

콩 Genotypes별 형질전환과 Cyst nematode의 번식을 위한 Hairy roots의 유기

호남 농업 시험장 목포시험장 : 박홍재, 오용비
U.of Illinois : Jack M. Widholm

Induction of hairy roots with high transformation efficiency on Soybean genotype and propagation of the Soybean cyst nematode

National Honam Agricultural Experiment station

Mokpo Experiment station : Hong-Jae Park, Yong-Bee Oh

University of Illinois : Jack M. Widholm

연구목적

GFP5 유전자로 형질전환된 *Agrobacterium rhizogenes*를 감염시켜 콩에서 Hairy Roots을 유기하여 빠르고 쉽게 식물 계놈내의 유전자 전이를 Moleculm level에서 분석하고 유전자의 작용을 검토함과 동시에 콩의 cyst nematode로 *GFP5* 유전자의 콩 hairy roots 표현의 성공적으로 번식시키고자 함

재료 및 방법

- 콩 Genotypes : Cartter, Fayette, Hartwig, Jack, Lee68, Mandarin, Maple, Arraw, Peking, PI437654 and Williams82
- *Agrobacterium* strain : K599 with binary vector pBIN-mGFP5-ER or pBI121

분석방법 : PCR(Dellaporta, 1994), Cucumopine(Sauk등, 1990), Gus assay(cho등, 1998), Southern blot(Rogers등, 1985), Western blot(Laemmli, 1970)

결과 및 고찰

- 10개의 콩 계통에 *Agrobacterium rhizogenes* K599으로 Hairy Roots을 유기해서 MXB 선발배지(MS+B5)에 200 μ g/ml Kanamycin 과 500 μ g/ml Carbenicillin을 첨가한 후 고체배지에서 선발하였다.
- 1차적으로 PCR과 Cucumopine analysis을 이용하여 gene 전환여부를 확인하였다.
- 형질전환에 대한 발현은 histochemical Gus assay 와 GFP에 대해서는 Western blot analysis로 확인하였다.
- Hairy root에 cyst nematode 알의 접종은 nematode 이병성 품종 Williams82에 하였다. 접종 4-5주 후 성숙한 cysts가 발견되었으며, GFP유전자가 발현된 Hairy root에 cyst를 접종하였다.

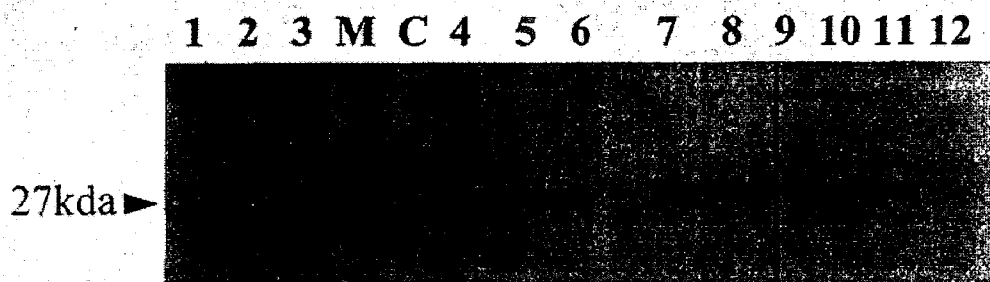
Table 1. Frequency of hairy root induction on cotyledons of genotypes of *Glycine max* inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* K599 containing binary vector pBIN-mGFP5-ER.

Genotype	1) No. of CPR/ CI	2) No. of gfp PR/ Km R	3) gfp PR/TRA
Cartter	51/54 (95 %)	30/30 (100)	15/15 (100)
Fayette	30/49 (61)	28/28 (100)	15/15 (100)
Hartwig	21/45 (54)	24/24 (100)	15/15 (100)
Jack	34/52 (65)	38/38 (100)	15/15 (100)
Lee 68	44/57 (77)	35/35 (100)	15/15 (100)
Mandarin	31/53 (58)	34/34 (100)	15/15 (100)
Maple Arrow	33/45 (73)	40/40 (100)	15/15 (100)
Peking	47/52 (90)	44/44 (100)	15/15 (100)
PI 437654	27/42 (64)	33/33 (100)	15/15 (100)
Williams 82	31/55 (56)	48/48 (100)	15/15 (100)

1) Number of cotyledons yielding Cucumopine positive /cotyledons inoculated

2) Number of GFP positive Roots / kanamycin resistance roots

3) Number of GFP positive / Total roots analysed



Western blot analysis of GFP from soybean hairy roots transformed by *A. rhizogenes* without and with pBIN-mGFP5-ER.

Lane 1 to 3, 20, 40 and 100 ng of GFP4 protein purchased commercially; M, protein marker; C, control hairy root; lane 5 to 12; hairy roots transformed with pBIN-mGFP5-ER. Lane C to 12 of the gel were loaded with 20 µg crude protein.