(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0031463
(43) 공개일자 2013년03월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01) *C12N 15/29* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0095049
(22) 출원일자 2011년09월21일
심사청구일자 2012년09월14일

(71) 출원인
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
이병현
경상남도 진주시 금산면 중천로 82, 111동 1401호 (금산아이파크)
권석윤
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동, 한국생명공학연구원)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

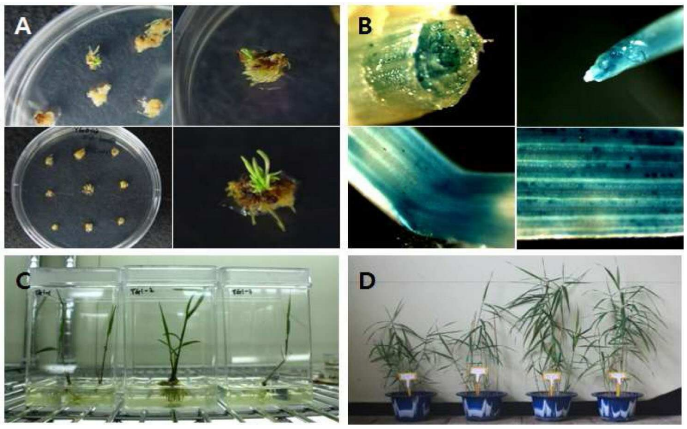
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **형질전환 갈대 식물체의 제조 방법 및 그에 따른 식물체**

(57) 요 약

본 발명은 (a) 종피가 제거된 갈대 성숙 종자를 캘러스 유도 배지에 치상하여 갈대 캘러스를 유도하는 단계; (b) 상기 유도된 갈대 캘러스와 외래 유전자가 삽입된 식물 발현 벡터를 포함하는 아그로박테리움 튜머파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)를 공동배양 배지에서 공동배양하여 형질전환시키는 단계; (c) 상기 공동배양한 식물세포를 항생제가 첨가된 선발 배지에서 선발하는 단계; 및 (d) 상기 선발된 갈대 세포를 재분화 배지에서 재분화하는 단계를 포함하는 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 형질전환 갈대 식물체 및 이의 종자에 관한 것이다.

대 표 도 - 도6



(72) 발명자

손정훈

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동, 한국생명공학연구원)

김용구

경상남도 창원시 외동 한일유앤아이 507호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	KGM0531113
부처명	교육과학기술부
연구사업명	주요사업(연구개발과제)
연구과제명	저탄소 녹색성장을 위한 바이오매스/에너지 개발
주관기관	한국생명공학연구원
연구기간	2011.01.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 종피가 제거된 갈대 성숙 종자를 캘러스 유도 배지에 치상하여 갈대 캘러스를 유도하는 단계;

(b) 상기 유도된 갈대 캘러스와 외래 유전자가 삽입된 식물 발현 벡터를 포함하는 아그로박테리움 튜머파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)를 공동배양 배지에서 공동배양하여 형질전환시키는 단계;

(c) 상기 공동배양한 식물세포를 항생제가 첨가된 선발 배지에서 선발하는 단계; 및

(d) 상기 선발된 갈대 세포를 재분화 배지에서 재분화하는 단계를 포함하는 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a)의 캘러스 유도 배지는 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 단독 또는 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 및 BA (6-benzyladenine)가 함께 첨가된 MS 배지인 것을 특징으로 하는 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 (a)의 캘러스 유도 배지는 0.5~3 mg/L 2,4-D 단독 또는 0.5~3 mg/L 2,4-D 및 0.3~0.5 mg/L BA가 함께 첨가된 MS 배지인 것을 특징으로 하는 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (b)의 공동배양은 200 ~ 300㎛M AS (acetosyringone)이 첨가된 공동배양 배지에서 2 ~ 5일간 공동배양시켜 이루어지는 것을 특징으로 하는 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (b)의 아그로박테리움 균주는 아그로박테리움 튜머파시엔스 EHA105 균주인 것을 특징으로 하는 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (d)의 재분화 배지는 디캄바 (dicamba)가 포함된 배지인 것을 특징으로 하는 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 (d)의 재분화 배지는 0.5 ~ 2 mg/L 디캄바 (dicamba)가 포함된 배지인 것을 특징으로 하는 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법.

청구항 8

(a) 종피가 제거된 갈대 성숙 종자를 0.5~3 mg/L 2,4-D 단독 또는 0.5~3 mg/L 2,4-D 및 0.3~0.5 mg/L BA가 함께 첨가된 MS 배지에 치상하여 갈대 캘러스를 유도하는 단계;

(b) 상기 유도된 갈대 캘러스와 외래 유전자가 삽입된 식물 발현 벡터를 포함하는 아그로박테리움 튜머파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)를 200 ~ 300㎛M AS (acetosyringone)이 첨가된 공동배양 배지에서 2 ~ 5일간 공동배양하여 형질전환시키는 단계;

(c) 상기 공동배양한 식물세포를 항생제가 첨가된 선발 배지에서 선발하는 단계; 및

(d) 상기 선발된 갈대 세포를 0.5 ~ 2 mg/L 디캄바 (dicamba)가 포함된 배지에서 재분화하는 단계를 포함하는 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 형질전환 갈대 식물체.

청구항 10

제9항에 따른 식물체의 종자.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법 및 그에 따른 식물체에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 (a) 종피가 제거된 갈대 성숙 종자를 캘러스 유도 배지에 치상하여 갈대 캘러스를 유도하는 단계; (b) 상기 유도된 갈대 캘러스와 외래 유전자가 삽입된 식물 발현 벡터를 포함하는 아그로박테리움 튜머파시엔스 (Agrobacterium tumefaciens)를 공동배양 배지에서 공동배양하여 형질전환시키는 단계; (c) 상기 공동배양한 식물세포를 항생제가 첨가된 선발 배지에서 선발하는 단계; 및 (d) 상기 선발된 갈대 세포를 재분화 배지에서 재분화하는 단계를 포함하는 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 형질전환 갈대 식물체 및 이의 종자에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 전 세계적으로 화석연료의 과다 사용에 따른 자원 고갈 및 환경오염에 대한 우려가 증가함에 따라 자연과 공존하며 안정적이고 지속적으로 에너지를 생산하는 신재생 대체에너지 개념이 화두가 되고 있다. 특히 선진국을 중심으로 환경오염 및 온난화 문제 해결을 위해 화석연료의 사용에 대한 규제를 강화하고 환경 친화적인 신재생 에너지의 보급을 확산하려는 정책이 입안되고 있다 (한성옥 2007. Biochemistry and Molecular Biology News. 8-16). 이런 가운데 지구상에서 가장 풍부하고 고갈 없이 재생이 가능한 식물자원으로 비식용 화본과 작물인 갈대나 억새를 이용하여 바이오 에너지 생산의 원료로 사용하기 위하여 유전자 형질전환에 의한 신품종 갈대의 개발이 필요하다.

