하였다. 치상방향별 형질전환 효율을 알아보기 위한 실험에서는 향배측면(flat side)을 윗방향(up)과 아랫방향(down)으로 나눠 치상하였다. 그 후 2주 간격으로 SI-②(cefotaxime 200 mg/l, hygromycin 10 mg/l), SI-③(cefotaxime 100 mg/l, hygromycin 10 mg/l)로 옮겨 치상하면서 관찰하였다. Hygromycin 농도가 형질전환 효율에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험에서는 SI 배지에 각각 hygromycin 농도를 10, 15, 30 mg/l씩 달리 첨가

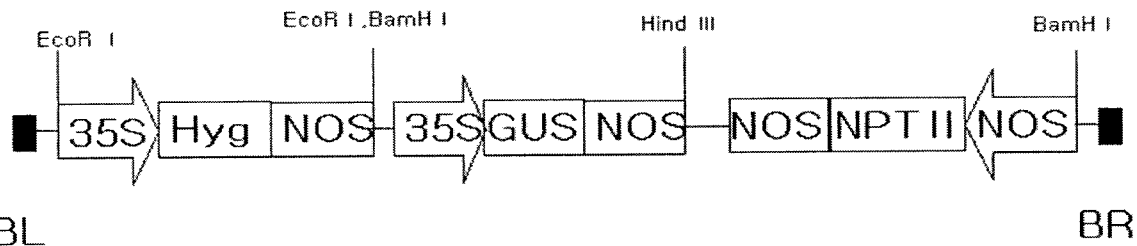


Fig. 1. Structure of expression vector (pTOK233/LBA4404) used for optimization of soybean transformation. BL : left border, BR : right border, Hyg : hygromycin phosphotransferase, NPT II : neomycin phosphotransferase, 35S : CaMV 35S promoter, GUS : β-glucuronidase., NOS : terminator of nopaline synthase

Table 1. List of media and their components used for soybean transformation

	Composition	
YEP	Peptone 10 g/l, Yeast Extract 10 g/l, NaCl 5 g/l Solid: Plant agar 0.8%, pH= 7.0 Hygromycin 50 mg/l, Rifampicin 25 mg/l	
CCM (co-cultivation medium)	AAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stock I 100 ml (MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 250 mg, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 150 mg, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 150 mg, KCl 3000 mg)</li> <li>• Stock II 10 ml (Fe-EDTA 40 mg, MnSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O 10 mg, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2 mg, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.025 mg, KI 0.75 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 3 mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.25 mg)</li> <li>• Stock III 10 ml (myo-inositol 100 mg, nicotinic acid 1 mg, pyridoxine 1 mg, thiamine HCl 10 mg) casamino acid 0.5 g/l glycine 0.0075 g/l, L-arginine 0.1967 g/l, L-glutamine 0.9 g/l, L-asparatic acid 0.3 g/l, sucrose 68.5 g/l, glucose 0.036 g/l, MS vitamins 4.4 g/l, 100 μM acetosyringone solid: plant agar 0.5%, pH= 5.2</li> </ul>
	hormone pre-culture	BA (6-benzylaminopurine) 5, 10 ppm
SIM (shoot induction medium)	B5 salt 3.16 g/l, BAP 1.67 mg/l, sucrose 3%, Agar 0.8%, SI-①(cefotaxime 500 mg/l, hygromycin 10 mg/l) SI-②(cefotaxime 300 mg/l, hygromycin 10mg/l, SI-③(cefotaxime 300 mg/l, hygromycine 10 mg/ ℓ), pH= 5.6	
	hygromycin concentration	hygromycin 10 mg/l, 15 mg/l, 30 mg/l
	agar concentration	agar 0.4, 0.6, 0.8%
	liquid selection	SI-① (cefotaxime 100 mg/l, hygromycin 10 mg/l) SI-② (cefotaxime 100 mg/l, hygromycin 10 mg/l)
SEM (shoot elongation medium)	MS B5 vitamins 4.4 g/l, MES 3.3 mM, sucrose 3%, IAA 0.1 mg/l, zeatin 1 mg/l, GA <sub>3</sub> 0.5 mg/l, glutamine 50 mg/l, asparagine 50 mg/l, Sigma agar 0.8%, pH= 5.6 cefotaxime 30 mg/l, hygromycin 10, 15 mg/l	

