

국내콩 형질전환 기술개발

전은희 · 정영수

Development of genetic transformation method of Korean soybean

Eun Hee Jeon · Young-Soo Chung

Received: 30 November 2009 / Accepted: 7 December 2009
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Current status of soybean transformation method in Korea was reviewed with recent publications. Most frequently used method for genetic transformation was *Agrobacterium*-mediated transformation on cotyledonary node which is most popular method used in foreign country. In addition to this, various methods such as sonication-mediated transformation, *in planta* transformation, and transformation on meristem tissue of germinating seed, have been tried in Korea, even though their efficiencies on repeatability and stability were relatively low. Based on the promising results developed recently by reviewer, several important considerations for successful soybean transformations were suggested. They are 1) proper genotype screening, 2) targeting transformation on exact point, 3) multiple shoot formation, 4) efficient selection pressure, 5) successful shoot elongation, 6) efficient root formation. These are the basic requirements for stable and highly efficient soybean transformation of Korean soybean.

서론

콩은 세계적으로 중요한 단백질과 식물성 기름 생산 작물로서 형질개선을 위해 세계적으로 꾸준하게 육종이 진행되고 있다. 한국을 비롯한 중국과 일본은 콩을 오랜 기간 동안 식량작물로 이용해왔기 때문에 콩 육종을 위한 유전자원과 육종기술이 축적되어왔다. 이는 콩이 가지고 있는 단백질 과 지방조성, 그리고 다양한 기능성을

고려해 볼 때 당연한 것이라고 하겠다. 유전자 재조합에 의한 콩 생산은 1980년대부터 미국을 중심으로 기술개발이 꾸준히 진행되어 이미 GM콩이 생산된 지 15년 이상이 되었다. 많은 유전자의 도입이 형질전환을 통하여 시도되었고 그 중에서 제초제저항성 (glyphosate)과 해충저항성 (BT toxin)이 농업적으로 널리 활용되고 있다 (Padgett 등 1995; Stewart 등 1996). 농업적으로 유용한 유전자가 도입된 콩이 실용화된 이후에도 콩형질전환 효율증대를 위한 연구는 계속 진행되어 왔는데, 이는 향후에 전개될 유전체 기능연구를 위하여 형질전환기술이 활용될 것이기 때문이다. 형질전환효율을 높이기 위한 연구는 미국을 중심으로 여러 연구실에서 경쟁적으로 진행되어 다양한 처리조건과 실험조건이 개선되면서 고효율의 형질전환기술이 개발되었다 (Olhoft 등. 2003; Paz 등 2005). 미국의 몇몇 실험실에서 개발된 고효율의 형질전환기술은 기존에 사용하던 방법에 새로운 보완을 하여 이루어 졌다. 가장 눈에 띄는 개선점은 빠르고 효과적인 선발방법인데, 이는 많은 콩형질전환 연구자들이 추구하는 방법의 단순화와 보다 비용이 저렴한 실험방법, 그리고 전체 과정의 단축과 매우 밀접한 연관이 있다. 콩형질전환 연구자들은 형질전환 되지 않은 세포나 키메라의 출현을 방지하기 위해 많은 노력을 하여왔는데 이는 효율적인 선발 방법에 달려 있다. 이렇게 해서 개발된 실험방법들은 가능하면 넓은 범위의 품종에 적용되도록 시도되었고 이를 위하여 다양한 종류의 아그로박테리움을 콩 형질전환 실험에 사용해왔다. 최근에 콩형질전환 효율을 가장 크게 높인 사례는 미국 미네소타대학의 연구결과로서 안정적인 형질전환효율이 약 16%임을 보고하였다 (Olhoft 등 2001, 2003). 이 결과는 하이그로마이신을 이용한 효율적인 선발과 황화물의 첨가로 얻어졌다. 특히 황화합물의 첨가는 아그로박테리움을 이용한 형질전환이 토양미생물과 식물세포간의 싸움이라는 것과 식물이 미생물감염

E. H. Jeon · Y.-S. Chung (✉)
동아대학교 유전공학과
(Department of Genetic Engineering, Dong-A University, Busan 604-714, Korea)
e-mail: chungys@dau.ac.kr

에 따른 저항성 기작을 일으키고 이 기작들이 형질전환에 방해가 된다는 점에 착안하여 식물의 방어관련 독성 물질을 일시적으로 무력화시키는 항산화 기능의 황화물을 첨가함으로써 높은 형질전환효율을 얻었다. 형질전환 과정은 식물세포 입장에서 보면 매우 커다란 스트레스 과정이라고 할 수 있다. 따라서 지나친 스트레스의 정도를 낮추어 줌으로써 형질전환이후에 식물의 회복을 돕는 것은 형질전환 효율증대를 위해 매우 중요하다고 하겠다. 첨가된 황화물은 병 또는 상처반응관련 효소들인 peroxidase (PODs)와 polyphenol oxidase (PPOs)의 활성화를 억제하는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 개발된 고효율의 형질전환방법들은 특정유전자의 형질전환뿐만 아니라 최근 활성화된 유전체 연구의 결과로 얻어진 콩의 전체염기서열과 많은 유전자들에 대한 기능규명 연구에 사용될 수 있다. 고효율의 콩형질전환 기술은 계속 발굴되는 콩 유전자들의 기능을 밝히기 위한 T-DNA 삽입돌연변이 집단 생산에도 쓰일 수 있어 기능유전체연구에 매우 유용한 기반을 제공하게 될 것이다.