[0003] 갈대는 외떡잎식물 화본목 화본과의 여러해살이풀이며 서식장소는 주로 습지나 갯가, 호수 주변모래땅에서 서식한다 (Mckee J and Richards AJ 1996. *New Physiol.* 133: 233-243). 분포지역으로는 북반구 온대에서부터 아한대에 이르기까지 널리 분포되어 자라고 높이는 1~5 m쯤 되며 군락을 이루어 자란다. 원줄기는 속이 비어 있고 마디에 털이 있는 것도 있으며 곧고 단단하여 각종 세공용이나 건축용 기구로 쓰인다. 갈대는 중금속이나 카드뮴 등에 의해 오염된 수질을 정화시켜주는 작용을 한다. 또한 갈대는 국내 조사료 자급율을 높이는 데 있어서 큰 잠재성을 가지고 있다. 비료나 농약 등이 필요없어 생산비용이 저렴하며, 지하경을 통한 영양번식이 활발하고 키가 크게는 3 m 이상 자라기 때문에 수량성이 매우 높다. 이러한 장점으로 인해 갈대는 조사료 자원으로서 뿐만 아니라, 바이오에탄올 생산을 위한 원료작물로 활용하는 연구도 활발히 이루어지고 있다. 갈대는 섬유질 에탄올원료로서 당질, 전분질 원료와 달리 인류식량과 비경쟁적이기 때문에 윤리적인 문제가 나타나지 않으며 바이오에탄올로의 사용으로 지구온난화문제 해결에 큰 도움이 될 것이다. 하지만, 갈대의 높은 리그닌 함량은 바이오에탄올로의 전환효율을 감소시켜 실용화에 제약이 되며, 조사료로서 세포벽 소화효율을 감소시킨다. 따라서 갈대의 조사료 건물소화효율을 높이고 바이오에탄올로의 당화공정 효율을 높이기 위해서는 리그닌 함량을 줄인 신품종 갈대 개발이 절실하다. 저 리그닌 신품종 갈대가 개발되면 소화효율 증가로 가축생산성이 증가되고 에탄올 당화효율도 증대되어 산업적 가치도 극대화할 수 있을 것이다.

[0004] 작물의 육종에는 크게 전통육종법과 분자육종법 2가지로 나누어 볼 수 있다. 전통육종법은 신품종 개발에 있어서 넓은 경작시설이 필요하고 오랜 기간이 소요되며 '종'간의 교잡에 의해서만 육종이 이루어지는 등 많은 제약이 따른다. 하지만 분자육종은 짧은 기간 내에 실험실 규모에서 신품종 개발이 가능하고 특정 유전형질을 다른 종으로 전이시킬 수 있어서 전통육종의 한계를 극복할 수 있다. 그래서 저 리그닌 신품종 갈대 개발에 분자육종은 필수적이라 하겠다.

[0005] 이러한 분자육종법을 통해 저 리그닌 신품종 갈대를 개발하기 위해서는 2가지 체계의 확립이 필수적이다. 첫 번째는 안정적인 캘러스 유도와 식물체 재분화를 위한 효율적인 갈대 조직배양 체계 확립이다. 지금까지 갈대의 재분화에 관한 연구는 Poonamala 등(1999. Plant cell reports. 18: 696-700)이 세 종류의 갈대에서 미세번식에 미치는 생장물질의 영향에 관해 보고하였고, 그 후 Lauzer 등(2000. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60: 229-234)이 갈대의 체세포 배 분화에 대한 연구보고가 있다. 화본과 작물의 식물체 재분화는 유전적 요인이나 배양조건에 따라 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있으며, 그 중에서도 특히 식물생장조절물질의 종류와 농

도 등의 조합이 가장 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다 (George et al. 1987 Plant Cell, Tissue and Organ Culture 30(4): 171-179). 그러나 갈대의 조직배양에 대한 연구보고는 많지 않다. 따라서 성숙종자를 이용한 고효율 조직배양체계를 확립하는 것이 필요하다.

[0006] 두 번째는 효율적인 형질전환 체계를 확립하는 것이다. 지금까지 갈대는 조직배양체계에 대한 연구는 진행되었으나 형질전환에 대한 사례는 보고되지 않고 있다. 따라서 본 연구에서도 식물형질전환기법 중에서 가장 안정적인 방법 중에 하나인 아그로박테리움 매개의 갈대의 형질전환체계를 확립하고자 하였다.

[0007] 한국특허공개 제10-2010-0034090호에는 억새 성숙종자로부터 배발생 캘러스 유도 및 식물체 재분화 방법이 기재되어 있고, 한국특허등록 제10-0458138호에는 한국형 잔디의 유전적 형질전환 방법이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 형질전환 자체가 매우 어려워서 미성숙 배(immature embryo)를 주로 이용하는 기존의 갈대 형질전환기법 대신 연중 어느 때나 이용할 수 있는 종피가 제거된 갈대 성숙종자로부터 특정 캘러스 유도 배지에서 배발생 캘러스를 유도하고, 특정 아그로박테리아를 이용하여 형질전환하여 특정 재분화 배지를 이용하여 재분화시킨 형질전환 신품종 갈대를 제조하는 기술을 확립함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은

[0010] (a) 종피가 제거된 갈대 성숙 종자를 캘러스 유도 배지에 치상하여 갈대 캘러스를 유도하는 단계;

[0011] (b) 상기 유도된 갈대 캘러스와 외래 유전자가 삽입된 식물 발현 벡터를 포함하는 아그로박테리움 튜머파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)를 공동배양 배지에서 공동배양하여 형질전환시키는 단계;

[0012] (c) 상기 공동배양한 식물세포를 항생제가 첨가된 선발 배지에서 선발하는 단계; 및

[0013] (d) 상기 선발된 갈대 세포를 재분화 배지에서 재분화하는 단계를 포함하는 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 형질전환 갈대 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명을 통하여, 연중 어느 때나 이용할 수 있는 성숙종자로부터 배발생 캘러스를 이용하여 형질전환 갈대를 제조하는 기술을 확립함으로써 계절의 영향을 받지 않고 연중 형질전환체를 제조할 수 있게 되었다. 따라서, 본 발명은 유용유전자 도입을 통한 가축 사료용, 바이오에너지용 신품종 갈대 개발에 매우 유용한 방법이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 갈대 성숙 종자로부터 유도된 캘러스의 식물 재분화 (plant regeneration)를 나타낸다. (A) 갈대 성숙 종자, (B) 성숙 종자로부터 유도된 캘러스를 캘러스 유도 배지에서 배양함, (C) 종자로부터 형성된 배발생 캘러스, (D) 신초의 발달은 재분화 배지에서 배양함, (E) 발근 배지에서 배양된 유식물체, (F) 포트에서 자란 식물체.

도 2는 발현 벡터의 T-DNA 영역의 구조를 나타낸다.

도 3은 형질전환된 캘러스 조직에서 GUS 발현을 나타낸다. 캘러스 조직은 3일 동안 공동배양 후 x-gluc로 염색하였다. 비형질전환 캘러스는 GUS 염색반응을 나타내지 않았다.

도 4는 갈대 형질전환 식물체에서 *hpt* 및 *gus* 유전자의 PCR 분석을 나타낸다. PCR 산물의 아가로스 겔 전기영동은 형질전환 식물체의 게놈 DNA로부터 증폭되었다.

도 5는 형질전환 식물체의 서던 블럿 분석을 나타낸다. 게놈 DNA (15 ㎍)는 *Hin*dⅢ로 절단되었고, 0.4-kb gus

프로브로 혼성화하였다. 레인 1, 비형질전환 대조구 식물체, 레인 2~4, 형질전환 식물체, Mw, 분자 마커.

도 6은 갈대의 형질전환 식물체의 제조를 나타낸다. (A) 형질전환 식물체의 선별, (B) 형질전환 식물체의 잎, 줄기 및 뿌리에서 GUS 조직화학적 분석, (C) 발근 배지에서 하이그로마이신 저항성 및 민감성 식물체(유식물체), (D) 온실의 포트에서 재배한 형질전환 식물체.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0018] (a) 종피가 제거된 갈대 성숙 종자를 캘러스 유도 배지에 치상하여 갈대 캘러스를 유도하는 단계;

[0019] (b) 상기 유도된 갈대 캘러스와 외래 유전자가 삽입된 식물 발현 벡터를 포함하는 아그로박테리움 튜머파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)를 공동배양 배지에서 공동배양하여 형질전환시키는 단계;

[0020] (c) 상기 공동배양한 식물세포를 항생제가 첨가된 선발 배지에서 선발하는 단계; 및

[0021] (d) 상기 선발된 갈대 세포를 재분화 배지에서 재분화하는 단계를 포함하는 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 따른 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법에서, 갈대 시료는 기존에 주로 이용되었던 미성숙 배 (immature embryo) 대신 연중 어느 때나 이용할 수 있는 종피가 제거된 갈대 성숙종자를 이용할 수 있다.

