

## 아그로박테리움을 이용한 제초제 저항성 콩 개발

이기종<sup>1</sup>, 박홍재<sup>1</sup>, 이부영<sup>2</sup>, 이경렬<sup>1</sup>, 김명식<sup>1</sup>, 우희종<sup>1</sup>, 진용문<sup>1</sup>, 권순종<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 농업생명공학연구원, <sup>2</sup>서울시립대학교 환경원예학과

### Development of herbicide tolerant soybean using *Agrobacterium tumefaciens*

Kijong Lee<sup>1</sup>, Hongjae Park<sup>1</sup>, Buyoung Yi<sup>2</sup>, Kyeongryeol Lee<sup>1</sup>, Myungsik Kim<sup>1</sup>, Heejong Woo<sup>1</sup>, Yongmoon Jin<sup>1</sup>, and Soonjong Kweon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Agricultural Biotechnology, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

<sup>2</sup>Department of Environmental Horticulture, The University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

**ABSTRACT** This study aims to establish the efficient soybean transformation system and develop soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] transformants using cotyledonary node explants. The cotyledonary node of soybean were co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* strains (KYRT1, EHA105). These strains contain the binary vector pCAMBIA3301 which carries a herbicide-resistant *bar* gene. Korean cultivars (Danbaekkong, Eunhakong) and foreign cultivars (Jack, Peking) were the most efficient in regenerating cotyledonary node. Therefore, they were chosen for the transformation. Results showed that the T-DNA transfer reached up to 60% and transformation efficiency reached up to 3% in the cotyledonary node explants from Jack cultivar, co-cultivated with EHA105 strain. Histochemical GUS evaluation showed that 12 individual lines, transformed with the *gus* gene, have positive response. The transformed soybeans have been confirmed in the T<sub>0</sub> generation through phenotypic assay using herbicide Basta<sup>®</sup> and Southern blot analysis.

#### 서 론

동북 아시아인들의 주요 식량자원으로 이용되어온 콩 [*Glycine max* (L.) Merrill]은 1차 세계대전을 거치면서 전 세계의 주요 작물로 자리 잡게 되었다. 콩은 단백질, 지질, 식이섬유, 레시틴, 이소플라본과 같은 기능성 성분뿐만 아니라 칼륨, 마그네슘, 망간 등 비타민C를 제외한 모든 영양성분을 고루 함유하고 있어 최근 건강한 식생활을 위한 웰빙 식품으로 그 수요와 소비가 점차적으로 증가하고 있다 (Cho 2001). 동서양 모두 콩의 생산과 소비가 많은 만큼 콩을 다양하게 이

용하려는 많은 연구가 이루어지고 있으며, 특히 최근에는 생명공학기술을 이용한 연구가 여러 분야에서 진행되고 있다. 이미 10여 년 전에 제초제 (glyphosate) 저항성 유전자 (*epsps*)가 도입된 유전자변형 콩이 개발되어 북미지역을 비롯한 여러 나라에서 재배되기 시작하여 2006년에는 5,860만 ha의 면적에서 유전자변형 콩이 재배되고 있으며 이는 세계 유전자변형 작물 재배면적의 57%에 해당된다 (James 2006). 최근 유전자변형 콩의 재배가 늘어남에 따라 도입당시에는 예기치 못했던 생태적 영향과 관련하여 glyphosate 제초제에 저항성을 나타내는 잡초가 발생되어 (Sandermann 2006) 생태계에 대한 영향이 염려되는데, 제초제 저항성 잡초의 제거를 위해서는 작물 기작이 다른 제초제의 사용과 그에 대한 저항성 작물의 개발이 필요하다. 유전자변형 콩은 particle

\*Corresponding author Tel 031-299-1150 Fax 031-299-1122

E-mail: kwonsj@rda.go.kr

bombardment법 (McCabe et al. 1988)과 *Agrobacterium*법 (Hinchey et al. 1988)을 이용하여 연구되고 있으며, 형질전환시 발생되는 여러 문제점을 해결하고 형질전환 효율을 향상시키기 위하여 아그로박테리움의 병원성에 관한 연구 (Torisky et al. 1997), 외래유전자를 식물체로 효과적으로 도입하는 연구 (Santarem et al. 1998), 황화합물을 이용한 형질전환 효율 향상 연구 (Olhof and Somers 2001) 등 다양한 분야에서 연구가 진행되었음에도 국내외적으로 유전자변형 콩의 개발은 쉽지 않은 것으로 여겨지고 있다. 본 연구에서는 효율적인 형질전환 시스템을 확립하고, 최근 glyphosate 제초제 저항성 잡초 발생에 따른 생태계의 교란을 방지하기 위하여 새로운 제초제 저항성 콩을 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물체

