



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0048415
(43) 공개일자 2013년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0113255

(22) 출원일자 2011년11월02일

심사청구일자 2011년11월02일

(71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

좌남수

서울특별시 광진구 능동로 18, 이튼타워 3차 A동 1003호 (자양동)

(74) 대리인

양부현

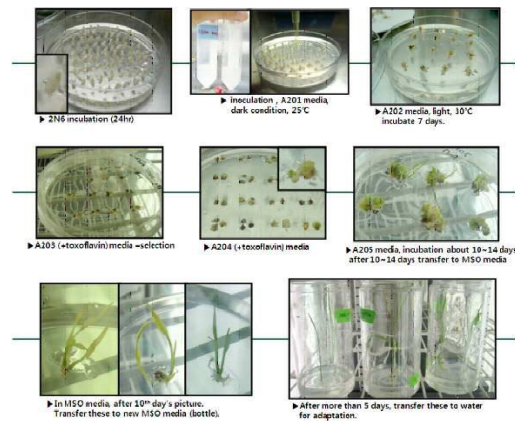
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **벼의 형질전환 방법**

(57) 요약

본 발명은 벼의 신규한 형질전환 방법에 관한 것으로서, (a) 벼의 성숙 종자를 수득하는 단계; (b) 상기 성숙 종자를 받아시켜 미성숙배세포(Immature embryos, IEs)를 형성시키는 단계; (c) 형질전환하고자 하는 목적 유전자를 포함하는 벡터를 상기 미성숙배세포 내로 도입시키는 단계; 및 (d) 상기 세포로부터 형질전환 벼를 수득하는 단계로 구성된다. 본 발명의 방법에 따르면, 종래 식물체의 성체에서 캘러스를 유도하여 형질전환하는 방법이 아닌, 성숙 종자를 이용하여 세미성숙배세포를 유도하고, 이를 형질전환에 사용함으로써 새로운 품종의 개발 기간이 절반 이상 단축될 수 있다. 또한, 기존의 캘러스 유도 방법은 돌연변이 세포가 발생할 가능성이 높아 인공이 섭취할 수 있는 형질전환 식물체를 제조하는 것이 어려웠으나, 성숙 종자에서 발아된 미성숙배세포의 세포 파괴를 이용함으로써 인체에 보다 안전한 식물 성체를 얻을 수 있다. 따라서 본 발명의 방법은 벼의 품종 개량에 있어 신규한 형질전환방법으로서 이용할 수 있으며, 또한 우수 형질전환체를 단기간에 대량으로 생산할 수 있어 형질전환에 소요되는 기간, 비용 및 노력 등을 획기적으로 절감할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ00806101
부처명	농촌진흥청
연구사업명	차세대 바이오그린 21사업
연구과제명	형질전환을 통한 인디카며 육종기반기술 구축
주관기관	세종대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 벼의 형질전환 방법:

- (a) 벼의 성숙 종자를 수득하는 단계;
- (b) 상기 성숙 종자를 발아시켜 미성숙배세포(Immature embryos, IEs)를 형성시키는 단계;
- (c) 형질전환하고자 하는 목적 유전자를 포함하는 벡터를 상기 미성숙배세포 내로 도입시키는 단계; 및
- (d) 상기 세포로부터 형질전환 벼를 수득하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 벼는 자포니카 품종, 인디카 품종 및 자바니카 품종으로 구성된 군으로부터 선택된 것임을 특징으로 하는 형질전환 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 벡터는 토크소플라빈 분해효소 유전자(*tf1A*)를 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 단계 (c) 및 (d) 사이에 목적 유전자가 도입된 미성숙배세포로부터 세포괴(Cell mass)를 형성하는 단계 (post-c)를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 단계 (c) 이후에 목적 유전자가 도입된 미성숙배세포를 선별하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 방법.

청구항 6

제 1 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 방법은 단계 (c) 또는 단계 (post-c)이후에 목적 유전자가 도입된 미성숙배세포를 재분화 시키는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 목적 유전자 도입은 KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2EDTA , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KI , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 비타민, 카사미노산, 아미노산, 당류, 사이토키닌, 옥신 및 아세토시린곤을 포함하는 배지에서 실시되는 것을 특징으로 하는 형질전환 방법.