[0023] 본 발명의 일 구현예에 따른 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법에서, 상기 (a)의 캘러스 유도 배지는 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 단독으로 첨가된 MS 배지 또는 2,4-D 및 BA (6-benzyladenine)가 함께 첨가된 MS 배지일 수 있으며, 바람직하게는 0.5 ~ 3 mg/L 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 단독으로 첨가된 MS 배지 또는 0.5 ~ 3 mg/L 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 및 0.3 ~ 0.5 mg/L BA (6-benzyladenine)가 함께 첨가된 MS 배지일 수 있으며, 가장 바람직하게는 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 배지 또는 1 mg/L 2,4-D 및 0.5 mg/L BA가 첨가된 MS 배지일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명의 일 구현예에 따른 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법에서, 상기 외래 유전자가 삽입된 식물 발현 벡터는 외래 유전자를 도입한 식물체 내에서 일시적으로 발현시킬 수 있는 일시적 (transient) 발현 벡터 및 외래 유전자를 도입된 식물체에서 영구적으로 발현시킬 수 있는 식물 발현 벡터로 사용할 수 있다.

[0025] 본 발명에 이용될 수 있는 바이너리 벡터는 *A. tumefaciens*의 Ti 플라스미드와 함께 존재 시 식물체를 형질전환시킬 수 있는 T-DNA의 RB (right border)과 LB (left border)을 함유하는 어떤 바이너리 벡터도 될 수 있으나, 바람직하게는 당업계에서 자주 사용되는 pBI101(Cat#: 6018-1, Clontech, 미국), pBIN19(Genbank 수탁번호 U09365), pBI121, pCAMBIA 벡터 등을 사용하는 것이 좋다.

[0026] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(바이너리) 벡터이다. 본 발명에 따른 유전자를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환 하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[0027] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함한다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스피노트리신과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신, G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물 발현 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및

발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[0029] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물 발현 벡터에서, 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명의 일 구현예에 따른 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법에서, 상기 (b)의 공동배양은 200 ~ 300μM AS (acetosyringone)이 첨가된 공동배양 배지에서 2 ~ 5일간 공동배양시킬 수 있으며, 바람직하게는 200μM AS이 첨가된 공동배양 배지에서 3일간 공동배양시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 본 발명의 일 구현예에 따른 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법에서, 상기 (b)의 아그로박테리움 균주는 아그로박테리움 튜머파시엔스 EHA105, 아그로박테리움 튜머파시엔스 LBA4404 또는 아그로박테리움 튜머파시엔스 GV3101일 수 있고, 바람직하게는 아그로박테리움 튜머파시엔스 EHA105일 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 구현예에 따른 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법에서, 상기 (d)의 재분화는 0.5 ~ 2 mg/L 디캄바 (dicamba)가 포함된 배지일 수 있고, 바람직하게는 1 mg/L 디캄바가 포함된 배지일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 또한, 본 발명은

[0034] (a) 종피가 제거된 갈대 성숙 종자를 0.5~3 mg/L 2,4-D 단독 또는 0.5~3 mg/L 2,4-D 및 0.3~0.5 mg/L BA가 함께 첨가된 MS 배지에 치상하여 갈대 캘러스를 유도하는 단계;

[0035] (b) 상기 유도된 갈대 캘러스와 외래 유전자가 삽입된 식물 발현 벡터를 포함하는 아그로박테리움 튜머파시엔스 (Agrobacterium tumefaciens)를 200 ~ 300μM AS (acetosyringone)이 첨가된 공동배양 배지에서 2 ~ 5일간 공동배양하여 형질전환시키는 단계;

[0036] (c) 상기 공동배양한 식물세포를 항생제가 첨가된 선발 배지에서 선발하는 단계; 및

[0037] (d) 상기 선발된 갈대 세포를 0.5 ~ 2 mg/L 디캄바 (dicamba)가 포함된 배지에서 재분화하는 단계를 포함하는 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0038] 본 발명의 일 구현예에 따른 형질전환 갈대 식물체의 제조 방법은 가장 바람직하게는 (a) 종피가 제거된 갈대 성숙 종자를 1 mg/L 2,4-D 단독 또는 1 mg/L 2,4-D 및 0.5 mg/L BA가 함께 첨가된 MS 배지에 치상하여 갈대 캘러스를 유도하는 단계; (b) 상기 유도된 갈대 캘러스와 외래 유전자가 삽입된 식물 발현 벡터를 포함하는 아그로박테리움 튜머파시엔스 (Agrobacterium tumefaciens)를 200μM AS (acetosyringone)이 첨가된 공동배양 배지에서 3일간 공동배양하여 형질전환시키는 단계; (c) 상기 공동배양한 식물세포를 항생제가 첨가된 선발 배지에서 선발하는 단계; 및 (d) 상기 선발된 갈대 세포를 1 mg/L 디캄바 (dicamba)가 포함된 배지에서 재분화하는 단계를 포함할 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 형질전환 갈대 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

[0040] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] **실험방법**

[0042] **1. 식물재료 및 종자살균**

[0043] 조직배양을 위한 식물 재료로는 국내 자생종 갈대의 성숙종자를 사용하였다. 성숙종자의 종피는 50% H_2SO_4를 사용하여 제거하였다. 캘러스 유도를 위해 종자의 살균은 Lee 등 (Lee et al. 2004 *Asian-Aust J. Anim. Sci.* 17: 1390-1394)의 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 종피가 제거된 성숙종자를 70% 에탄올에서 1분간 표면살균하고 멸균수로 3회 세정한 후, 다시 30% (v/v) 차아염소산나트륨 용액을 첨가하여 30분간 교반하면서 표

면살균 하였다. 살균된 종자는 멸균수로 5회 이상 세정한 다음 멸균된 필터 페이퍼로 옮겨 물기를 제거한 후, 캘러스 유도배지에 치상하였다.

[0044] **2. 배발생 캘러스 유도**

[0045] 성숙종자로부터 캘러스를 유도하기 위한 기본적인 캘러스 유도배지는 Holme 등 (Holme IB and Petersen KK 1996 *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 45: 43-52)의 방법에 준하여 30 g/L 수크로스, 3 g/L 젤라이트가 함유된 MS 배지를 사용하였다 (Murashige T and Skoog F 1962 *Physiol Plant*. 15: 473-497). 캘러스 유도시의 식물생장 조절물질의 종류와 농도에 따른 배발생 캘러스 유도효율을 조사하기 위하여 상기의 캘러스 유도배지에 옥신류로 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 디캄바 (dicamba, 3,6-dichloro-o-anisic acid), NAA (a-naphthalene acetic acid)를 사용하였고, 시토키닌 (cytokinin) 류로 BA (6-benzyladenine), 키네틴 (N6-furfuryladenine)을 사용하였으며, 옥신 (auxin)과 시토키닌 (cytokinin)을 단용 또는 혼용 첨가한 배지를 사용하였다. 배지에 살균된 종자를 치상한 다음, 24±2℃의 생장실에서 약광 조건으로 4주간 배양하였다. 캘러스 형성능은 치상한 종자에 대한 유도된 캘러스의 수를 백분율로 나타내었고, 3회 반복으로 조사하여 비교하였다.