콩의 또 다른 형질전환방법으로는 물리적인 것으로 콩체세포 배를 재료로 하여 유전자 총 (gene gun)을 이용한 형질전환방법이 있는데 이 방법은 주로 90년대에 많이 사용되었다. 그러나 유전자총을 이용한 형질전환방법은 형질전환체에 도입되는 유전자의 copy수가 많아 후대에서 유전자의 과다도입으로 인한 유전자 침묵 (gene silencing)이 자주 발견되어 그 사용이 제한되고 있다. 또한 유전자총 형질전환재료로는 주로 체세포배가 사용되는데 체세포배를 유기하기 위해서는 미성숙종자를 쓰기 때문에 재료의 연중확보에 어려움이 있고, 체세포배 유기 가능한 품종 (genotype)도 매우 제한되어 있다.

이 논문에서는 그 동안 국내연구진에 의해서 보고된 콩형질전환연구의 결과와 특성을 살펴보고 형질전환 단계별로 중요한 고려사항을 분석하여 오랜 시간동안 국내에서 재현성과 효율이 높은 형질전환 기술이 개발되지 못한 원인을 규명하고자 한다.

국내 콩형질전환 기술 개발 현황

국내에서 콩형질전환 기술개발을 위한 실험은 농촌진흥청을 비롯한 몇 개의 대학, 연구소를 중심으로 2000년대에 들어서 집중적으로 수행되었다. 이는 2000년대 들어서 콩형질전환 기술의 중요성이 부각되었고 국가 R&D의 한 방향이 형질전환을 통한 품종생산방향으로 투자되면서이다. 대표적으로 프론티어 작물유전체 사업과 바이오그린 21사업, 그리고 농림기술개발사업에서 몇 개의 콩형질전환을 이용한 품종생산연구가 제안되었고, 이들 과제를 통하여 콩형질전환에 대한 국내 기술이 축적되기

시작하였다. 연구결과의 학술지 publication은 현재까지도 10개가 되지 않을 정도로 미미한 결과를 보이고 있는데 이는 국내에서 콩형질전환을 통한 재현성 있는 결과의 도출이 매우 어려움을 단적으로 보여주고 있다.

국내의 한 연구에서 콩의 α -tocopherol 함량증가를 위해 γ -tocopherol methyl transferase 유전자를 콩에 도입하였음을 보고하였다 (Kim 등 2003). 형질전환방법으로는 sonicator를 이용하여 자엽에 상처를 낸 후, 아그로박테리움을 이용하거나, *in planta* 방법 (Chee 등 1989)을 사용하였다. 이 방법은 12-48시간 발아한 콩종자의 자엽마디에 아그로박테리아 용액을 주사기를 통하여 주입하고 3일 후에 흠에 바로 심어 식물을 키우는 것이다. 이 방법은 콩형질전환 기술 개발 초기에 미국의 한 연구팀이 사용했던 방식이고, 재현성과 낮은 효율성을 가지고 있어 일반적으로 사용되지 않는 방법이다. 또한 이 연구에서는 아그로박테리움에 대한 선택이 없었고 콩에는 형질전환효율이 매우 낮거나 거의 없는 균주LBA4404를 사용하였다. 또한 선발을 위해서 카나마이신을 사용하였는데 이 항생제는 많은 연구자들이 선발효과가 없고 무수히 많은 비형질전환체 (escape)들이 형성됨을 보고한 바 있다 (Zhang 등 1999; Clement 등 2000). 콩형질전환 결과에 대한 많은 문제점에도 불구하고 이 연구의 다른 의의는 아주 높은 효율의 체세포배 형성에 있다. 이 실험에서 스크린된 국내 여러 품종에서 상당히 높은 빈도의 체세포배형성을 나타내었으며 체세포배가 형질전환재료로 사용될 수 있다는 점에서 올바른 형질전환방법의 적용과 적절한 아그로박테리움의 사용으로 성공적인 콩형질전환기술개발의 가능성을 열어 놓고 있다. 체세포배 생산에 대한 이와 같은 성공적인 연구결과가 국내의 다른 연구자들에게 재료공급의 문제를 해결해 준다면 국내에서도 다양한 재료를 이용한 콩형질전환기술개발이 가능할 것이다.

근래에 미국의 많은 연구실에서 가장 보편적으로 사용하고 있는 콩형질전환 방법은 자엽마디에 상처를 낸 후에 아그로박테리움으로 감염을 시키고 식물체를 재분화시키는 것이다 (Zhang 등 1999). 이와 같은 방법으로 국내에서도 콩형질전환을 하여 발표한 보고가 있었는데 (Cho 등 2004), 이 연구에서는 다양한 아그로박테리아 균주를 이용하여 콩형질전환결과를 보고하였다. 이 연구결과는 미국에서 가장 보편적으로 사용하는 콩의 자엽절 (cotyledonary node)을 사용하여 형질전환을 하는 방법을 사용하였으며, 특히 다양한 아그로박테리아를 사용하여 형질전환효율을 비교하였다. 모두 4종류의 아그로박테리아와 2종류의 벡터를 조합하여 실험을 수행하였고 이중에서 11개체의 잠재적인 형질전환체 (0.77%)를 보고하였다. 그러나 이 실험의 재료로 사용된 국내품종은 백운콩과 무안콩만 사용되었고 폭넓은 국내 콩품종들에 대한 유전자형스크린은 수행하지 않았다. 하지만 이 논문은 콩형

질전환을 위해서 가장 보편적으로 쓰이는 자엽절을 이용한 형질전환방법과 PPT를 이용한 선발등 합리적인 방법을 기반으로 하여 접근했다는 실험적 의의를 가진다.