하였다. 액체배지 선발효과를 알아보고자 한 실험에서는 수세 후 떡잎을 SI-① 액체배지에 10개씩 나누어 치상한 후 24℃ 배양실에서 110 rpm으로 18시간 광조건과 8시간 암조건으로 생육시켰다. 액체선발배지인 Shoot induction 배지는 SI-① (cefotaxime 100 mg/l, hygromycin 10 mg/l), SI-② (cefotaxime 100 mg/l, hygromycin 10 mg/l)의 두 종류 배지를 사용하였는데, 액체 SI 배지는 100 ml 삼각플라스크에 20 ml씩 나누어 분주하여 사용하였다. 수세 2주 후 SI-②배지로 이식하고 신초는 SE (Shoot Elongation)배지로 이식하거나 GUS 분석하였다. 호르몬전처리 실험의 생존율은 SE배지로 치상 후, 약 4주 후에 살아남은 신초의 수를 확인하여 계산하였다.

**GUS expression assay**

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson (1987)의 방법을 사용하였다. 1 ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3 mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronide (X-Gluc)을 150 μl dimethyl formamide에 녹인 후, 850 μl의 solution B (1% Triton

X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5 mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. SI 배지 치상 후 0.5 cm 크기로 자란 신초 및 캘러스는 절단하여 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37℃ 배양기에서 overnight 처리하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5 ml, 10% formaldehyde 5 ml, 5% glacial acetic acid 2.5 ml)을 첨가하여 4℃에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

**결과 및 고찰**

**국내 콩 품종 형질전환 순응형 genotype 스크린**

형질전환 순응형 콩 유전자형 스크린을 위해 실험에 이용된 국내 콩 품종 31개와 현재 국내의 콩 육종 프로그램에서 많이 사용되고 있는 미국산 품종 1개를 가지고 실험을 수행하였다. 이들 32개의 콩 품종에 대한 발아율과 신초형성율, 그리고 GUS 분석에 의한 초기형질전환효율을 측정하였다 (Table 2). 발아율은 품종 간에 차이를 보였고 일부품종에서는 50% 미만의 낮은 발아율을, 특히 장엽콩에서는 0%의 발아율을 나타내었다. 반면에 은하콩, 소백나물콩, 새알콩, 대원

Table 2. Genotype screen of Korean soybean cultivars for germination rate, shoot formation, and amenability to *Agrobacterium* infection by GUS analysis

No	Cultivar	Germination rate (%)	Shoot formation (%)	Gus positive (%)
1	검정콩 1호	64	9	5
2	검정콩 2호	85	10	1
3	진 품 종	53	0	0
4	무 한 콩	88	12	5
5	소 담 콩	76	1	6
6	진품종 2호	40	4	4
7	선 흑 콩	13	0	3
8	푸 른 콩	86	0	0
9	단 백 콩	94	1	3
10	장 엽 콩	0	0	0
11	광 안 콩	100	2	0
12	황 금 콩	90	0	0
13	보 광 콩	60	6	6
14	만 리 콩	82	10	4
15	소 명 콩	93	1	5
16	장 수 콩	68	3	3
17	백 운 콩	79	5	1
18	대 황 콩	50	7	0
19	소백나물콩	98	6	5
20	장 미 콩	82	1	1
21	금 강 콩	79	1	1
22	일품검정콩	66	18	10
23	은 하 콩	98	19	8
24	일 미 콩	73	9	5
25	새 울 콩	91	5	5
26	큰 울 콩	63	8	3
27	새 알 콩	97	0	0
28	대 원 콩	96	23	9
29	다 원 콩	75	5	1
30	태 광 콩	97	16	2
31	신 팔 달 콩	92	5	1
32	PI 416937	100	2	0

콩, 태광콩 등은 발아율이 90% 이상으로 양호하였다. 발아 시에 종자의 무른 정도와 쪼개짐을 관찰하였고, 이와 같은 특성을 나타내는 품종은 형질전환조건확립 실험을 위한 재료선택에서 배제되었다. 신초형성은 콩형질전환의 초기 과정 중, 매우 중요한 요인으로 현재 사용되고 있는 cotyledonary node를 이용한 콩형질전환 방법의 효율을 결정한다[5,6]. 신초형성에 대한 조사에 있어서는 일품검정콩(18%), 은하콩(19%), 대원콩(23%), 태광콩(16%) 등이 비교적 높게 나타났고, 나머지는 10% 미만의 낮은 신초형성율을 보였다. 특히 외국품종으로 사용된 PI416937의 경우, 2%의 매우 낮은 신초형성율을 나타내었다. 은하콩, 대원콩, 그리고 태광콩은 발아율과 신초형성율 모두에서 상대적으로 높은 빈도를 나타내어 형질전환 초기조건 확립실험의 재료로써 높은 가능성을 보였다. 신