[0046] **3. 발현 벡터 및 형질전환**

[0047] 갈대의 형질전환 효율을 조사하기 위하여 pIG121Hm (Hiei et al., 1994 *Plant J*. 6: 271-282)을 발현 벡터로 이용하였으며, T-DNA 내부에 인트론을 포함하는 GUS 유전자 (β-glucuronidase), HPT (hygromycin phosphotransferase)와 NPTII (neomycin phosphotransferaseII) 유전자를 포함하고 있다 (도 2). 발현 벡터 pIG121Hm은 아그로박테리움 투머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 균주들 중 LBA4404, EHA105 및 GV3101에 도입하여 형질전환에 이용하였다. 각각의 아그로박테리움은 25 mg/L 하이그로마이신, 100 mg/L 카나마이신이 함유된 YEP 액체 배지에서 28℃로 24-36 시간 배양한 후, 3,600 rpm에서 10분간 원심분리하여 회수하였다. 회수된 아그로박테리움은 아그로박테리움 접종 배지 (MS 배지, 1 mg/L 디캄바, 30 g/L 수크로스)에 OD_{600}=1.0이 되도록 현탁한 다음, 배발생 캘러스를 크기 3-5 ㎜로 잘라 침지 시킨 후 감염된 캘러스를 공동배양 배지 (MS 배지, 1 mg/L 디캄바, 30 g/L 수크로스, 2 g/L 젤라이트)에 계대하여 25℃에서 암상태로 공동배양 하였다. 공동배양한 후 캘러스로부터 GUS 유전자 발현 정도를 조사하였다.

[0048] **4. 공동배양 기간에 따른 GUS 유전자의 발현조사**

[0049] 갈대의 종자 유래 캘러스에 아그로박테리움을 접종한 후 공동배양 기간에 따른 형질전환 효율을 조사하기 위하여 배발생 캘러스를 사용하였다. 아그로박테리움 균주 EHA105에 OD_{600}=1.0이 되도록 접종배지로 현탁하였으며, 접종배지와 공동배양 배지에는 200 μM 아세토시린곤 (AS)을 첨가하였다. 아그로박테리움 현탁배지에 캘러스를 3-5 ㎜로 잘라 30분간 침지시켜 감염시킨 다음, 감염시킨 캘러스를 공동배양배지에 치상한 후 25℃, 암조건에서 1, 3, 5 및 7일간 각각 공동배양하였다. 공동배양이 끝난 각각의 처리구의 캘러스로부터 GUS 유전자 발현정도를 조사하였다.

[0050] **5. 아세토시린곤 첨가에 따른 GUS 유전자의 발현조사**

[0051] 아세토시린곤 첨가 농도에 따른 형질전환 효율을 조사하기 위하여 아세토시린곤의 농도를 0, 100, 200, 300 μM로 각각 첨가한 접종배지와 공동배양 배지에서 각 처리구별로 감염시킨 캘러스를 26℃, 암조건에서 3일간 공동배양한 후 GUS 유전자의 발현 정도를 조사하였다.

[0052] **6. 아그로박테리움 균주에 따른 GUS 유전자의 발현조사**

[0053] pIG121Hm 발현 벡터를 아그로박테리움 균주 LBA4404, EHA105 및 GV3101에 각각 도입한 후, 상기와 동일한 방법으로 감염시킨 캘러스를 25℃, 암조건에서 3일간 공동배양한 후 캘러스로부터 GUS 유전자의 발현정도를 조사하였다.

[0054] **7. 하이그로마이신 적정 농도의 조사**

[0055] 형질전환된 캘러스 선발을 위한 최적의 하이그로마이신 농도를 결정하기 위하여 성숙종자로부터 유도된 캘러스를 0, 15, 25 및 50 mg/L 하이그로마이신이 첨가된 배지에 치상하여 6주 동안 배양한 후 그 생존율을 조사하였다.

[0056] **8. 식물체 재분화**

[0057] 성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체로 재분화시키기 위한 재분화 배지로는 Holme 등 (Holme IB and Petersen KK 1996 *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 45: 43-52)의 방법에 준하여 30 g/L 수크로스, 100 mg/L 미오-이노시톨, 3 g/L 젤라이트가 함유된 MS 배지를 사용하였다 (Murashige T and Skoog F 1962 *Physiol Plant*. 15: 473-497). 식물체 재분화를 위한 적정 식물생장 조절물질의 종류와 농도를 조사하기 위하여 4주령의 배발생 캘러스를 옥신류인 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 디캄바 (dicamba, 3,6-dichloro-o-anisic acid)와 시토키닌 (cytokinin) 류인 BA (6-benzyladenine), 키네틴 (N6-furfuryladenine)을 첨가한 재분화 배지에 옮겨 24℃, 16 h 명/8 h 암 조건에서 4주간 배양하였다. 배양 후 각각의 처리구에서 형성된 2 cm 이상으로 자란 신초를 재분화 개체로 조사하였다. 식물체 재분화 효율은 이식된 캘러스에 대한 식물체가 유도된 캘러스의 수를 백분율로 나타내었으며, 3회 반복으로 조사하여 비교하였다. 재분화된 신초는 1/2 MS배지에 이식하여 뿌리발생을 유도하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

[0058] **9. 형질전환체의 선발과 식물체 재분화**

[0059] 공동배양한 캘러스는 250 mg/L 세포탁심이 첨가된 공동배양 배지로 세정하여 아그로박테리움을 제균한 후 후-배양 배지 (MS 배지, 250 mg/L 세포탁심, 1 mg/L 디캄바, 100 mg/L 미오-이노시톨, 30 g/L 수크로스, 3 g/L 젤라이트)에 7일간 배양하였다. 공동배양과 후-배양이 끝난 캘러스는 하이그로마이신 항생제가 첨가된 선발배지 (MS 배지, 250 mg/L 세포탁심, 25 mg/L 하이그로마이신, 1 mg/L 디캄바, 100 mg/L 미오-이노시톨, 30 g/L 수크로스, 3 g/L 젤라이트)에서 3주간 배양하여 Hm (하이그로마이신) 내성을 보이는 캘러스만을 선발하여 다시 25 mg/L Hm이 첨가된 선발배지에 옮겨 4주간 배양하여 생존하는 캘러스로부터 식물체를 재분화 시켰다. 재분화된 식물체는 50 mg/L Hm이 첨가된 1/2 MS 배지가 들어있는 배양병에 옮겨준 후 4주간 배양하여 정상적으로 뿌리가 발육되고 생존하는 개체만을 선발하여 포트로 이식하여 온실에서 재배하였다.

[0060] **10. GUS 분석**

[0061] GUS 분석은 Jefferson의 방법 (Jefferson et al., 1987 *EMBO J.* 6: 3901-3907)에 준하여 실시하였다. 캘러스에 있어서 GUS 발현조사는 공동배양한 캘러스를 이용하였으며, 재분화된 식물형질전환체의 잎을 이용한 GUS 활성염색은 선발배지에서 재분화된 식물체의 잎, 줄기, 뿌리 조직을 재료로 이용하였다. 공동배양된 캘러스 또는 식물체의 조직을 GUS 반응용액 (1 mg/L 5-bromo-4-chloro-3-indoly-β-D-glucuronide, 1% triton X-100, 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide)에 37℃의 온도로 24시간 동안 반응시켜 GUS 활성 염색을 실시한 후 GUS 염색 부위를 관찰하였다.