콩형질전환기술개발을 위해서는 국내 콩품종들의 아그로박테리움에 대한 감염도를 측정하여 감염순응도가 높은 품종을 골라 사용하는 것이 매우 중요하다. 국내 콩 품종들에 대한 아그로박테리움의 감염도가 한 연구팀에 의해서 조사되었다 (Lee 등2006). 국내 장려품종을 포함한 32개의 콩품종들을 재료로 아그로박테리움의 감염도를 transient GUS assay를 이용하여 조사하였으며, 그 결과로 은하콩, 일품검정콩, 대원콩, 만리콩 등과 같은 아그로박테리움 순응형 14개의 품종을 선발하였다. 그러나 이 실험에서 보여주었던 콩형질전환 순응형 품종의 선발과 GUS 유전자의 성공적인 초기발현에도 불구하고 안정적인 형질전환체를 확보하는데는 실패를 하였다. 실패에 대한 정확한 이유는 규명되지 않았으나 한 가지 가능한 이유는 하이그로마이신을 이용한 선발방법이 확립되지 않은데 있다고 할 수 있다. 아직까지 국내 콩품종을 재료로 하이그로마이신 선발을 통해 형질전환체를 생산한 예는 없으며, 이는 국내에서 하이그로마이신을 이용한 선발체계가 확립되지 않았음을 나타내고 있다. 이 실험은 성공적인 결과를 얻지는 못했지만 나중에 같은 연구팀에 의해서 국내 콩 고효율형질전환기술개발의 기초가 되는 많은 기술의 축적이 이 실험을 통해서 이루어졌다.

비슷한 연구 (Lee 등 2008)가 국내품종을 포함한 28개의 재배품종에 대해 수행되었으며, 두 개의 아그로박테리움 균주인 EHA105와 KYRT1을 이용하여 수행되었다. 그 결과로 국내 콩 중에서는 단백질콩과 은하콩, 그리고 외국품종중에서는 Jack과 Peking이 선발되어 제초제저항성 콩 생산을 위한 형질전환이 수행되었다. 실험의 결과는 GUS유전자의 발현을 통한 분석에서는 KYRT1 균주를 사용한 실험에서 높은 유전자의 발현을 관찰하였으나, 감염 후 균주의 과도한 생장이 제균을 방해하여 실험 수행을 할 수 없었다. KYRT1은 많은 연구자들이 제균의 어려움을 갖는 균주로써 유전자 도입의 효율성에도 불구하고 그 사용에 많은 제약을 갖게 한다. 이 실험의 결과로 국내 콩 품종에서는 안정한 유전자의 도입이 이루어진 개체를 확보하는데 실패하였으며, Peking을 재료로 한 실험에서만 0.8%의 낮은 형질전환효율을 얻었다. 이와 같이 국내 콩품종을 재료로 한 형질전환실험에서는 안정적인 유전자의 도입의 어려움을 많은 연구자들이 공통적으로 경험해왔다.

위에서 언급한 현재 사용하고 있는 방법 중 가장 일반적인 자엽절을 사용하지 않고 발아종자의 분열조직을 이용한 형질전환이 최근에 보고되었다 (Kim 등 2008). 이 연구에서는 기존의 자엽절에 상처를 내고 아그로박테리움에 감염시키는 방식을 이용하지 않고 발아하는 콩종자

로부터 배축을 분리하고 정단부 및 측아분열조직을 포함한 0.5-2 cm 정도의 부분을 상처처리 없이 장시간 아그로박테리아 용액에 담가 유전자의 도입을 유도하는 방식을 택했다. 이 방법은 기존에 발표된 방법 (Liu 등 2004)에 작은 변화를 준 방식인데, 결과에 있어서는 최근에 국내에서 발표된 연구 중에서 가장 성공적인 것으로 보인다. 이 연구에서는 후대를 생산하였고 후대에서 유전자의 발현을 확인하였다는 점에서 기존의 연구와는 다르게 안정적 유전자의 도입을 한 것으로 보인다. 이 방법은 현재 가장 보편적으로 사용되고 있는 자엽 마디절에 상처를 주고 형질전환을 하는 방식과 매우 다른 듯 보이나, 결과적으로 같은 부위인 측아의 분열조직에 유전자의 도입이 이루어진다는 점에서 두 방식은 매우 유사성이 높다. 형질전환효율은 높지 않았는데 Liu 등 (2004)의 방법을 대조구로 사용한 경우에는 형질전환체를 하나도 얻지 못하였다. 다른 연구에서와 마찬가지로 이 연구도 외국에서 개발된 방법을 그대로 적용했을 때 같은 연구결과를 얻는 재현성이 나타나지 않았다. 국내 콩형질전환 연구에 관여하는 많은 연구자들의 공통적인 문제는 외국에서 사용되는 보편적이고 간단한 형질전환방법들이 국내에서 재현하려고 했을 때는 대부분 실패하고 있다는 것이다. 이와 같은 결과에 대한 원인은 보다 정확한 실험 방법에 대해 관련연구자들이 공동으로 정보를 공유하고 분석하면서 풀어 나가야 할 숙제로 남아있다.