Genotype에 따른 식물체 재분화 능력을 확인하기 위하여 대립종 16품종, 나물콩 5품종, 유색콩 7품종 총 28품종의 콩을 사용하여 식물체 재분화 능력을 검정하였다. 재분화에 이용된 배지의 조성은 Zhang (2004)의 방법을 이용하였다.

### *Agrobacterium* strain

pCAMBIA3301을 EHA105와 KYRT1에 각각 형질전환하여 비교실험에 이용하였다. Rifampicin 50 mg/L과 kanamycin 50 mg/L이 첨가된 YEP 고체배지에서 형성된 single 콜로니를 취하여 YEP 액체배지로 옮기고 28°C에서 120 rpm으로 진탕 배양하여 아그로박테리움의 농도를 OD<sub>600</sub>=0.6로 조절하여 형질전환에 이용하였다.

### 자엽 마디를 이용한 콩 형질전환

재분화 능력이 뛰어난 것으로 확인된 '단백콩', '은하콩', 'Jack', 'Peking' 종자를 염소가스법을 이용하여 16시간 표면 살균 후 3% sucrose와 0.8% agar가 첨가된 MS기본배지에 10개씩 치상하였다. 배양 5일후 발아된 식물체로부터 자엽마디를 분리하여 준비된 아그로박테리움에 30분간 침지 후 공배양용 배지 (B5, 3% sucrose, 20 mM MES, 3.3 mM L-Cysteine, 1.67 mg/L BA, 0.1 mM acetosyringone, 0.8% plant agar, pH 5.4)에 옮겼다. 5일간 공배양후에 자엽마디를 신초유도용 배

지 (B5, 3% sucrose, 3 mM MES, 1.67 mg/L BA, 250 mg/L cefotaxime, 50 mg/L vancomycin, 0.8% plant agar, phosphinothricin, pH 5.7)에 옮겨 2주마다 계대배양을 하고 6주후 신초신장용 배지 (MS, 3% sucrose, 3 mM MES, 0.5 mg/L GA, 50 mg/L asparagine, 1 mg/L zeatin, 0.1 mg/L IAA, 250 mg/L cefotaxime, 50 mg/L vancomycin, 0.8% plant agar, phosphinothricin, pH 5.7)로 옮겨 계대배양 하였다. 재분화된 식물체는 발근용 배지 (MS, 3% sucrose, 1 mg/L NAA, 0.8% plant agar, pH 5.7)로 옮겨 뿌리를 발생시키고 이후 토양에서 순화시킨 식물체를 온실로 옮겨 재배하였다.

### GUS 발현 조사

자엽 마디와 아그로박테리움을 5일간 공배양 후 Jefferson 등 (1987)의 방법을 이용하여 GUS발색 반응을 수행하였다. 아그로박테리움과 공배양한 자엽마디를 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indole-glucuronidase (X-gluc) 용액에 침지하여 37°C에서 16시간 이상 반응시킨 후, 70% 알코올로 탈색시켜 GUS의 발색 여부와 정도를 관찰하였다.