[0062] **11. 게놈 DNA 분리**

[0063] 야생형 식물체와 형질전환 갈대 식물체 (T0)의 잎 조직으로부터 CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromide)를 이용한 Murray와 Thompson의 방법으로 게놈 DNA를 분리하였다 (Murray MG and Thompson WF 1980 *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325). 식물체의 잎 1.5 - 2 g을 액체 질소를 이용하여 파쇄한 다음, 6 ml의 2×CTAB 버퍼 (2% CTAB; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4M NaCl)를 넣고, 55℃의 항온 수조에서 20분간 정치시켰다. Chl/Iso (Chloroform/isoamylalcohol; 24:1; v/v)을 첨가하여 실온에서 20분간 교반한 후, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액을 Chl/Iso로 한번 더 추출한 다음 1/10 부피의 침전용 버퍼 (1% CTAB; 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)를 첨가하였다. 30분간 교반한 다음 3,600 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 회수하고 1 M NaCl-TE 버퍼 (1 M Nacl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)를 첨가하여

녹인 다음, 동량의 이소프로판올을 첨가하였다. 3,600 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 회수하여 70% 에탄올로 2회 세정하고, 실온에서 건조한 후 TE 버퍼 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM EDTA)에 녹여 PCR을 위한 주형 DNA로 사용하였다.

[0064] **12. PCR (Polymerase chain reaction) 분석**

[0065] PCR 분석을 위해 사용한 프라이머는 pIG121Hm 벡터의 GUS 유전자 염기서열을 기본으로 하여 센스 프라이머 5'-AATTGATCAGCGTTGGTGG-3' (서열번호 1)와 안티센스 프라이머 5'-GGTGTAGAGCATTACGCTGC-3' (서열번호 2)를 사용하였다. PCR을 위한 반응 혼합액 (10×PCR 버퍼 2.5 ㎕, 2.5 mM dNTP 혼합물 2 ㎕, 100 pmol 센스 프라이머 1 ㎕, 100 pmol 안티센스 프라이머 1 ㎕, 증류수 17.3 ㎕, Taq 중합효소 0.2 ㎕, DNA 주형 1 ㎕ : 총 25 ㎕)을 첨가한 후 95℃에서 1분간 전-변성 (pre-denature) 한 후 94℃에서 변성 30초, 52℃에서 어닐링 45초, 72℃에서 신장 1분 30초를 1 사이클로 하여 35 사이클 반복 후 72℃에서 10분간 후-신장시켰다. PCR 증폭 후 0.8% (w/v) 아가로스 젤을 사용하여 50 V에서 30분 동안 전기영동을 실시하여 UV transilluminator로 증폭산물을 확인하였다.

[0066] **13. 서던 블럿 분석**

[0067] 형질전환 식물체의 잎 조직으로부터 분리한 게놈 DNA를 *Hin*dIII, *Bam*HI의 제한효소로 각각 절단한 다음, 0.8% 아가로스 젤에서 전기영동 하여 Lee 등의 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다 (Lee et al.,2007 *J. Plant Physiol.* 164: 1626-1638). 젤상의 DNA를 나일론 막으로 옮기기 위하여 depurination 용액 (0.25 N HCl)에서 15분간, denaturation 용액 (0.4 N NaOH; 1.5 M NaCl)에서 15분간 2회 변성시킨 후, neutralization 용액 (1.5 M NaCl; 0.5 M Tris, pH 8.0)으로 15분간 2회 처리한 다음, 20×SSC 용액으로 12시간 동안 옮겼다. 옮긴 막은 회수하여 20×SSC로 1분간 세정하고 UV-crosslinker (UVP CL-1000, USA)를 이용하여 가교 (crosslinking)를 실시하였다.

[0068] 프로브 DNA의 방사능 표식을 위하여 Multiprime labelling kit (Amersham, USA)를 이용하였다. 10 ㎕ (25 ng)의 프로브 DNA를 5분간 끓인 후, 다시 얼음에 5분간 정치하였다. 5 ㎕의 5×라벨링 버퍼 (labelling buffer), 2.5 ㎕의 random primer/BSA 용액, 26.5 ㎕의 nuclease-free water, 1 ㎕의 Klenow enzyme 및 5 ㎕의 [α-^{32}p] dCTP를 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시켰다. 혼성화를 위하여 막 (membrane) 당 10-15 ㎕의 프로브 DNA를 5분간 끓여 변성시킨 다음, 얼음에 냉각시켜 첨가하였다.

[0069] 막에 high stringency hybridization 용액 (50% formamide; 5×SSC; 5×Denhardt's solution; 50 mM Na-phosphate, pH 6.5; 0.1% SDS; 100 ㎍/㎕ denatured salmon sperm DNA)을 각각 9 ml 첨가한 다음, 3 ml의 50% 덱스트란 설페이트 (dextran sulfate)를 첨가하여 42℃에서 1시간 동안 전-혼성화 (pre-hybridization)를 실시하였다. [α-^{32}p] dCTP로 표지한 프로브 DNA를 첨가하여 42℃에서 16시간 동안 혼성화를 실시한 다음, 막을 42℃에서 2×SSC-0.1% SDS 용액으로 20분 및 0.1×SSC-0.1% SDS 용액으로 1시간 세정하고, -80℃에서 X-ray 필름에 노출시켰다.

[0070] **실시예 1. 식물 생장조절물질의 종류와 농도에 따른 캘러스의 유도효율**

[0071] 조직배양에서 캘러스 유도는 식물의 종류에 따라 다른 양상을 보이며 한 식물체 내에서도 이용되는 식물 생장조절물질의 종류와 농도에 따라 그 양상이 달라진다 (Woo et al., 2004 *Kor. J. Plant Biotechnol.* 31: 43-48). 갈대의 종자배양에 있어서 캘러스 유도배지에 첨가되는 옥신의 종류와 농도에 따른 최적의 배양효과를 조사하기 위하여 살균된 갈대 성숙종자를 2,4-D, 디캄바, NAA가 각각 0~5 mg/L의 농도로 첨가된 캘러스 유도배지에서 배양한 결과 표 1과 같이 나타났다.

[0072] 배발생 캘러스의 유도효율은 2,4-D와 디캄바 처리구가 NAA 첨가구보다 높게 나타났다. 2,4-D 처리구의 경우 1 mg/L 농도로 첨가해 주었을 때 86.7%의 가장 높은 캘러스 유도효율을 나타내었으며, 2,4-D 첨가농도가 높아질수록 캘러스 유도효율이 감소하는 경향을 보였고, 장기간 배양시에는 갈변하면서 고사하는 현상을 보였다. 디캄바 처리구의 캘러스 유도효율은 0.5 mg/L에서 60.7%로 가장 높았으며, 2,4-D와 마찬가지로 디캄바 농도가 증가할수록 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었다. NAA 처리구의 경우 전체적으로 캘러스 유도효율이 매우 저조하였고

갈변 현상이 많이 나타났다.

[0073] 이와 같은 결과는 식물의 배발생 캘러스를 유도함에 있어서, 2,4-D의 첨가가 다른 종류의 옥신 첨가보다 더 효과적이라는 다른 연구 결과들과 유사한 경향을 나타낸 것이다 (Rim et al., 2000 *J. Kor. Grassland Sci.* 20: 25-30). 따라서 갈대의 성숙종자로부터 캘러스를 유도함에 있어 유도배지에 첨가되어질 옥신류로는 1 mg/L 2,4-D가 가장 효율적인 것으로 판단되었다.

표 1

갈대 성숙 종자로부터 캘러스를 유도할 때 다른 농도의 옥신의 효과

Auxin (mg/L)		No. of seeds cultured	Callus induction (%)
2,4-D	0	150	0
	0.5	150	70.7
	1	150	86.7
	3	150	60.7
	5	150	51.3
Dicamba	0	150	0
	0.5	150	60.7
	1	150	55.3
	3	150	48.7
	5	150	42.0
NAA	0	150	0
	0.5	150	5.3
	1	150	3.3
	3	150	2.7
	5	150	1.3

[0074]

[0075] 한편 옥신 단용 처리구에서 가장 높은 효율을 보였던 1 mg/L 2,4-D 처리구와 두 번째로 높은 효율을 보였던 0.5 mg/L 디캄바 처리구에 각각 0~1 mg/L의 BA와 키네틴을 혼용처리 했을 때의 캘러스 유도효율을 조사한 결과 표 2와 같다.