국내 콩 고효율형질전환기술개발을 위한 고려사항

외국에서 개발되고 일상적으로 사용되는 콩형질전환 방법이 국내에서는 잘 재현이 되지 않는 문제점을 국내 여러 연구자들은 공통적으로 경험해왔다. 국내 연구 분야의 경쟁을 고려할 때, 많은 연구자들이 결과 도출에 따른 압박감 때문에 조급함을 보여 왔고 이는 결과적으로 기초연구의 집중부재로 이어져 궁극적으로 완성된 콩형질전환 방법의 개발을 늦춰 왔다. 미국의 경우에도, 연구자간의 경쟁은 존재하나 식물학 기초연구분야 (식물해부학 및 식물생리학)의 발달과 몬산토와 같은 세계적 회사들의 적극적인 기술개발 참여에 힘입어 콩형질전환에 필요한 기초기술이 완성되었고, 연구자들의 간의 잦은 소통과 교류, 그리고 경쟁적 협력에 힘입어 높은 효율과 안정적인 유전자 도입을 가능하게 한 콩형질전환기술이 개발되었다. 국내에서도 미국과 같이 회사의 적극적인 기술개발 참여나 연구자들 간의 협력체계를 구축하는 것은 쉽지 않겠지만 안정적인 콩형질전환 기술의 개발과 보급은 향후 진행될 형질전환을 통한 분자육종을 위해 매우 중요한 일이다. 따라서 그 동안 미국과 일본의 성공적인 콩형질전환실험실을 방문하고 이를 기초로 국내 콩형질

전환 기술을 개발하는 데 매우 큰 도움이 되었던 기초적이나 해결이 쉽지 않았던 기술적 고려사항을 설명하고자 한다.

첫째 고려사항은 형질전환 순응형 품종의 스크린이다. 콩형질전환과정은 가장 먼저 아그로박테리움의 식물감염과 유전자의 도입을 전제로 한다. 아그로박테리움의 식물감염력은 자체의 virulence에 기인을 하고 (Gelvin 2003), 이는 이미 많은 균주에 대한 검정을 통하여 최상의 식물감염력을 가지는 균주들에 대한 정보가 유용하다. 야생형 아그로박테리움의 사용은 이들이 가진 높은 공격력에 의하여 보편적으로 사용해왔던 아그로박테리아들에 비해 높은 효율의 형질전환빈도를 제공해왔다 (Hood 등 1993). 일반적으로 균주도 super plasmid를 사용할 때에는 높은 형질전환효율을 주었지만 (Hiei 등 1994), 일반적인 벡터를 사용할 때에는 효율성에서 매우 떨어지는 경향이 있다. 따라서 공격력이 매우 강한 야생형 아그로박테리아를 사용할 때에는 그 다음 고려사항인 감염에 순응적인 (amenability) 품종을 사용하는 것이 매우 중요하다. 아그로박테리아의 감염은 식물에서 협조적으로 생산하는 특정단백질에 의해서 그 효율이 매우 증대될 수 있다 (Hwang과 Gelvin 2004). 이는 식물과 아그로박테리움과의 감염이 박테리아와 박테리아간의 접합 (conjugation)에서 발전한 모델로 생각되며 접합을 위하여 박테리아간에 단백질 연계반응이 중요하듯이 식물과 아그로박테리움간

의 단백질 상호작용이 유전자의 식물세포내로의 도입에 매우 중요하다. 그 한 예가 식물의 BT1단백질 (VirB2-interacting protein)인데 이 단백질을 Arabidopsis에 과다발현 시켰을 때, 아그로박테리움 감염에 대한 과다이병성 (Hypersusceptibility)을 나타내었다. 우리에게 알려진 형질전환이 잘 되는 콩품종들은 아그로박테리움에 대해 이병성을 높이는 단백질을 생산하는 것으로 생각되며, 현재 형질전환실험을 통하여 경험적으로 판단되는 품종 또는 유전자형선발을 분자수준에서 아그로박테리움에 대한 이병성을 결정하는 식물유전자들에 대한 발현 조사 등으로 보완 할 필요가 있다. 아그로박테리움감염 후, GUS transient assay를 이용하여 국내 콩품종들의 감염정도를 조사한 결과, 국내 콩품종 중에 소진콩, 광안콩, 다채콩, 청자콩2호 등이 높은 GUS발현을 보여 이병성정도가 매우 높은 것으로 나타났다 (Table 1). 중급정도의 감염을 보이는 품종으로는 검정콩1, 2호, 다원콩, 단백콩등 다수의 콩들이 감염이병성을 나타내어 현재 국내에서 형질전환에 사용 할 수 있는 콩품종들의 유전적 배경은 충분하게 보인다. 앞에서 언급한 것처럼 좀 더 정확한 분자적 수준에서의 스크린을 위하여 아그로박테리움의 식물감염을 돕는 식물 유전자들을 마커로 구성하여 유전자형을 구별해 내는 방법에 대한 연구도 앞으로 필요할 것으로 생각된다.

둘째 고려사항은 정확한 부위로의 유전자 도입이다.