### PCR 및 Southern 분석

선발된 식물체에서 유전자의 삽입여부를 확인하기 위하여 제초제 저항성 유전자 (*bar*)에 대한 PCR 분석을 실시하였다. *bar*의 5'과 3'을 인지하는 한 쌍의 primer를 제작하여 (bar-F : 5'-GCT GAA GTC CAG CTG CCA GAA ACC C-3, bar-R : 5'-AAC CAC TAC ATC GAG ACA AGC ACG GTC A-3') 400bp 크기의 밴드가 증폭되도록 하였다. 35S 프로모터는 35S-F: 5'-GAG GAC CTA ACA GAA CTC GCC GTA AAC-3', 35S-R: 5'-GTC CCC CGT GTT CTC TCC AAA TG-3'로 하여 515bp가 증폭되도록 하였다. GUS 프로모터는 GUS-F: 5'-GTG CAC GAC CAC GCA TTA ATG GAC T-3', GUS-R: 5'-AAA TCG CCG CTT TGG ACA TAC CAT C-3'로 하여 500 bp가 증폭되도록 하였다. PCR조건은 premix (Accupower<sup>®</sup>, Bioneer) 제조사의 프로토콜을 이용하였다. 전체 PCR반응양은 20 µl로 하였으며 95°C에서 1회 5분간 pre-denaturation 후 94°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 elongation하여 30회 반응시켰으며 72°C에서 최종 10분간 post-elongation시켰다. 증폭된 DNA는 0.8% agarose gel로 전기영동 후 band를 확인하였다. 온실에서 생육중인 콩의 어린잎을 이용하여 genomic DNA를 분리하였

으며 분리한 DNA (20 ug)를 *EcoRI* 제한효소로 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동 하였다. Agarose gel상의 DNA를 Zeta-Probe<sup>R</sup> Blotting Membranes (BIO-RAD)에 전이시켜 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP로 표지된 *bar* probe를 이용하여 Southern blot을 실시하였다 (Sambrook 2001).

### 결과 및 고찰

#### 배양 절편체의 재분화 검정

Meurer 등 (1998)은 콩의 형질전환에 영향을 미치는 여러 요인들 중에서 형질전환에 적합한 품종을 선발하여 이용하는 것이 중요하다고 보고하였으며, 현재까지의 보고에 의하면 'Jack' (Stewart et al. 1996), 'Bert' (Olhofs et al. 2003), 'Williams 82' (Paz et al. 2005) 등의 품종을 이용하여 형질전환에 성공한 예가 있었다. 따라서 본 실험에서도 형질전환에 앞서 아그로박테리움을 이용한 형질전환에 가장 적합한 품종을 찾고자 국내외의 28개 재배품종들을 수집하였으며, 이들 품종에 대하여 콩의 자엽마디를 이용한 아그로박테리움 형질전환에 대한 재분화 효율을 조사하였다 (Table 1). 한 품종당 100개 이상의 종자를 사용하여 재분화율을 조사하였으며, 재배품종에 따라 식물체 재분화율은 10~50%로 다양한 차이를 나타내었는데 'Peking' 품종의 경우에는 식물체 재분화율이 60%에 이를 정도로 식물체 재분화가 잘 이루어졌다. 또한 GUS발색 반응을 통해 *gus* 유전자의 도입여부를 확인한 결과, 식물체 재분화율이 높은 품종에서 *gus* 유전자의 발현도 높게 나타났지만 종실크기에 따른 재분화율 및 GUS 발현의 차이는 나타나지 않았다. 이는 품종에 따른 최적의 형질전환 조건이 다를 수 있음을 시사하며, 효율적인 콩의 형질전환을 위해서는 재분화율이 높은 품종을 이용함으로써 안정적인 형질전환 체계를 갖출 수 있을 것으로 생각된다. 또한, Rie와 Ko (1990)가 벼에서 외부유전자의 발현과 관련하여 *gus* 유전자가 선발마커로 효과적임을 보고한 것과 같이 콩의 형질전환에 있어서도 GUS발색 반응이 형질전환 조건을 찾기 위한 마커로 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 식물체 재분화율과 GUS발색 반응을 종합적으로 검토한 결과 국내품종으로는 '단백콩'과 '은하콩'이, 외국품종으로는 'Jack'과 'Peking'이 재분화율도 높고, *gus* 유전자의 발현율도 강하게 발현되므로 형질전환에 적합한 품종으로 여겨지며 따라서 이 품종들을 이용하여 제초제 저항성 유전자를 도입하기로 하였다.