초유도배지(Shoot Induction media)에서 유도된 신초는 형질전환 약 2주 후에 적정크기로 자란 개체들에 대해 GUS 분석을 통하여 초기 transient 형질전환빈도를 측정하였다 (Table 2; Fig. 2). GUS 분석 결과 일품검정콩이 10%로 가장 높게 나타났으며, 대원콩과 은하콩이 각각 9%와 8%로 뒤를 따랐다. 형질전환빈도는 낮았지만 장미콩과 백운콩에서는 강한 GUS 발현을 보였다(data not shown).

**선발 항생제 hygromycin 농도가 초기 형질전환 과정에 미치는 영향**

국내 콩 품종 스크린 결과, 종자의 발아율, 신초형성율, GUS 발현빈도, 그리고 종자의 오염도를 고려하여 4개의 품종(소백나물콩, 은하콩, 무한콩, 백운콩)을 선택하여 선발항생제의 조건확립을 위한 실험을 수행하였다. 먼저 형질전환 후, 아그로박테리아를 제공하기 위한 두 가지의 제균제 cefotaxime 과 timentin의 제균 효능 검정하였다[5,6,7]. 제균 항생제 cefotaxime과 timentin이 각각 첨가된 SI 배지 비교 실험에서는 품종 간 차이 없이 timentin 첨가배지(200 ppm)에서 백화현상을 보였으며, cefotaxime (500 ppm)이 첨가된 배지에서는 별다른 해가 나타나지 않았다(data not shown). Timentin이 첨가된 배지에서 신초의 발생율(0~7%)이 현저히 낮았으며, cefotaxime이 첨가된 배지에서의 신초 발생율(6~18%)은 상대적으로 높았다. 이 실험의 결과로 향후 모든 아그로박테리아의 제균을 위하여 cefotaxime을 제균제로 사용하였다.

형질전환 후 효율적인 선발조건 확립을 위하여 적정 선발항생제 농도를 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 세 종류의 hygromycin 농도(30, 15, 10 ppm)의 비교 실험을 수행하였다. 30 ppm의 농도에서는 무한콩에서만 신초 발생이 관찰되었고 15 ppm과 10 ppm 두 농도에서는 백운콩을 제외하고는

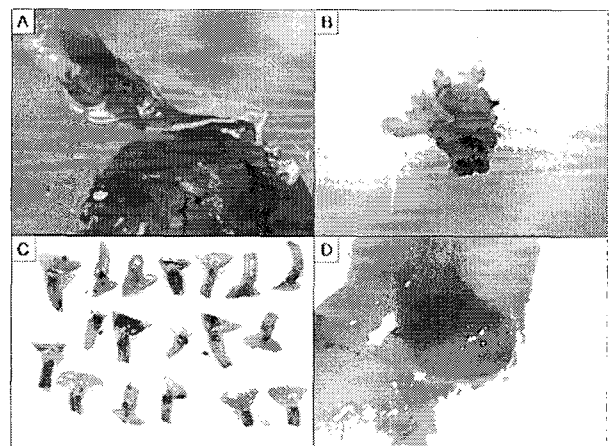


Fig. 2. (A-B) Shoot formation after *Agrobacterium*-mediated transformation. (C-D) Transient GUS expression of Korean soybean cultivars transformed with pTOK233/LBA4404

전반적으로 비슷한 비율로 신초형성을 보였다(Table 3). 신초형성과 함께 조사한 캘러스 발생율은 저농도의 hygromycin에서 전반적으로 높았다. 캘러스의 유기는 형질전환 과정 중 상처부위를 중심으로 불규칙적으로 자연 발생 하였으며 재분화 배지로 치상된 후에도 신초의 형성은 보이지 않아 형질전환과정 중에 캘러스의 유기는 부정적인 요인으로 작용할 가능성을 나타내었다. 항생제 선발농도 실험의 결과, 초기 신

Table 3. Optimization of hygromycin selection concentration for shoot and callus formation of 4 Korean soybeans with washing reagent "cefotaxime"