청구항 8

제 4 항에 있어서, 세포피의 형성은 KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2EDTA , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KI , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 비타민, 카사미노산, 아미노산, 당류, 젤란검, 사이토키닌, 옥신, 세포탁심 및 카르베니실린을 포함하는 배지에서 실시되는 것을 특징으로 하는 형질 전환 방법.

청구항 9

제 5 항에 있어서, 상기 미성숙배세포의 선별은 KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2EDTA , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KI , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 비타민, 카사미노산, 아미노산, 당류, 젤란검, 사이토키닌, 옥신, 세포탁심, 카르베니실린 및 톡소플라빈을 포함하는 배지에서 실시되는 것을 특징으로 하는 형질전환 방법.

청구항 10

제 6 항에 있어서, 상기 미성숙배세포의 재분화는 KNO_3 , NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KI , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , H_3BO_3 , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2EDTA , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 비타민, 아미노산, 당류, 젤란검, 사이토키닌, 옥신, 세포탁심 및 톡소플라빈을 포함하는 배지에서 실시되는 것을 특징으로 하는 형질전환 방법.

청구항 11

상기 제 1 항 내지 5 항 중 어느 한 항의 방법으로 수득한 형질전환 된 벼.

청구항 12

상기 제 1 항 내지 5 항 중 어느 한 항의 방법으로 수득한 형질전환 된 벼의 종자.

명 세 서

기술분야

[0001] 본 발명은 벼의 신규한 형질전환 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 벼는 아시아 지역 사람들의 주식으로 이용되는 매우 중요한 농작물로서 생명공학 기술의 발달과 더불어 유전자의 기능 연구나 유전자의 단자엽 식물에서의 작용을 구명하는 모델식물로 이용되는 등 그 중요성이 점차 커지고 있다. 세계적으로 널리 재배되고 있는 벼의 품종은 인디카 형(Indica type)과 자포니카 형(Japonica type)의 두 가지로 대별된다. 인디카 형 벼는 세계 인구 절반 이상의 주식으로서, 지속적으로 증가하는 인구의 수요를 충족시키기 위해서 생산량의 증가가 요구되고 있으며, 더욱이 도시의 높은 쌀 소비량 때문에 영양적 가치가 개선된 새로운 벼의 품종 개발이 요구되고 있다.

[0003] 주곡작물에 있어서 제초제 저항성, 내재해성, 내병충성, 기능성 및 수량성이 향상된 신품종의 개발은 재배 안정성을 높이고 고부가가치의 농산물을 생산할 수 있으며 인류의 가장 큰 문제점으로 부각되고 있는 식량문제를 해결 할 수 있다는 측면에서 매우 중요하다. 신품종의 개발에 있어 형질전환 기술을 이용한 분자유종 방법은, 전통적인 육종 방법인 교배 육종법에 비해 우수한 품종의 유전형질을 그대로 유지하면서 유용 유전자를 직접 도입 가능하다는 점과 다양한 생물 종으로부터 유용 유전자를 확보하여 식물체에 전이할 수 있다는 장점이 있다. 국내에서도 벼, 콩, 배추, 담배, 고추, 토마토, 오이 및 들깨 등을 대상으로 유전자 변형 작물 개발연구가 활발히 이루어지고 있으나 현재까지 상업화된 작물은 없는 실정이다.