**Table 1.** Effect of soybean cultivar on plant regeneration and GUS expression

Grain type	Cultivar	Plant regeneration (%)	GUS expression <sup>a</sup>
Big grain (16)	Baekunkong	10	*
	Jangmikong	10	*
	Jinpumkong	10	*
	Jinpumkong 2	10	*
	Saeolkong	10	*
	Sodamkong	10	*
	Daewonkong	20	*
	Taekwangkong	20	*
	Jangbackkong	30	*
	Muhankong	30	**
	Sinpaldalkong 2	30	**
	Hwangkeumkong	40	*
	Jangsukong	40	**
Manrikong	40	***	
Danbaekkong	50	***	
Jack	50	***	
Small grain (5)	Eunhakong	40	***
	Myunjunamulkong	40	***
	Somyeongkong	40	**
	Kwangankong	50	**
Colored grain (7)	Sowonkong	50	*
	Jinyulkong	0	*
	Geomjungkong 1	10	*
	Geomjeongkong 2	10	*
	Seonheukkong	10	*
	Tawonkong	10	*
	Pureunkong	40	**
Peking	60	***	

<sup>a</sup>\*= 0~2 GUS<sup>+</sup> spot on explant, \*\*=3~5 spot on the cotyledonary node region, \*\*\*=more than 6 spot on the cotyledonary node region

#### 식물체 형질전환

형질전환체를 육성하기 위하여 콩의 자엽마디에 pCAM BIA3301로 형질전환한 아그로박테리움 EHA105와 KYRT1을 공배양한 결과 병원성이 강한 KYRT1을 이용하였을 때 콩의 자엽마디에서 보다 많은 GUS spot을 확인하였으며, 따라서 KYRT1이 외래 유전자의 전달효율이 더 높은 것으로 판단되었다. 하지만 공배양 후 아그로박테리움의 제거가 어려워 자엽마디 주위에 아그로박테리움이 계속적으로 증식함에 따라 콩의 자엽마디에서 신초를 형성하지 못하거나, 신초를 형성하더라도 아그로박테리움으로 인하여 곧 고사하고 말았다 (자료 미제시). 이러한 결과는 콩의 형질전환에서 KYRT1과 EHA105균주를 비교 실험한 Meurer 등 (1998)의 보고와 일치하였으며, EHA105를 이용한 다른 실험의 결

과에서도 비슷한 결과를 얻었다 (Trick and Finer 1997, 1998; Yan et al. 2000). 아그로박테리움의 과도한 증식은 식물체의 생장 및 형질전환체의 선발에 이롭지 못한 결과를 초래한다는 보고 (Ko et al. 2003)를 참조하여 콩의 형질전환에 이용하기에는 EHA105균주가 적절함을 확인하였다.

아그로박테리움과 공배양한 자엽마디를 1 mM X-gluc용액에 침지하여 유전자의 도입여부와 발현정도를 GUS발색 반응으로 확인하였다. 유전자가 도입되어 발현된 부분은 푸른색의 점 모양을 나타낸 반면 유전자가 도입되지 않은 부분은 변색되지 않음을 확인할 수 있었다. 공배양한 자엽마디를 선발배지에 치상하고 1주후부터 자엽마디의 부위에서는 작은 돌기들이 형성되면서 새로운 신초를 유기하였다. 이들을 계대배양하면 신초 주변의 세포들이 급속히 분열하면서 여러 개의 신초들을 형성하였으며, 2차 계대배양 후부터는 phosphinothricin에 저항성을 나타내는 신초는 녹색을 유지하며 계속적으로 자라기 시작하였지만 형질전환이 제대로 이루어지지 않아 제초제 저항성을 갖지 못한 절편체는 갈변되기 시작하여 결국에는 고사하였다. 이는 Cho 등 (2004)이 보고한 것처럼 형질전환이 일어나지 않은 절편체는 배지 내의 phosphinothricin을 흡수하여 암모니아 축적으로 괴사현상을 나타내지만 형질전환된 절편체는 phosphinothricin acetyl transferase를 합성하여 저항성을 갖게 된 현상으로 보이며, 이는 T-DNA의 제초제 저항성 유전자가 올바르게 식물체로 전달되어 발현하고 있음을 알 수 있었다. 또한 형질전환체를 선발하기 위해 phosphinothricin의 농도는 기존의 보고를 참조하여 5, 8, 10 mg/L로 배지내에 첨가하여 사용해 보았는데, 8mg/L 이상의 농도를 첨가하였을 때에는 콩의 절편체가 모두 갈변하거나 신초가 발달하지 못하는 등 생육이 눈에 띄게 저하되는 피해를 보였으며 반면에 5 mg/L 이하의 농도에서는 pseudo 식물체의 발생이 많아 적절한 선발을 할 수 없었다. 따라서 'Jack' 품종을 이용한 콩의 형질전환시 효과적인 선발 농도는 5 mg/L로 생각되며 이는 Zhang 등 (1999)의 결과와 일치하였다. 선발농도와 관련하여 'Williams 82' 품종을 이용한 형질전환시에 phosphinothricin의 농도는 6 mg/L와 8 mg/L를 이용하였는데 (Paz et al. 2005; Zeng et al. 2004), 이는 이용한 품종 및 실험조건에 의해 다른 결과가 나타날 수 있음을 시사한다. 본 실험결과 콩 형질전환시 재배품종에 따른 형질전환율에 상당한 차이를 보였다. 비록 형질전환율 (0.6~3.0%)은 높지 않았지만 실험에 이용된 콩 품종 모두에서 GUS발색 반응이 나타나는 식물체를 획득할