Table 1 Genotype screen of Korean soybean cultivars for Agrobacterium amenability

Cultivar	GUS effc.	Cultivar	GUS effc.	Cultivar	GUS effc.
Kumjeongsaeol	+	Bokwang	++	Ilpumkumjeong	++
Kumjeongeol	+	Samnam	+	Jangsu	++
Kumjeongkong1	++	Sukryangput	+	Jangmi	+
Kumjeongkong2	++	Sunnok	+	Jangyeop	+
Kumjeongkong3	+	Sunyu	+	Jangwon	+
Kumjeongkong4	+	Sunheuk	+	Jinyul	++
Kwangan	+++	Sodam	+	Jinpum	+
Namhae	+	Somyeong	++	Jinpumkong2	+
Daeol	+	Sorok	++	Chungdul	+
Dawon	++	Sowon	+	Chungjakong	++
Dajinput	+	Sojin	++++	Chungjakong2	+++
Dachai	+++	Shinki	+	Chungjakong3	+
Danmiput	+	Shinrok	+	Kenueol	+
Danback	++	Shinpaldal	++	Taekwang	++
Daemang	+	Saeal	+	Pureun	+
Dawwon	++	Saeol	+	Hwangkeom	+
Duyu	+	Anpyeong	+	Hwaumput	++
Myeongjunamul	++	Eunha	++		
Muhan	++	Ilmi	+		

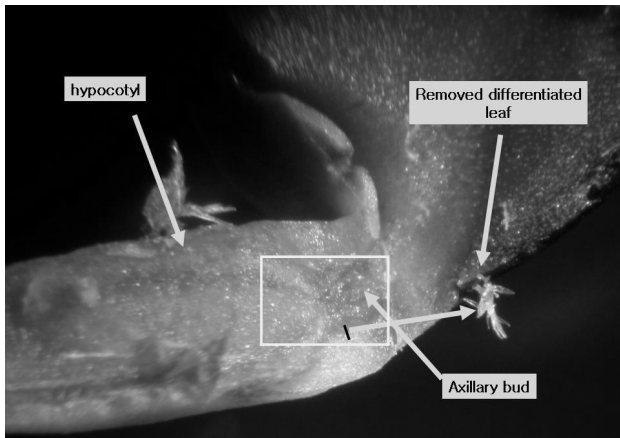


Fig. 1 Morphology of cotyledonary node and transformation target area (inside rectangle)

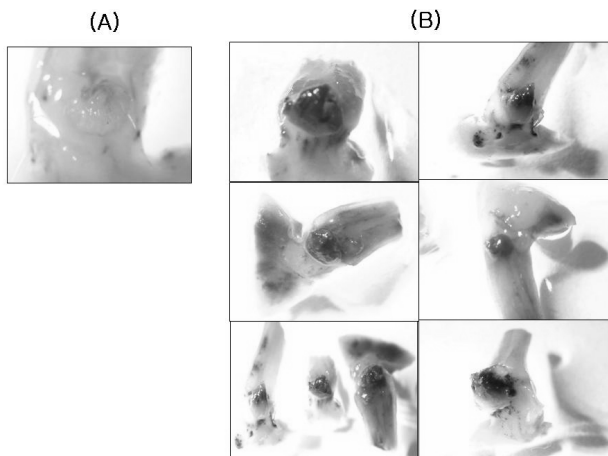


Fig. 2 Transient GUS expression after *Agrobacterium*-mediated transformation on cotyledonary node. (A) unsuitable inoculation (B) suitable inoculation and GUS gene expression

현재 전 세계적으로 가장 보편적으로 사용하는 자엽절형질전환방법은 발아 후 5-6일 된 떡잎을 사용하는데 하배축이 제거된 떡잎의 node와 측아 (axillary bud)의 경계 부위가 아그로박테리아감염의 목표부위이다 (Fig 1; 그림 안의 박스부위). 공형질전환의 목표부위는 성장점조직을 포함한 부위로서 다른 작물에서는 형질전환의 목표로써 적절하지 않은 것으로 알려져 있다. 성장점의 경우, 빠른 성장속도 때문에 효율적인 선발이 어렵고 분화가 이미 된 세포의 존재 시에 키메라식물이 나올 확률이 매우 높아지기 때문이다. 그럼에도 콩의 경우, 성장점을 포함한 부위가 형질전환의 목표부위로 사용되는 것은 다른 조직을 explant로 사용하였을 때, 조직반응정도가 매우 낮고 기관발생 (organogenesis)이 거의 일어나지 않기 때문이다. 또한 콩 측아의 기부에 상처를 내고 형질전환을 하면 성장점을 포함한 상처부위가 빠른 속도로 회복 및 재구성되어 부풀어 오르다가 잎의 원기들이 다시 형성됨으로써 선발과정 중에 형질전환세포가 빠른 비율로 자라나는 것

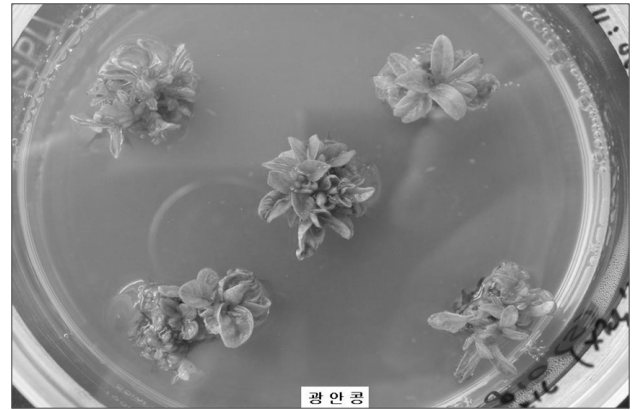


Fig. 3 Multiple shoot formation after removal of primary shoots originated from non-transformed cells