표 2

갈대 성숙 종자로부터 캘러스를 유도할 때 옥신 및 시토키닌의 효과

Growth regulators (mg/L)		No. of seeds cultured	Callus induction (%)
2,4-D	BA		
1	0	150	84.7
	0.3	150	85.3
	0.5	150	88.7
	1	150	80.0
2,4-D	Kinetin		
1	0	150	82.0
	0.3	150	81.3
	0.5	150	82.0
	1	150	75.3
Dicamba	BA		
0.5	0	150	60.7
	0.3	150	62.0
	0.5	150	66.0
	1	150	65.3
Dicamba	Kinetin		
0.5	0	150	62.0
	0.3	150	60.7
	0.5	150	61.3
	1	150	58.0

[0076]

[0077] 1 mg/L 2,4-D와 시토키닌류 혼용 처리구의 경우 0.5 mg/L BA를 혼용처리 했을 때 88.7%로 가장 높았으며, 0.5 mg/L 디캄바와 시토키닌류 혼용 처리구의 경우도 0.5 mg/L BA을 혼용처리 했을 때 66%로 가장 높았다. 이와 같이 캘러스 유도배지에 시토키닌류인 BA와 키네틴이 옥신과 혼용 처리되었을때 옥신 단용처리구 보다 높은 캘러스 유도 효율을 보였다.

[0078] 따라서, 이 후 실험에서 갈대 성숙종자로부터 캘러스를 유도함에 있어 캘러스 유도배지에 1 mg/L 2,4-D와 0.5mg/L BA를 혼용 처리하여 사용하였다.

[0079] **실시예 2. 식물 생장조절물질의 종류와 농도에 따른 식물체의 재분화 효율**

[0080] 성숙 종자 유래의 캘러스로부터 식물체 재분화효율을 알아보기 위해, 배지에 첨가되는 식물 생장조절물질의 종류와 적정농도를 조사한 결과, 표 3과 같이 나타났다. 배발생 캘러스 유도효율이 가장 우수한 1 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L BA가 첨가된 캘러스 유도배지에서 4주간 형성된 배발생 캘러스를 키네틴, BA가 각각 0, 1, 3 mg/L의 농도로 첨가된 재분화 배지에서 배양해 본 결과, 1 mg/L BA가 43.3%로 가장 높은 재분화효율을 나타내었고, 1 mg/L 키네틴이 38% 재분화효율을 나타내었다. 이와 같이 재분화 유도배지에 시토키닌류인 BA와 키네틴이 첨가되었을 때, 재분화능이 저하하였으며, 재분화 유도시에 신초가 형성되지 않고 고사하는 현상을 보였다. 따라서 두 식물생장 조절물질 모두 재분화 배지에 첨가하였을 때 식물체 재분화효율이 감소함을 확인할 수 있었다.

[0081] 또한, 옥신 (2,4-D, 디캄바, NAA) 단용처리 했을 때의 결과는 표 4와 같다. 여러 단용처리구 중에서 1 mg/L의

디캄바에 단용처리구가 78.9%로 가장 높았다. 식물체 재분화의 경우 옥신류인 디캄바의 단용처리가 시토키닌 단용 처리보다 높은 효율을 보여주었다. 따라서 갈대 성숙 종자 유래의 캘러스로부터 식물체 재분화에는 1 mg/L 디캄바 처리하였을 때 가장 효율적인 것으로 판단되었다.

표 3

갈대 성숙 종자로부터 유도된 캘러스로부터 식물체를 재분화시킬 때 다른 농도의 시토키닌의 효과

Cytokinins (mg/L)		No. of calli cultured	Shoot regeneration (%)*
Kinetin	0	150	56.0
	1	150	38.0
	3	150	8.0
BA	0	150	59.3
	1	150	43.3
	3	150	11.3

[0082]

표 4

갈대 성숙 종자로부터 캘러스를 유도할 때 다른 농도의 옥신의 효과

Auxins (mg/L)		No. of calli cultured	Shoot regeneration (%)
2,4-D	0	90	57.8
	0.5	90	10.0
	1	90	6.7
	3	90	3.3
	5	90	2.2
Dicamba	0	90	54.4
	0.5	90	55.6
	1	90	78.9
	3	90	32.2
	5	90	21.1
NAA	0	90	56.7
	0.5	90	21.1
	1	90	20.0
	3	90	10.0
	5	90	3.3

[0083]

[0084] 본 실험을 통하여 식물 생장조절물질의 종류와 농도의 최적조건을 확립함으로서 종자 유래의 캘러스로부터 고효율 재분화 체계를 확립할 수 있었다. 배발생 캘러스 유도에서 식물 생장조절물질 최적조건은 1 mg/L의 2,4-D이고, 식물체 재분화의 식물 생장조절물질 최적조건은 1 mg/L 디캄바의 단용처리이다. 이러한 최적조건에서 갈대 성숙종자를 배양했을 때 배발생 캘러스는 캘러스 유도배지에서 80% 이상 형성되었으며 (도 1A, 1B), 재분화 배지에 이식했을 때 배양 4주 후에는 약 70%의 높은 빈도로 신초가 재분화되었다 (도 1C, 1D). 재분화된 신초는 1/2 MS로 구성된 발근 (rooting) 배지에서 2주간 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 (도 1E) 포트에 이식하

여 재배할 수 있었다 (도 1F).

[0085] **실시예 3. 공동배양 기간에 따른 형질전환 효율의 차이**

[0086] 갈대 종자 유래의 캘러스에 아그로박테리움을 감염시킨 후 공동배양 기간에 따른 형질전환 효율을 조사한 결과는 표 5와 같다. 아그로박테리움 감염 후 공동배양 1일째 GUS 활성 염색 정도로 관찰한 형질전환 효율은 15% 였으며, 3일간 공동배양한 경우는 53.3%로 가장 높은 형질전환 효율을 나타내었다. 또한 공동배양 기간을 5일 이상으로 장기간 배양하였을 경우에는 오히려 GUS 활성염색 정도가 감소하였다. 즉, 공동배양 기간이 3일째 까지는 기간이 길어질수록 형질전환 효율이 증가하였으나, 그 이상의 기간에서는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. 공동배양 기간이 7일인 경우에는 육안으로 관찰하였을 때 아그로박테리움의 과성장 (overgrowth)로 인해 괴사되는 캘러스의 비율이 높았으며, 이로 인해 GUS 활성염색 정도가 저하된 것으로 사료된다.

표 5

갈대 성숙 종자로부터 유도된 캘러스에서 일시적으로 GUS를 발현시킬 때 공동배양 기간의 효과

[0087]

Co-cultivation period (days)	No. of calli tested	No. of GUS$^+$ calli	Frequency (%) of GUS$^+$ calli
1	60	9	15
3	60	32	53.3
5	60	24	40
7	60	2	3.3

[0088] **실시예 4. 아세토시린곤 (AS) 첨가에 따른 형질전환효율의 차이**

[0089] 갈대의 아그로박테리움을 이용한 최적의 형질전환조건을 조사하기 위하여 아그로박테리움의 감염효율에 가장 큰 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있는 아세토시린곤 (AS)의 첨가에 따른 효과를 조사한 결과 표 6과 같다. AS의 농도에 따른 GUS 유전자의 발현 정도는 뚜렷한 차이가 있었다. AS를 200 μM 또는 300 μM 농도로 감염배지와 공동배양 배지에 첨가했을 때, 형질전환 효율이 각각 55%와 35%의 높은 형질전환 효율을 나타냈다. 그러나 AS의 무첨가구와 100 μM 첨가구에서는 각각 15%와 26.7%의 저조한 효율을 나타내었다. 55.5%의 가장 높은 효율을 보여준 200 μM 첨가구는 무첨가구 보다 높은 형질전환효율을 나타냈다. 이러한 결과는 AS의 첨가가 갈대 형질전환 효율을 현저히 증가시키는 중요한 요인 중에 하나임을 나타낸다.