Cultivar	Cefotaxime				
	Shoot (%)		Callus (%)		
	Shoot form.	GUS positive	Callus form.	GUS positive	
Sobaek namul	hygro. 30	0/199 (0%)	0/199 (0%)	0/199 (0%)	0/199 (0%)
	hygro. 15	5/205 (2%)	4/205 (2%)	3/205 (1%)	2/205 (1%)
	hygro. 10	5/247 (2%)	5/247 (2%)	10/247 (4%)	10/247 (4%)
Eunha	hygro. 30	0/146 (0%)	0/146 (0%)	1/146 (1%)	0/146 (0%)
	hygro. 15	1/137 (1%)	1/137 (1%)	9/137 (7%)	8/137 (6%)
	hygro. 10	3/124 (2%)	3/124 (2%)	16/124 (13%)	14/124 (11%)
Muhan	hygro. 30	3/58 (5%)	3/58 (5%)	1/58 (2%)	1/58 (2%)
	hygro. 15	4/68 (6%)	3/68 (4%)	0/68 (0%)	0/68 (0%)
	hygro. 10	3/71 (4%)	2/71 (3%)	13/71 (18%)	7/71 (10%)
Baek wun	hygro. 30	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)
	hygro. 15	1/25 (4%)	1/25 (4%)	0/25 (0%)	0/25 (0%)
	hygro. 10	0/25 (0%)	0/25 (0%)	1/25 (4%)	1/25 (4%)

Table 4. Frequency of shoot and callus formation of sobaeknamulkong and eunhakong in the media with different agar concentration

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

초형성 과정 중, 적정 hygromycin농도는 높은 빈도의 신초형성에 매우 중요한 요인으로 생각된다. 현재 외국의 사례에서 보고되어지는 콩 형질전환의 경우, 체세포 배를 이용하여 유전자총으로 형질전환 경우에는 hygromycin을 선발항생제로 사용하나, 아그로박테리아를 이용하여 cotyledonary node에 형질전환을 한 경우, 대부분 phosphinothricin (PPT)를 선발에 쓰고 있다[11,12]. 그러나 선발효율에서 hygromycin이 명확한 선발 효과를 보이는 반면 PPT를 이용한 선발은 종종 선발 중에 비형질전환체의 escape를 만드는 것으로 알려져 있다[5]. 따라서 좀 더 많은 콩 유전자형에 대한 폭넓은 hygromycin 선발효용성을 조사할 필요가 있고 다양한 농도에 대한 검사도 필요하다고 생각된다.

**Agar 농도, 치상방향, 상처방법이 형질전환체 선발효율에 미치는 영향**

두 품종, 소백나물콩과 은하콩을 재료로 하여 각기 다른 세 농도의 agar 배지에 따른 신초 및 캘러스 발생은 0.4% 보다는 0.6%와 0.8% 농도의 agar 배지에서 높았다(Table 4). 신초와 캘러스의 발생은 두 품종 모두 0.8% 농도의 agar 배지가 가장 효율적이었다. 형질전환 후, 떡잎의 치상방향은 향측면(flat side)을 위방향(up)과 아랫방향(down)으로 나누어 SI 배지에 치상한 경우 향측면을 배지에 묻히도록 아랫방향으로 치상했을 때가 위로 향했을 때보다 두 품종 모두에서 신초형성과 캘러스 생성에 효율적이었다(Table 5). 이는 떡잎을 아랫방향을 향하여 치상하였을 때 캘러스와 신초발생부위가 배지와 접촉이 좋아져 배지의 영양공급이 원활하게 이루어진 결과로 생각된다. 또한 상처방법이 형질전환효율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시한 두 개의 다른 상처도구로 scalpel (#11 blade)과 가장 가는 동양침(직경 300 마이크로)의 비교 실험에서, 신초 발생에서는 침을 사용한 경우가 좋았고, 캘러스 발생에서는 scalpel을 사용한 경우가 약간 높았다(Table 6). 이 결과에 대한 정확한 이유는 확실히 알 수 없으나, 두 상처방법의 차이가 목표부위에 대한 수직적 방향 과 수평적 방향의 상처라는 차이와 상처부위의 크기를 감안할 때 침에 의한 수직적이며 상대적으로 미세한 상처가 목표부위를 덜 파괴시켜 신초 발생의 빈도를 높인 것이 아닌가 생각된다.