을 알 수 있다 (Fig 2). 이와 같은 현상은 선발과 함께 유전자 도입세포들이 초기의 낮은 비율에서 빠르게 증식되어 이차 신초 (secondary shoot)의 발생에 관여하여 키메라의 발생을 억제하는 것으로 생각된다. 앞에서 언급되어진 것과 마찬가지로 이때 가장 중요한 요인 중에 하나가 상처부위를 중심으로 한 갈변화의 억제이고 현재 갈변화의 억제를 위하여 황화합물 (L-Cysteine, Sodium thiosulfate, DTT)을 첨가하고 있다 (Olhoft 등 2001, 2003). 형질전환초기의 황화물첨가효과는 이미 다른 식물에서 밝혀졌는데 (Perl 등 1996), 콩에서도 최적화화된 조합과 농도의 황화물첨가는 초기에 식물세포내의 갈변화를 유도하는 단백질들 (PPO & POD)의 활성을 억제하여 초기신초형성과 형질전환효율증대에 크게 기여하는 것으로 밝혀졌다. 황화물의 첨가와 함께 공형질전환 효율증대를 위해서는 반드시 정확한 부위에 상처를 내야 한다. 현재 고효율의 공형질전환효율 (10%이상의 stable transformation)을 얻고 있는 실험실들의 경우, 측아와 하배축의 아주 좁은 부위에 매우 정밀하게 상처를 낸 후에 아그로박테리움 감염을 시키고 있는데 이와 같은 정확한 상처방법이 높은 형질전환효율의 원인으로 생각되고 있다.

세 번째 고려사항은 형질전환 직후에서부터 약 4주 정도에 이르는 기간 동안의 신초형성이다. 형질전환과 세척 후에 떡잎에 연결되어 있는 자엽절은 SI (shoot induction)배지에 2주씩 4주간 치상하게 되는데, 처음 2주 동안에는 측아 (axillary bud/meristem)에서 1차 신초 (primary shoot)가 형성된다. 그러나 1차 신초의 대부분은 형질전환 되지 않은 측아성장점의 세포들에서 자라나오기 때문에 선발이 시작되는 SI-2배지에서부터 점차 죽어가기 시작한다. 1차 신초들이 서서히 죽어갈 때, 바로 하부에 새롭게 새살처럼 자라 올라오는 2차 신초 (secondary shoot)들이 관찰되는데 이들은 곧 바로 다수의 신초 (multiple shoot)를 생성한다 (Fig 3). 이 multiple shoot 형성은 다음에 연결되는 신초신장 (shoot elongation)에 직접적으로 영향

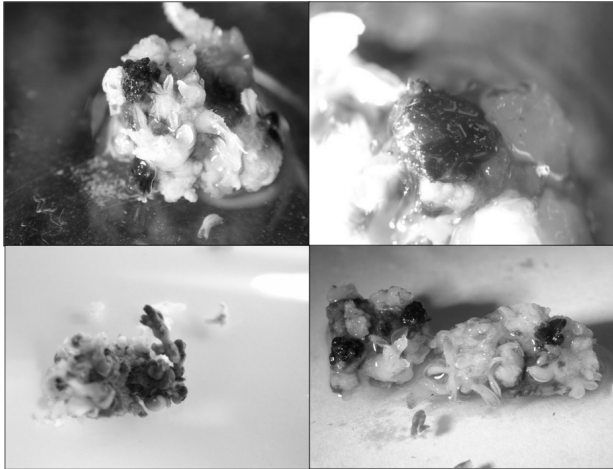


Fig. 4 Clonal bud formation through the efficient selection procedure

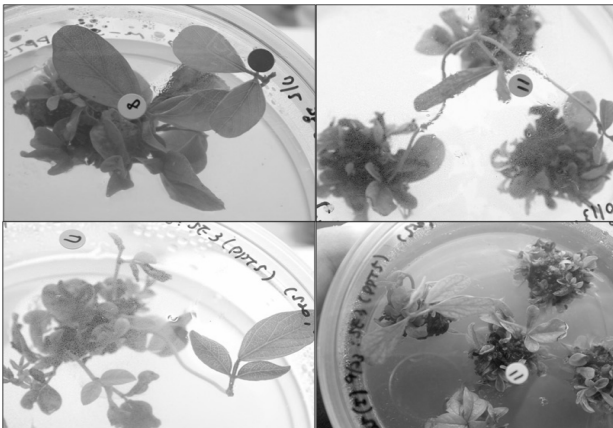


Fig. 5 Shoot elongation on SE media. Formation of relatively large leaf is required for faster development of root in next step

을 미치기 때문에 성공적인 콩 형질전환을 위해서 매우 중요하다. 성공적인 multiple shoot형성은 측아를 과도하게 파괴시키지 않는 적당한 상처와 상처 후에 신초형성을 할 수 있는 품종자체의 능력에 크게 의존하는 것으로 생각된다.

네 번째 고려사항은 효율적인 선발조건이다. 대개 형질전환 2주후부터 시작되는 선발은 초반에는 너무 강하지 않으나 후반부에 높은 농도의 선발을 하는 것이 일반적이다 (Olhoft 등 2003). 그러나 식물조직이 과도하게 죽어서 갈변이 일어나면 선발조건을 낮추거나 silver nitrate와 같은 에틸렌 억제제를 첨가하여 주는 것이 신초의 성장과 발육에 도움이 된다 (Santos 등 1997). 효율적인 선발의 결과는 형질전환세포들의 성장을 촉진시켜 clonal bud의 형성을 돕는데 이는 다음 단계인 신초 신장을 위해 매우 중요하다 (Fig 4).