표 6

갈대 성숙 종자로부터 유도된 캘러스에서 일시적으로 GUS를 발현시킬 때 아세토시린곤 농도의 효과

[0090]

Acetosyringone (μM)	No. of calli tested	No. of GUS$^+$ calli	Frequency (%) of GUS$^+$ calli
0	60	9	15
100	60	16	26.7
200	60	33	55
300	60	21	35

[0091] **실시예 5. 아그로박테리움 균주에 따른 형질전환 효율의 차이**

[0092] 아그로박테리움을 이용한 식물의 형질전환에 일반적으로 많이 사용되는 범용 균주인 LBA4404, EHA105 및 GV3101을 각각 사용하여 갈대 형질전환 효율의 차이를 조사한 결과 표 7과 같다. 세 가지 균주에 있어서 EHA105가 65%로 가장 GUS 활성염색 정도가 가장 많이 나타났고, LBA4404와 GV3101는 각각 22%와 19%로 GUS 활성염색 정도가 비슷한 효율을 보였다. 가장 높은 형질전환효율을 나타낸 EHA105는 다른 두 균주 (LBA4404, GV3101)와 비교했을 때 뚜렷한 차이를 보여주었다. 이러한 결과는 아그로박테리움 균주의 종류에 따른 GUS 활성염색에 많은 차이가 나타남을 보여준다.

표 7

갈대 성숙 종자로부터 유도된 캘러스에서 일시적으로 GUS를 발현시킬 때 아그로박테리움 균주의 효과

[0093]

Agrobacterium strain	No. of calli tested	No. of GUS^+ calli	Frequency (%) of GUS^+ calli
EHA105	60	39	65
LBA4404	60	22	36.7
GV3101	60	19	31.7

[0094] **실시예 6. 형질전환체 선발을 위한 하이그로마이신 적정 농도**

[0095] 캘러스와 아그로박테리움의 공동배양 후 선발배지에서 형질전환된 캘러스와 재분화 식물체를 선발하게 된다. 형질전환된 캘러스와 재분화된 식물체는 하이그로마이신 (Hm) 내성 유전자가 삽입되었기 때문에 Hm 첨가 배지에서 생존하게 되며, 형질전환되지 않은 캘러스와 재분화 식물체는 고사하게 된다. 그러나 형질전환체 선발을 위한 Hm의 농도는 식물의 종류나 재료에 따라 다르므로 형질전환되지 않은 캘러스 또는 유식물체가 고사하는 Hm 농도를 선발할 필요가 있다 (Hauptmann et al. 1998 *Plant Physiol.* 86: 602-606). 갈대 형질전환체 선발을 위해 Hm 농도를 0, 15, 25 및 50 mg/L로 달리하여 식물체의 생존여부를 관찰한 결과, Hm 농도가 증가할수록 유식물의 생존율이 급격히 저하하여 15 mg/L Hm 첨가 배지에서 4주간 배양한 처리구에서 40% 이상의 고사율을 보였으며, 25 mg/L 농도에서 70% 이상의 고사율을 보였고, 50 mg/L 농도에서는 100% 고사하였다.

[0096] 따라서 갈대 형질전환체 선발을 위해서는 1차 선발시 25 mg/L를 사용하여 3주간 배양한 후 증식한 개체만을 선발하였고, 2차 선발시 50 mg/L를 사용하여 형질전환 개체를 선발하였다.

[0097] **실시예 7. PCR (Polymerase chain reaction) 분석**

[0098] 형질전환 식물체의 게놈 내에 pIG121Hm 발현 벡터가 가지는 T-DNA 영역이 도입 되었는지를 확인하기 위해 온실에서 재배중인 형질전환 식물체의 잎으로부터 게놈 DNA를 분리하여 PCR 분석을 실시하였다. 도 4에 나타낸 바와 같이 비형질전환 식물체에서는 증폭 산물을 확인할 수 없었으나, 형질전환 식물체에서는 증폭산물이 관찰되어 T-DNA 영역이 형질전환 식물체의 게놈 내로 정상적으로 도입되었음을 확인할 수 있었다 (도 4).

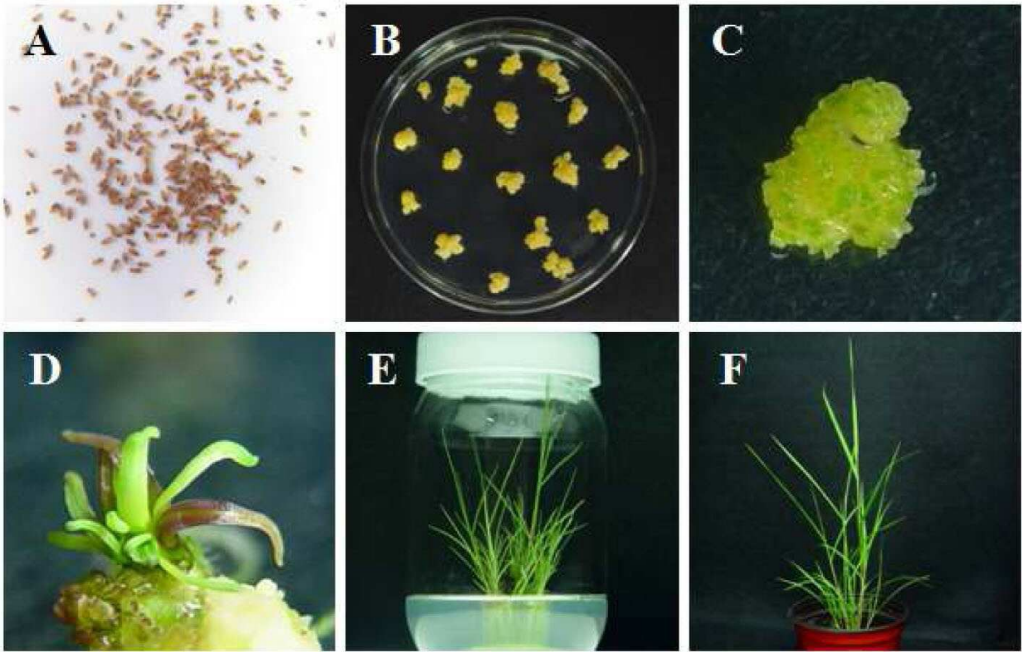
[0099] **실시예 8. 형질전환 식물체의 유전자 도입**

[0100] 형질전환 갈대 게놈 내에 현 유전자가 도입되었는지를 확인하기 위하여 20 ㎍의 게놈 DNA를 제한효소 *Hin*dIII으로 완전히 절단한 다음 ^{32}p로 표지된 GUS를 프로브로 하여 서던 블럿 분석을 실시하였다 (도 5). 그 결과, 비형질전환 식물체에서는 GUS 프로브와 결합하는 DNA 단편을 확인할 수 없었으나, 형질전환 식물체에서는 1~3개의 DNA 단편이 관찰되어 GUS 유전자가 1~3 카피씩 도입되었음을 확인할 수 있었다 (도 5). 반면, 비형질전환 식물체는 어떠한 밴드도 관찰되지 않았다.