- [0004] 지금까지 개발된 벼 형질전환 방법으로는 원형질체를 이용하는 방법, 유전자총을 이용하는 방법 및 아그로박테리움을 이용하는 방법 등이 있다.
- [0005] 원형질체에 DNA를 직접 형질전환하는 방법은 80년대 후반에 주로 사용되었으며 외래 DNA를 나출된 원형질체에 도입하기 위해 폴리에틸렌글리콜(PEG)법과 전기충격법(electroporation)을 이용하였다. 그러나 이들 방법은 원형질체에서 재분화 식물체를 분화시키는 과정이 복잡하고 시간이 오래 걸리며 숙련된 기술이 요구된다는 단점이 있다. 1990년대 이후부터는 유전자총을 이용하는 방법과 아그로박테리움을 이용하는 방법이 주로 사용되고 있다. 유전자총을 이용하는 방법은 원하는 유전자 (DNA)를 미세 텅스텐 입자나 금 입자에 코팅하여 헬륨(helium) 가스 압력에 의해 고속으로 목표세포의 핵 속에 전이하는 방법으로, 재분화가 가능한 세포나 조직에 직접 외래 DNA를 도입하는 것이 가능하여 품종 또는 계통에 따른 형질전환 효율의 차이와 관계없이 대부분의 세포에 형질전환이 가능하다는 장점이 있다. 그러나 식물 세포에 삽입되는 DNA 카피수가 많다는 점, 삽입되는 양상의 복잡하고 삽입 DNA가 절단된 형태로 전이되는 등의 문제점이 있다. 이러한 문제점으로 인해 최근에는 실용적인 벼 형질전환 방법으로 아그로박테리움을 이용하는 방법이 가장 널리 사용되고 있다.
- [0006] 벼 역시 아그로박테리움을 이용한 유전자 도입을 통해 품종 개량이 연구되어 왔으며, 그 중 자포니카 벼는 형질전환이 비교적 용이하여 품종이 개량되어 왔다. 그러나 인디카 벼는 캘러스 유도가 매우 어려워 형질전환율이 매우 낮은 문제점이 있었다. 따라서 본 발명에서는 캘러스 유도가 매우 어려운 인디카 벼를 이용하여, 새로운 품종개발이 용이 하도록 기존의 방법보다 형질전환기간이 크게 단축된 벼의 신규한 형질전환방법을 제공하고자 한다.
- [0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허 문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명자들은 벼의 새로운 형질전환 기술을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 종래 식물체의 성체에서 캘러스를 유도하여 형질전환하는 방법이 아닌, 성숙 종자를 이용하여 미성숙배세포를 유도하고, 이를 형질전환에 사용하는 방법을 발명하였다. 식물 성체로부터의 캘러스 유도가 매우 어려운 경우, 미성숙배세포의 세포괴를 유도하여 형질전환시키는 방법을 사용하면 새로운 품종 개발의 기간이 절반이상 단축된다. 또한 기존의 캘러스 유도 방법은 돌연변이 세포가 발생할 가능성이 높아 인간이 섭취할 수 있는 형질전환 식물체를 제조하는 것이 어려웠으나, 성숙 종자에서 발아된 미성숙배세포의 세포괴를 이용함으로써 인체에 보다 안전한 식물 성체를 얻을 수 있고 이를 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0009] 따라서 본 발명의 목적은 벼의 신규한 형질전환 방법을 제공하는 데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 형질전환 된 벼를 제공하는 데 있다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 형질전환 된 벼의 종자를 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 벼의 형질전환 방법을 제공한다:
- [0014] (a) 벼의 성숙 종자를 수득하는 단계;