Table 5. Frequency of shoot and callus formation by different orientation of placement (adaxial side up or down)

	Sobaeknamul				Eunha			
	up%,		down		up		down	
	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus
0.4%	0/187 (0%)	0/187 (0%)	0/82 (0%)	0/82 (0%)	0/156 (0%)	2/156 (1.3%)	0/83 (0.0%)	2/83 (2.4%)
0.6%	0/356 (0%)	0/356 (0%)	7/252 (2.8)	2/252 (0.7)	0/331 (0%)	0/331 (0.0%)	11/246 (4.5%)	16/246 (6.5%)
0.8%	26/394 (6.6)	0/394 (0%)	14/348 (4%)	5/348 (1.4)	8/277 (2.9%)	0/277 (0.0%)	12/260 (4.6%)	5/260 (1.9%)
Total	26/937 (2.8)	0/937 (0%)	21/682 (3.1%)	7/682 (1.0)	8/764 (1.0%)	2/764 (0.3%)	23/589 (3.9%)	23/586 (3.9%)

Table 6. Frequency of shoot and callus formation by two different wounding treatments

	Sobaeknamul				Eunha			
	scalpel		needle		scalpel		needle	
	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus
0.4%	0/215 (0.0%)	0/215 (0.0%)	0/54 (0.0%)	0/54 (0.0%)	0/177 (0.0%)	4/177 (2.3%)	0/52 (0.0%)	0/52 (0.0%)
0.6%	2/382 (0.5%)	2/382 (0.5%)	5/226 (2.2%)	0/226 (0.0%)	5/398 (1.3%)	9/398 (2.3%)	6/178 (3.4%)	7/178 (3.9%)
0.8%	19/420 (4.5%)	4/420 (0.9%)	21/322 (6.5%)	1/322 (0.3%)	5/348 (1.4%)	5/348 (1.4%)	15/205 (7.3%)	0/205 (0%)
Total	21/1017 (2.1%)	6/1017 (0.6%)	26/602 (4.3%)	1/602 (0.2%)	10/923 (1.1%)	18/923 (2.0%)	21/435 (4.8%)	7/435 (1.6%)

여러 가지 시도된 처리와 조건들이 형질전환에 미치는 영향을 알아보기 위하여 형질전환 후, 약 2주된 초기신초와 캘러스를 가지고 transient GUS 분석을 하였다(Table 7). 은하콩의 경우, scalpel 보다는 침을 사용하여 향배축을 아래로 치상하였을 때, GUS 유전자의 발현율이 높게 나타났으며, 소백나물콩의 경우에 있어서는 0.6%의 agar 농도에서 침을 가지고 향배축을 아래로 치상하였을 때 형질전환 효율이 비교적 높게 나왔으나 전반적으로 낮은 GUS 발현을 나타내었다. 캘러스에서의 GUS 유전자의 발현율은 전반적으로 낮게 나타났으며, 치상방향이 향축면이 아래를 향했을때 그리고 agar 농도가 0.6% 일 때 비교적 다른 처리구보다 높게 나타났다.

**고체선타배지에서 호르몬 BA (6-Benzylaminopurin) 전처리가 형질전환 효율증대에 미치는 영향**

Transient GUS 분석 결과 여러 가지 처리에도 불구하고 전반적으로 낮은 형질전환 효율이 관측되었다. 이러한 낮은 효율을 극복하기 위하여 형질전환과정 중에 호르몬을 처리하여 신초발생을 증대시키기 위한 전처리 실험을 수행하였다. 호르몬 전처리 실험 결과, 호르몬 전처리 후 신초의 발생

율은 처리와 무처리 간에 일정한 경향을 나타내지 않았으며 오히려 무처리에서 높은 신초형성율을 나타냈다(Table 8). GUS 발현율에서도 무처리가 13%가장 높게 나타났으며 BA 1 ppm이 10% 그리고 BA 5 ppm이 8.4%로 각각 나타났다. 그러나 GUS의 발현강도에 있어서 무처리구의 경우, 호르몬 처리에 비해 약하게 나타났고 후에 SE (shoot elongation)배지에서 모두 고사하는 경향을 보였다(data not shown). 위의 결과를 종합하여 볼 때, 선타배지의 신초형성빈도에는 호르몬 전처리가 특별한 영향을 미치지 않으나 유전자의 도입에는 효과를 미쳐 GUS 유전자의 발현과 후기의 생존에 도움이 된 것으로 보인다.