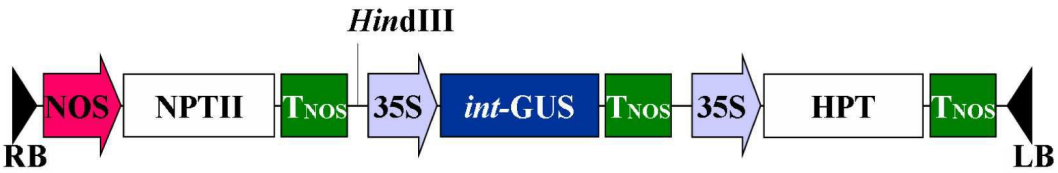
[0101] 본 발명을 통하여 갈대 형질전환에 있어서 공동배양 기간, 아세토시린곤 농도, 아그로박테리움 균주 종류의 최적조건을 확립함으로써 고효율 형질전환 체계를 확립할 수 있었다. 또한 선발배지에서 Hm 내성을 가지는 캘러스로부터 재분화된 형질전환 식물체를 GUS 유전자의 발현 여부를 활성염색으로 조사하여 본 결과, 식물체의 모든 조직부위에서 청색으로 염색되었다 (도 6). 이러한 결과는 아그로박테리움법에 의하여 갈대가 성공적으로 형질전환되었음을 나타낸다.

도면

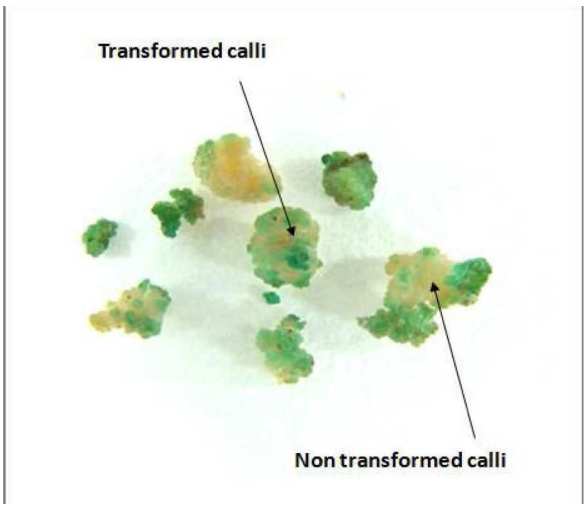
도면1



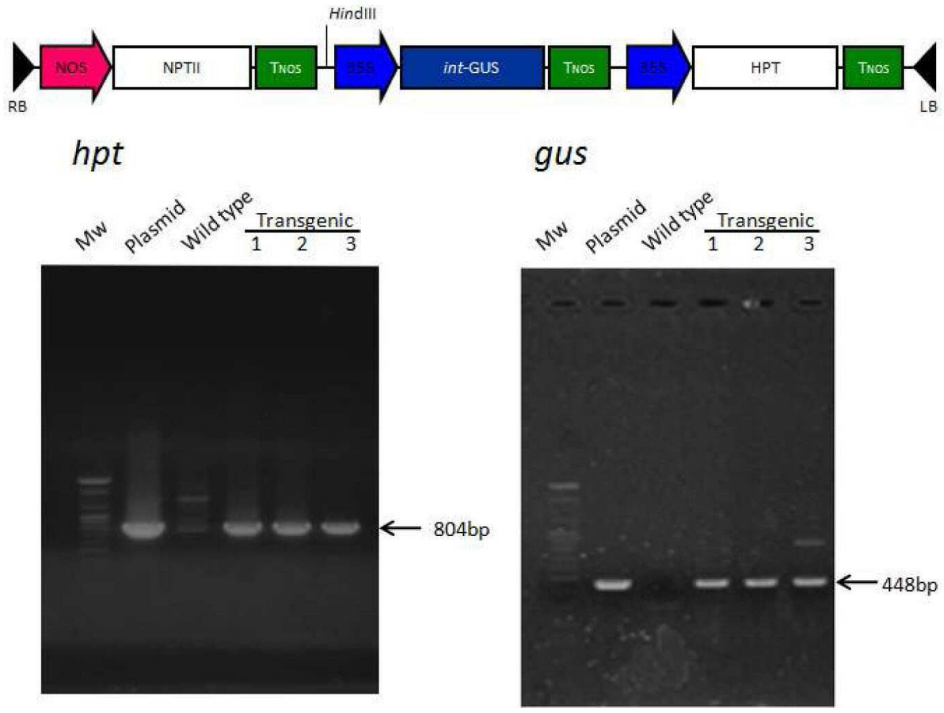
도면2



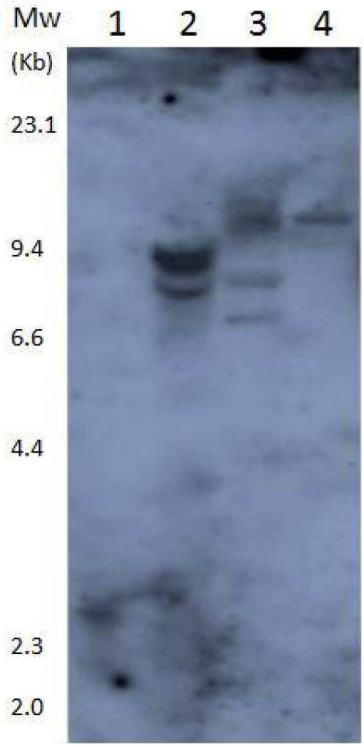
도면3



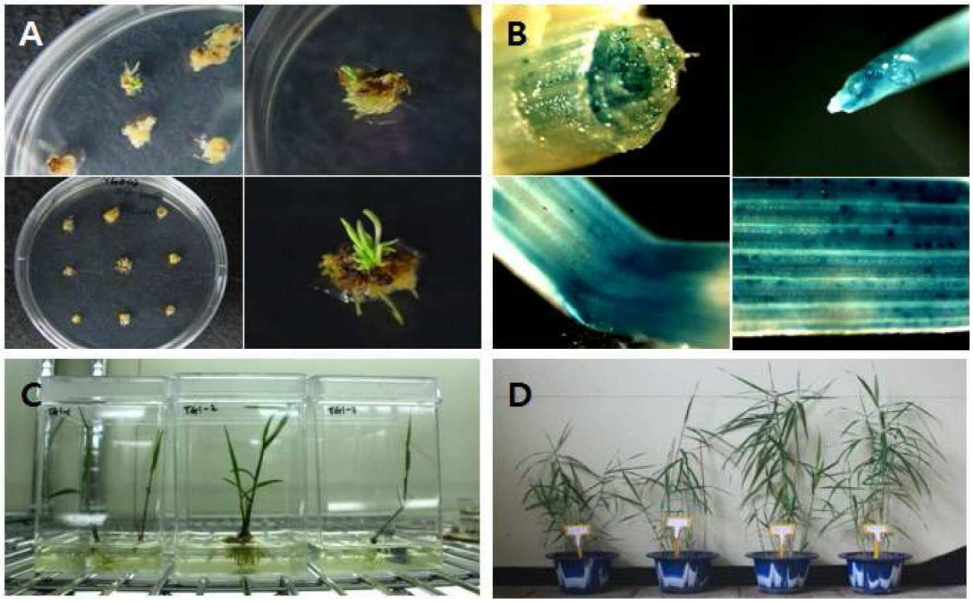
도면4


HindIII
NOS
NPTII
TNOS
BSS
int-GUS
TNOS
BSS
HPT
TNOS
RB
LB
hpt
gus
Mw
Plasmid
Wild type
Transgenic
1 2 3
804bp
448bp

도면5


Mw
1 2 3 4
(Kb)
23.1
9.4
6.6
4.4
2.3
2.0

도면6



서 열 목 록

<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Method for producing transgenic reed plant and the plant thereof

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer

<400> 1

aattgatcag cgttggtgg 19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer

<400> 2

ggtgtagagc attacgctgc 20