수 있었다. 이는 형질전환에 적합한 콩 품종을 선발하여 이용한 결과로 생각되어지며 절편체 수를 늘려 형질전환에 이용하면 보다 많은 형질전환체를 확보할 수 있을 것으로 기대된다 (Table 2). GUS 발색 반응을 나타내어 T-DNA의 전달이 식물체로 전달된 것으로 여겨지는 형질전환체에 0.3% 제초제 (Basta<sup>®</sup>)를 면봉을 이용하여 잎에 묻혀 제초제 저항성을 확인하고, 후에 식물체 전면에 0.3% 제초제를 살포한 결과 'Jack' 품종에서만 2개 (0.8%)의 제초제 저항성 식물체를 확보할 수 있었으며 나머지 모든 개체들은 제초제에 저항성을 나타내지 못하고 대조구와 마찬가지로 고사하였다 (Figure 1). 앞선 재분화율 검정에서 보인 높은 재분화율과는 달리 재배품종에 따라 현저하게 낮은 형질전환율을 보이고 있으므로, 향후 재현성 있는 콩의 형질전환 체계를 위해서

Table 2. Summary of four soybean cultivars following transformation with *Agrobacterium* EHA105

Cultivars	No. of explants	No. of GUS <sup>+</sup> plants	No. of HR <sup>a</sup> plants	Transformation efficiency
Eunhakong	180	4 (2.2%)	0	-
Danbaekkong	135	4 (3.0%)	0	-
Jack	252	3 (1.2%)	2	0.8%
Peking	154	1 (0.6%)	0	-
Total	721	12 (1.7%)	2	0.3%

<sup>a</sup> Herbicide tolerant, survival plants after 0.3% Basta<sup>®</sup> treatment

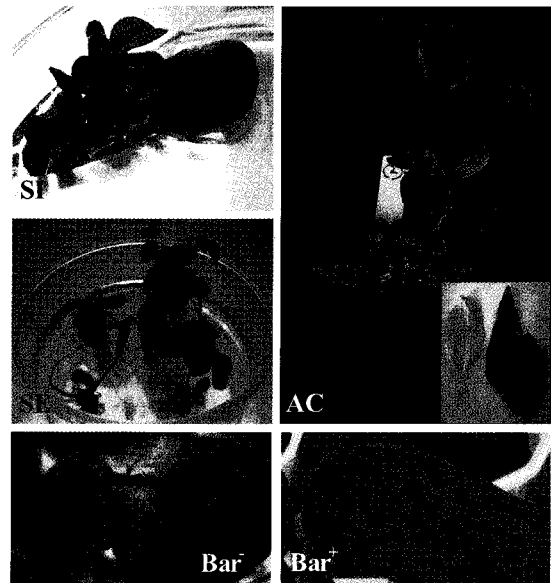


Figure 1. Shoot induction and plant regeneration from cotyledonary node explants of soybean transformed with *Agrobacterium* harboring pCAMBIA3301 vector. (SI) shoot induction; (SE) shoot elongation; (AC) acclimated plant.