**호르몬 전처리 후 액체배양의 선발효과**

고체배지에서의 BA 전처리가 GUS 발현강도에서는 차이를 보였지만 신초형성과 GUS 발현율에 있어서 무처리에 비해서 차이를 나타내지 않았다. 그러나 후기 SE 배지에서 호르몬 무처리구가 BA 전처리구에 비해 빠르게 고사하는 경향을 나타내 SI 배지에서의 효율적인 선발방법을 모색하기 위하여 액체SI배지를 이용한 초기선타배 실험을 수행하였다

Table 7. Effect of agar concentrations, orientation of placement, wounding method on shoot and callus transformation efficiency

		scalpel								needle							
		up				down				up				down			
		shoot		callus		shoot		callus		shoot		callus		shoot		callus	
		shoot form	GUS positive	callus form	GUS positive	shoot form	GUS positive	callus form	GUS positive	shoot form	GUS positive	callus form	GUS positive	shoot form	GUS positive	callus form	GUS positive
S o b a e k	0.4%	0/170 (0%)	0/170 (0%)	0/170 (0%)	0/170 (0%)	0/55 (0%)	0/55 (0%)	0/55 (0%)	0/55 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)
	0.6%	0/243 (0%)	0/243 (0%)	0/243 (0%)	0/243 (0%)	2/139 (%)	2/139 (1%)	2/139 (1%)	2/139 (1%)	0/113 (0%)	0/113 (0%)	0/113 (0%)	0/113 (0%)	5/113 (4%)	5/113 (4%)	0/113 (0%)	0/113 (0%)
	0.8%	15/228 (6%)	1/228 (0%)	0/228 (0%)	0/228 (0%)	4/182 (2%)	2/182 (1%)	4/182 (2%)	2/182 (1%)	11/156 (7%)	3/156 (2%)	0/156 (0%)	0/156 (0%)	10/166 (6%)	1/166 (1%)	1/166 (1%)	1/166 (1%)
E u n h a	0.4%	0/120 (0%)	0/120 (0%)	2/120 (2%)	2/120 (2%)	0/57 (0%)	0/57 (0%)	2/57 (4%)	2/57 (4%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)
	0.6%	0/242 (0%)	0/242 (0%)	0/242 (0%)	0/242 (0%)	5/156 (3%)	5/156 (3%)	9/156 (6%)	7/156 (4%)	0/89 (0%)	0/89 (0%)	0/89 (0%)	0/89 (0%)	6/89 (7%)	6/89 (0%)	7/89 (8%)	5/89 (6%)
	0.8%	3/174 (2%)	3/174 (2%)	0/174 (0%)	0/174 (0%)	2/158 (1%)	2/158 (1%)	5/158 (3%)	0/158 (0%)	5/103 (5%)	3/103 (3%)	0/103 (0%)	0/103 (0%)	10/102 (10%)	10/102 (10%)	0/102 (0%)	0/102 (0%)

(Table 9). 실험결과 초기의 신초형성에 있어서는 고체 SI 배지실험에서와 마찬가지로 무처리구가 호르몬 처리구보다 높게 나타났으나 형성된 신초당 GUS 발현율에 있어서는 호르몬 처리구가 약 2배 높은 GUS 발현빈도를 나타내었다. 이 결과는 무처리구의 경우, 형성된 신초의 50% 이상이 유전자가 도입되지 않은 비형질전환체(escape)이나, 호르몬 처리구들은 형성된 신초의 약 80%가 유전자가 도입된 개체들임을 나타내고 있다. 형질전환 후의 초기선발과 조직배양에 있어서의 효율증대는 조직배양 중에 가장 큰 문제점인 공간문제와 불필요한 비용을 최소화 할 수 있다는 점에서 매우 중요한 요인이다. 선발초기에 비형질전환체를 조기제거하고 높은 빈도의 유전자 도입개체를 전개해 나갈 수 있다면 stable한 형질전환체를 얻을 수 있는 확률을 매우 높일 수 있을 것이다. SE 배지에서의 생존개체비율을 조사한 결과 호르몬 전처리구의 개체들이 무처리구보다 훨씬 높은 비율로 생존함을 나타내 호르몬 전처리의 효과가 초기의 신초형성과 형질전환율에서는 크게 차이를 보이지 않았지만 조직배양 중에 가해진 선발압력에 생존하는 데 크게 기여했음을 알 수 있었다(Table 10).