- [0015] (b) 상기 성숙 종자를 받아시켜 미성숙배세포(Immature embryos, IEs)를 형성시키는 단계;
- [0016] (c) 형질전환하고자 하는 목적 유전자를 포함하는 벡터를 상기 미성숙배세포 내로 도입시키는 단계; 및
- [0017] (d) 상기 세포로부터 형질전환 버를 수득하는 단계.
- [0018] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 방법으로 수득한 형질전환 된 버를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 방법으로 수득한 형질전환 된 버의 종자를 제공한다.
- [0020] 본 발명자들은 버, 특히 인디카 버의 새로운 형질전환 기술을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 종래 식물체의 성체에서 캘러스를 유도하여 형질전환하는 방법이 아닌, 성숙 종자를 이용하여 미성숙배세포를 유도하고, 이를 형질전환에 사용하는 방법을 발명하였다. 식물 성체로부터의 캘러스 유도가 매우 어려운 경우, 미성숙배세포의 세포괴를 유도하여 형질전환시키는 방법을 사용하면 새로운 품종 개발의 기간이 절반이상 단축된다. 또한 기존의 캘러스 유도 방법은 돌연변이 세포가 발생할 가능성이 높아 인간이 섭취할 수 있는 형질전환 식물체를 제조하는 것이 어려웠으나, 성숙 종자에서 발아된 분화 전단계의 미성숙배세포의 세포괴를 이용함으로써 인체에 보다 안전한 식물 성체를 얻을 수 있음을 확인하였다.
- [0021] 본 발명의 방법은 공지된 다양한 버의 품종(cultivar)에 적용될 수 있으며, 예컨대 자포니카 품종, 인디카 품종 및 자바니카 품종에 적용될 수 있으며, 바람직하게는 인디카 품종이다.
- [0022] 본 발명의 방법을 각각의 단계 별로 상세하게 설명하면 다음과 같다:
- [0023] 단계 (a): 버의 성숙 종자를 수득하는 단계
- [0024] 본 발명의 형질전환방법은 우선 버의 성숙 종자를 수득하는 단계를 포함한다.
- [0025] 본 발명의 성숙 종자는 가능하면 별도로 관리된 종자를 사용하는 것이 바람직하다. 예컨대, 버 재배시의 비배 관리가 적절하고 병충해의 피해를 받지 않았으며, 수확 후 탈곡 시에도 과도한 동력을 사용해 종자가 손상을 입지 않은 것을 선별해 사용토록 한다. 가급적 당해 연도에 수확한 것을 사용하고 부득이 오래된 종자를 사용하게 될 때에는 냉장고에 보관하여 종자의 활력을 유지토록 하는 것이 바람직하다.
- [0026] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 버의 종자에서 종피를 제거한 후, 에탄올로 소독한다. 에탄올 소독 후, 소듐하이포클로라이트로 세척하는 과정을 추가적으로 더 포함할 수 있다.
- [0027] 단계 (b): 상기 성숙 종자를 받아시켜 미성숙배세포(Immature embryos, IEs)를 형성시키는 단계
- [0028] 이어, 단계 (a)에서 수득한 성숙 종자에서 미성숙배세포를 받아시킨다. 미성숙배세포란 식물 분화 전 단계의 세포를 말한다.
- [0029] 종자의 발아는 적합한 배지를 이용하여 적합한 암/광조건 하에서 실시될 수 있으며, 상기 종자는, 바람직하게는, 2N6 배지에서 1-3일간 배양하여 미성숙배세포의 발아를 유도한다.
- [0030] 단계 (c): 형질전환 하고자 하는 목적 유전자를 포함하는 벡터를 상기 미성숙배세포 내로 도입시키는 단계
- [0031] 상기 미성숙배세포의 형성 후, 형질전환 하고자 하는 목적 유전자를 포함한 벡터를 세포 내로 도입시킨다.
- [0032] 상기 목적 유전자는 식물체에 도입될 수 있는 다양한 유전자를 포함하며, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 목적 유전자는 톡소플라빈 분해효소 유전자(*tfIA*)이다. 톡소플라빈은 쌀 생산량 감소를 가져오는 벼 알마름병의 원인으로 알려진 물질로서, 이에 대해 저항성을 가진 작물의 제작을 위해 연구되어 왔고, 최근 톡소플라빈 분해 효소(*tfIA*)를 형질전환 형질전환 선발 마커로 활용 가능하다는 것이 작물기능 유전체연구사업단의 연구 결과물로 보고되었다.