는 최적의 콩 품종을 선발하는 것 외에도 적절한 벡터 및 아그로박테리움의 종류, 공배양 조건의 확립, 재분화체계 등이 반드시 극복되어야 할 것으로 생각된다.

분자생물학적 분석

GUS발색 반응은 나타났지만 0.3% 제초제 살포후 고사한 ‘은하콩’, ‘단백콩’, ‘Peking’ 등 9개의 형질전환체를 제외하고 ‘Jack’ 품종에서 GUS 발색 반응으로 확보한 3개의 형질전환체에 대해 도입유전자를 확인하기 위해서 PCR분석을 수행한 결과 St-1, St-2, St-3 각각에서 CaMV 35S 프로모터와 *gus*유전자가 삽입되어 있는 것을 확인하였다 (Figure 2). 하지만 *bar* primer를 사용하여 PCR분석을 하였을 때에는 St-1 형질전환체에서는 증폭된 band를 확인할 수 없었으며, 이는 T-DNA가 온전히 식물체에 도입되지 못하고 *gus* 유전자 부분만 삽입되었거나 또는 온전히 삽입되었더라도 재분화 과정에서 제초제 저항성 유전자가 소실된 것으로 생각되며, 이로 인해 0.3% 제초제를 처리하였을 때 대조구와 마찬가지로 제초제 저항성을 나타내지 못하고 고사한 것으로 여겨진다. 보다 효율적인 형질전환 체계를 완성하기 위해서는 앞으로 유전자의 안정적인 도입 및 발현과 관련하여 더욱 깊은 연구가 필요할 것으로 생각된다. 0.3% 제초제에 저항성을 나타내는 2개의 형질전환체를 Southern blot 분석을 한 결과 St-2 형질전환체에서 유전자가 3 copy로 도입되었음을 밴드로 확인하였으나 St-3의 경우에는 GUS발색 반응과 PCR을 통해서 유전자의 도입을 확인하였음에도 Southern blot에서는 밴드를 확인할 수 없었다 (Figure 3). 이는 형질전환체가 chimeric plant이었기 때문인 것으로 생각되며 좀더 안정적이며 국내품종도 형질전환이 가능하도록 형질전환 체계의 개선이 필요하다. 현재는 최종적으로 확인된 St-2 형질전환체

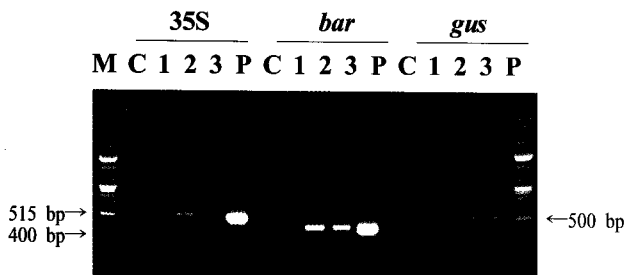


Figure 2. Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products of the 35S promoter, *bar* gene and *gus* gene in transgenic soybean. Lane M: size marker; C: non-transformed plant, Lane 1, 2, 3: transformed plants.

로부터 후대 종자를 획득하여 다음 세대로 제초제 저항성이 안정적으로 유전되고 있는지를 확인중이다. 본 실험 수행결과 형질전환 콩을 개발하기 위한 적합한 조건을 확립하였으며, 이를 통해 제초제 저항성 유전자가 삽입되어 발현하는 형질전환 콩을 개발하였고, GUS발색 반응 및 분자생물학적 기술을 이용하여 검증하였다. 향후 이러한 형질전환 체계를 이용하면 제초제 저항성 유전자 외에도 다른 유용유전자가 도입된 유전자변형 콩을 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 농업생명공학연구원(과제번호: 04-5-12-5-1) 지원에 의해 수행되었습니다.