요 약

경제적으로 중요한 식용작물인 콩(*Glycine max*)의 초기형질전환 효율증대를 위하여 연구를 수행하였다. 높은 초기형질전환 조건 확립을 위하여 기초실험으로 *Agrobacterium* 감염에 순응적인 국내 콩 품종을 스크린 하였으며, 적정한 agar 농도와 선발항생제 hygromycin 농도 규명, 상처방법,

Table 8. Effect of hormone (BA) pre-culture on shoot formation and GUS expression with solid selection media

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

Table 9. Effect of liquid selection on shoot formation and GUS expression after hormone pre-culture

	Eunha	Cont	BA	
			5 ppm	10 ppm
Shoot	Formation	47/368 (12.8%)	20/350 (5.7%)	19/345 (5.5%)
	GUS positive	21/368 (5.0%)	16/350 (4.6%)	15/345 (4.3%)
GUS positive/Shoot		21/47 (44.0%)	16/20 (80%)	15/19 (78.0%)

Table 10. Effect of hormone pre-culture on survival rate of soybean transformation

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

explant의 치상방향, 호르몬 전처리, 액체배지 선발 등 형질 전환 초기효율에 미치는 영향을 transient GUS 분석을 통하여 알아보았다.

*Agrobacterium* 감염에 순응적인 품종을 선발하기 위하여 32개의 국내 콩 장려품종을 스크린한 결과, 일품검정콩, 은하콩, 만리콩, 대원콩 등 14개의 순응형 품종을 선발하였으며, 효율적인 제균제로는 cefotaxime이, 효율적인 선발항생제로서는 hygromycin이 선택되었다. Hygromycin 농도는 10-15 ppm이 효율적이었고, agar 농도 0.6-0.8%, explant의 치상방향은 향배측(adaxial side)을 down하여 치상하였을 때가 높은 GUS ( $\beta$ -glucuronidase)발현빈도를 나타냈고 상처방법은 scalpel보다 동양침을 사용하였을 때 높게 나타났다. 형질전환 체계확립을 위하여 호르몬 전처리를 한 결과, BA 5 ppm과 10 ppm을 처리하였을 때 후기 선발에서 높은 생존율을 보였고, 전처리 후에 액체배지에서 선발을 하였을 때 비형질전환체(escape)의 빈도를 크게 낮출 수 있었다. 또한 여러 조건의 결과를 비교하여 볼 때, 국내 콩 품종 중에서 형질전환을 위한 재료로써는 은하콩이 가장 적합한 것으로 생각된다.

### 감사의 글

이 연구는 과기부 프론티어 과제(작물유전체기능연구사업단)와 바이오그린 21사업의 지원을 받아 수행되었습니다.

### 참 고 문 헌

- Bolton, G. W., E. W. Nester and M. P. Gordon. 1986. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. *Science* **232**, 983-985.
- Finer, J. J. and M. D. McMullen. 1991. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **27P**, 115-182.
- Hinchee, M. A. W., D. W. Connor-Ward, C. A. Newell, R. E. McDonnell, S. J. Sato, C. S. Gasser, D. A. Fischhoff, D. B. Re, R. T. Fraley and R. B. Horsch. 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Bio/Technology* **6**, 915-922.
- McCabe, D. E., W. F. Swain, B. J. Martinell and P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean(*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* **6**, 923-926.
- Olhoft, P. M., L. E. Fligel, C. M. Donovan and D. A. Somers. 2003. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary node method. *Planta* **216**, 723-735.
- Olhoft, P. M., K. Lin, J. Falbraith and N. C. Nielsen. 2001. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep.* **20**, 731-737.
- Olhoft, P. M. and D. A. Somers. 2001. L-cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep.* **20**, 706-711.
- Parrott, W. A., L. M. Hoffman, D. F. Hildebrand, E. G. Williams and G. B. Collins. 1989. Recovery of primary transformants of soybean. *Plant Cell Rep.* **7**, 615-617.
- Santarem, 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.
- Trick, H. N. and J. J. Finner. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max*(L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Reports* **17**, 482-488.
- Yan, B., M. S. Srinivasa Reddy, G. B. Collins and R. D. Dinkins. 2000. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max*(L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants. *Plant Cell Rep.* **19**, 10.
- 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 and Organ Culture* **56**, 37-46.