다섯 번째 고려사항은 효율적인 신초신장유도이다 (Fig 5). Multiple shoot의 형성과 순조로운 선발이 이루어

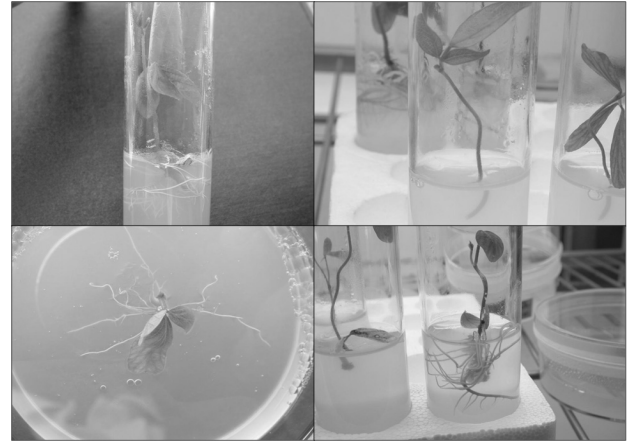


Fig. 6 Root formation from the detached and elongated shoots

지면, 형질전환세포들의 생육은 빨라지고 조직 내의 빈도가 증가한다. 형질전환세포들의 증가는 이들 세포들로 구성된 clonal bud의 형성을 촉진한다. 그리고 이 clonal bud로부터 줄기의 신장이 이루어지는데 적절한 선발을 할 경우, 줄기가 신장된 개체의 50% 정도가 유전자가 도입된 형질전환체였다. 신초의 효율적인 신장을 유도하기 위하여 미량의 옥신 (IAA)과 사이토키닌 (zeatin)이 적절한 비율로 배지에 첨가되며, 특히 줄기의 신장을 위해서 지베렐린을 넣어 주어야 한다.

여섯 번째 고려조건은 효율적인 발근유도이다 (Fig 6). 효과적인 발근 유도를 위해서는 전단계인 신초신장이 매우 중요한데, 특히 줄기의 길이가 어느 정도 길어야 하고 (4cm이상), 특히 잎의 크기가 커야한다. 줄기의 길이가 너무 짧거나 잎이 작은 경우에는 장기간동안 식물체가 발근배지에 반응을 하지 않고 뿌리형성대신 줄기절단부위에서 캘러스가 형성되는 것을 볼 수 있다. 이 경우, 다량의 캘러스형성에도 불구하고 발근이 이루어 지지 않으며, 발근이 되어도 캘러스에서 유래된 독자적인 뿌리로서 상체부의 성장에 아무런 도움을 주지 않는다. 대부분의 현재 사용되는 콩발근배지에는 옥신인 IAA가 일정량 첨가되고 있는데 배지에 제공된 옥신과 함께 식물 자체 내에서 생산되는 옥신의 역할도 발근에 매우 중요한 것으로 생각된다. 발근이 성공적으로 이루어질 경우, 빠르면 2-3일내에 발근이 관찰되며 1-2주 안에 충분한 양의 뿌리생장과 함께 상부의 생장을 관찰 할 수 있다. 충분한 뿌리와 상부의 생장이 이루어진 개체는 흙으로 옮겨져 일정기간의 순화를 거친 다음 온실에서 재배가 가능하다.

위에서 기술된 6가지 고려사항은 국내 콩품종을 재료로 한 형질전환기술개발에 매우 중요한 고려사항들이고, 목표유전자가 도입된 형질전환체를 다수 확보한 후에는 다음 단계인 환경위해성 평가를 위해 적절한 형질전환체를 선발하는 것이 매우 중요하다. 환경위해성 평가에 사

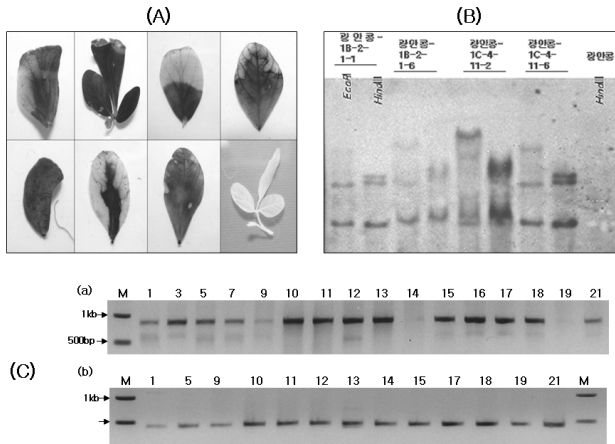


Fig. 7 Confirmation of introduced gene by reporter gene (GUS) analysis (A), Southern blot (B), and boarder amplification (C) for left boarder (a) and for right boarder (b)

용될 수 있는 형질전환체들은 유전자의 도입이 완전한 T-DNA를 보존하고 있어야 하며 이에 대한 확인이 필요하다 (Fig 7). 개체들은 T-DNA의 LB (left boarder)와 RB (right boarder)가 정확히 검출되어야 하며, Southern 분석을 통하여 1개의 유전자가 도입된 것들을 재료로 환경위해성 평가가 수행될 수 있다.