적 요

본 실험은 콩 [*Glycine max* (L.) Merrill]의 자엽마디를 이용하여 효율적인 형질전환 시스템을 확립하고 그 방법을 통해 제초제 저항성 콩을 개발하기 위하여 수행되었다. 형질전환에 적합한 콩을 찾기 위하여 여러 가지 재배품종을 대상으로 재분화율을 조사한 결과 국내품종은 단백콩과 은하콩이 국외 품종은 ‘Jack’과 ‘Peking’이 높은 재분화율을 나타내 콩의 형

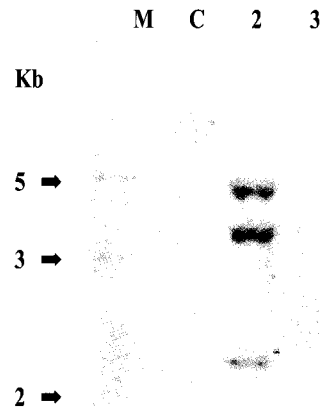


Figure 3. Southern analyses of T<sub>0</sub> plants. Soybean plants were transformed with the *A. tumefaciens* EHA105 with the binary plasmid, pCAMBIA3301. DNA was extracted from T<sub>0</sub> plants and digested with *EcoRI*, such that hybridizations with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP-labeled PAT (*bar*) probes would produce unique fragments for integrated T-DNA. Lane M: size marker; C: non-transformed plant, Lane 2, 3: transformed plants.

질 전환에 적합한 품종으로 선발하였다. 콩의 자엽마디에 제초제 저항성 유전자 (*bar*)를 포함하고 있는 pCAMBIA3301 벡터로 형질전환한 아그로박테리움 (KYRT1, EHA105)을 접종하여 형질전환하였다. 콩의 자엽마디와 아그로박테리움을 공배양한 후 GUS발색 반응을 통해 절편체로의 T-DNA 도입율은 최대 60%에 이르렀으나 형질전환율은 콩의 품종과 아그로박테리움의 종류에 따라 현저한 차이를 보였으며, 그 중에서 Jack품종의 자엽마디를 아그로박테리움 EHA105를 이용하여 형질전환하였을 때에 가장 높은 3%의 형질전환율을 나타내었다. 순화된 형질전환체 중 GUS발색 반응에서 양성반응을 보이는 식물체들을 PCR을 이용하여 검정하였으며, 제초제 (Basta®)살포와 Southern분석을 통해 제초제 저항성 유전자가 도입되어 발현되는 형질전환체를 확인하였다. 현재 후대로의 유전양상과 도입된 유전자가 안정적으로 발현하는지의 여부를 실험중이다.

## 인용문헌

- Cho JY (2001) Dry field farming. Hyangmunsa, Seoul
- Cho MA, Choi DW, Liu JR, Clement T, Choi PS (2004) Development of transgenic soybean using *Agrobacterium tumefaciens*. Kor J Plant Biotechnol 31: 255-259
- Donaldson PA, Simmonds DH (2000) Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. Plant Cell Rep 19: 478-484
- 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. Bio/Technol 6: 915-922
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6: 3901-3907
- Ko TS, Lee SM, Krasnyanski S, Korban SS (2003) Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. Theor Appl Genet 107: 439-447
- Meurer CA, Dinkins RD, Collins GB (1998) Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. Plant Cell Rep 18: 180-186
- Olhoft PM, Somers DA (2001) L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. Plant Cell Rep 20: 706-711
- 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
- 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
- Rie T, Ko S (1990) Expression of CaMV35S-GUS gene in transgenic rice plants. Mole. Genetics Genomics 220: 389-392
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sandermann H (2006) Plant biotechnology: ecological case on herbicide resistance. Trends in Plant Science 11: 324-328
- Santarem 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
- Stewart CN, Adang MJ, All JN, Boerma HR, Cardineau G, Tucker D, Parrott WA (1996) Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene. Plant Physiol 112: 121-129
- Torisky RS, Kovacs L, Avdiushko S, Newman JD, Hunt AG, Collins GB (1997) Development of a binary vector system for plant transformation based on the supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain Chry 5. Plant Cell Rep 17: 102-108
- Trick HN, Finer JJ (1997) SAAT: Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. Transgenic Res 6: 329-337
- Trick HN, Finer JJ (1998) Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. Plant Cell Rep 17: 482-488
- Yan B, Reddy MSS, Collins GB, Dinkins RD (2000) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] using immature zygotic cotyledon explants. Plant Cell Rep 19: 1090-1097
- Zeng P, Vadnais DA, Zhang Z, Polacco JC (2004) Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. Plant Cell Rep 22: 478-482

(접수일자 2007년 10월 31일, 수리일자 2007년 12월 7일)