결론

이상에서 국내 콩형질전환기술에 대한 국내 연구 현황과 성공적인 기술개발을 위한 고려사항을 설명하였다. 오랜 기간 콩형질전환기술개발을 위한 많은 연구가 수행되었음에도 불구하고 재현성과 효율이 높은 형질전환기술이 국내 연구자들에 보편적으로 사용되고 있지 않은 것은 매우 유감스러운 일이다. 이는 단시간에 결과의 도출을 요구하고 실패를 인정하지 않는 국내 R&D관리방식과 그리고 연구의 문제점과 현실을 똑바로 직시하지 않는 연구자들의 자세에 그 1차적인 원인이 있다고 생각한다. 같은 연구목적을 가진 연구자들이 그룹으로 당면한 문제점을 서로 토론하고 협의하여 해결해 가는 연구협력체제와 기술개발이 어려운 연구과제에 대한 합리적인 관리가 매우 절실하다. 국내 모든 식물연구 분야의 공통된 문제점은 시설과 연구비를 떠나서 외국에 비해서 연구자의 수가 현저히 작다는 것이다. 같은 연구 분야의 집단이 매우 작기 때문에 조금만 노력을 하면 연구자들 간의 공동협의체나 작은 컨퍼런스를 통한 연구협의 및 정보교환이 가능하다. 더 나아가서 같은 식물재료로 연구하는 사람들 간에 전통육종이나 생명공학이나를 따지며 거리를 두는 것은 국가차원에서의 연구개발에 바람직하지 않다. 특히 GM작물을 재료로 분자육종을 통하여

품종을 만들기 위해서는 공유전육종 연구자들의 도움이 매우 절실히 필요하다. 식량생산에 범국가적이고 나아가서 국가경쟁력을 높이기 위하여 콩연구자들의 연구역량결집이 매우 필요하다.

적요

그 동안 국내연구진에 의해서 발표된 논문을 중심으로 국내 콩형질전환기술의 개발현황을 알아보았다. 국내에서 사용되고 있는 콩형질전환방법은 전 세계적으로 가장 보편적으로 사용되고 있는 자엽마디절에 아그로박테리움을 이용하여 유전자를 도입하는 방법이 가장 높은 빈도로 이용되었고, 그 외에 초음파방법, *in planta*방법, 그리고 발아종자의 분열조직을 이용한 방법 등 비교적 다양한 방법들이 사용되었다. 그러나 결과에 있어서는 재현성이나 안정적인 형질전환의 효율이 외국의 사례에 비해 높게 나오지는 않았다. 최근에 본 연구진에 의해서 개발된 상대적으로 높은 형질전환결과를 바탕으로 고효율 형질전환기술을 위한 고려사항이 6가지 제안되었다. 제안된 고려사항은 1) 형질전환 순응형 품종의 스크린 2) 정확한 부위로의 유전자 도입 3) 형질전환 직후에서부터 약 4주 정도에 이르는 기간 동안의 신초형성 4) 효율적인 선발조건 5) 효율적인 신초신장유도 그리고 6) 효율적인 발근유도이다

사사

이 논문은 동아대학교 교내연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- 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 MA, Choi DW, Liu JR, Clement T, Choi PS (2004) Development of transgenic soybean using *Agrobacterium tumefaciens*. *Kor J Plant Biotechnol* 31:225-259
- Clement TE, LaVallee BJ, Howe AR, Conner-Ward D, Rozman RJ, Hunter PE, Broyles DL, Kasten DS, Hinchey MA (2000) Progeny analysis of glyphosate-selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation. *Crop Sci* 40:797-803
- Gelvin SB (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: The biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 67:16-37

- 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
- Hood EE, Gelvin AB, Melcher LS, Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Res* 2:208-218
- Hwang HH, Gelvin SB (2004) Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *The Plant Cell* 16:3148-3167
- Lee KJ, Seo JK, Lee HY, Jeon EH, Shin SH, Lee JH, Kim DH, Ko JM, Hahn WH, Baek IY, Oh BJ, Chung YS (2006) Optimization of genetic transformation conditions for Korean soybean cultivars. *Kor J Life Science* 16:289-296
- Lee KJ, Park HJ, Yi BY, Lee KR, Kim MS, Woo HJ, Jin YM, Kwon SJ (2008) Development of herbicide tolerant soybean using *Agrobacterium tumefaciens*. *Kor J Plant Biotechnol* 35:69-74
- Kim YH, Park HM, Choi MS, Sohn SI, Shin DB, Lee JY (2008) Efficient transformation method of soybean using meristematic tissues of germinating seeds. *Korean J. Breed. Sci.* 40:278-285
- Kim YJ, Suh SK, Oh YJ, Kim KH, Park HK, Kim SD, Yun SJ (2003) Tissue culture and genetic transformation of soybean [*Glycine max*(L.) Merrill] with a γ -TMT gene to enhance α -tocopherol content. *Korea Soybean Digest* 20:37-56
- Liu HK, Yang C, Wei ZM (2004) Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean using an embryonic tip regeneration system. *Planta* 219:1042-1049
- Olhoft PM, Lin K, Falbraith J, Nielsen NC (2001) The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep* 20:731-737
- Olhoft PM, Flagel LE, Donovan CM, Somers DA (2003) Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta* 216:723-735
- Padgett SR, Kolacz KH, Delaunay X, Re DB, LaVallee BJ, Tinius CN, Rhodes WK, Otero YI, Barry GF, Eicholtz DA, Peschke VM, Bida DL, Taylor NB, Kishore GM (1995) Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci* 35:1451-1461
- Paz MM, Martinez JC, Kalvig AB, Fonger TM, Wang K (2005) Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep* 25:206-213
- 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 antioxidant during grape-*Agrobacterium* interaction. *Natbiotechnol* 14:624-628
- Santos KGB, Mundstock E, Bodanese-Zanettini MH (1997) Genotype-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor. *Plant Cell Rep* 16:859-864
- Stewart CN, Adabg MJ, All JN, Boerma HR, Cardineau G, Tucker D, Parrott (1996) Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIIAc* gene. *Plant Physiol* 112:121-129
- 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 and Organ Culture* 56:37-46