- [0033] 본 발명에서 이용되는 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있다. 본 발명에 적합한 벡터는 (i) 식물에서 작동하는 프로모터; (ii) 상기 프로모터에 작동적으로 연결된 구조 유전자; 및 (iii) 폴리아데닐화 시그널 서열을 포함한다. 상기 벡터는 리포터 분자(예: 루시페라아제 및 β -글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반할 수 있다. 또한, 본 발명에서 이용되는 벡터는 선택 표지로서 항생제(예: 네오마이신, 카바미실린, 카나마이신, 스펙티노마이신 및 하이그로마이신), 내성 유전자(예: 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (*npt II*), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 (*hpt*)) 및 독소플라빈 분해효소 유전자(*tflA*)를 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 방법에 있어서, 미성숙배세포의 형질전환은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있으며, 이는 전기천공 (Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982) 및 Saul, M. et al., *Plant Molecular Biology Manual*, Vol. A1, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988)), 입자충 방법 (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990) 및 Christou, P., *Trends Plant Sci.* 1:423-431(1996)) 및 아그로박테리움-매개 형질전환 (미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호)을 포함하며, 바람직하게는, 상기 형질전환 방법은 아그로박테리움-매개 형질전환 방법이다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 상기 형질전환 과정은 아그로박테리움의 배양물을 미성숙배세포에 떨어뜨려 공동배양하는 과정을 포함한다. 이에 의해 아그로박테리움은 식물내로 감염된다.
- [0035] 상기 형질전환은 적합한 배지에서 실시될 수 있으며, 바람직하게는 상기 형질전환은 KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2EDTA , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KI, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 비타민, 카사미노산, 아미노산, 당류, 사이토키닌, 옥신, 아가로스 및 아세트시린곤을 포함하는 배지에서 실시된다.
- [0036] 본 발명의 배지에 첨가되는 비타민은 당업계에 공지된 다양한 비타민을 포함하며, 바람직하게는, 레티놀, 티아민, 리보플라빈, 니코틴산, 카르니틴, 판토텐산, 피리독신, 비오틴, 이노시톨, 엽산, 코발라민, 아스코르빈산, 칼시페롤, 토코페롤 및 메나디온으로 구성된 군으로부터 선택된 1 또는 2 이상의 비타민을 포함한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면 상기 비타민은 티아민, 피리독신, 니코틴산 및 이노시톨이다.
- [0037] 본 발명의 배지에 첨가되는 아미노산은 당업계에 공지된 다양한 아미노산을 포함하며, 바람직하게는, 알라닌, 시스테인, 아스파르트산, 글루탐산, 페닐알라닌, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 리신, 류신, 메티오닌, 아스파라긴, 프롤린, 글루타민, 아르기닌, 세린, 트레오닌, 셀레노시스테인, 발린, 트립토판 및 티로신으로 구성된 군으로부터 선택된 1 또는 2 이상의 아미노산을 포함한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면 상기 아미노산은 L-프롤린이다.
- [0038] 본 발명의 배지에 첨가되는 당류는 당업계에 공지된 다양한 단당류와 복당류를 포함하며, 바람직하게는, 오타당(리불로스, 자일로스, 리보오스, 아라비노스, 자일로스, 깁소스 및 데옥시리보스), 육탄당(프시코스, 소르보스, 타가토스, 글루코스, 갈락토스, 만니톨, 푸코스, 푸쿨로스, 람노스, 프럭토스, 만노스, 굴로스, 이도스, 탈로스, 알로스, 알트로스 및 탄로스), 이당류(수크로스, 락토오스, 말토오스, 트레할로스, 투라노스 및 셀로비오스), 삼당류(라피노스, 멜레지토스 및 말토티리오스), 사당류(아카보스 및 스타치오스), 올리고당(프럭토올리고사카라이드, 갈락토올리고사카라이드 및 만노올리고사카라이드) 및 다당류(글루칸, 글리코젠, 아밀로스, 아가로스, 아밀로펙틴, 셀룰로스, 덱스트린, 베타글루칸, 말토덱스트린, 프락탄, 이눌린, 마난 및 갈락탄)로 구성된 군에서 선택된 1 또는 2이상을 포함한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면 상기 당류는 글루코스 및 수크로스이다.
- [0039] 본 발명의 배지에 첨가되는 사이토키닌은 식물의 생장 조절 물질 중 하나로서, 세포 분열 촉진, 노화 억제, 휴면 타파, 엽록체 발달 촉진 등에 관여한다. 본 발명에서 배지 조성물로 첨가되는 사이토키닌은 당업계에 공지된 다양한 사이토키닌을 포함하며, 바람직하게는, 키네티, 6-벤질 아미노 퓨린(6-BA), 지아틴 및 아이소펜테닐 아데닌(2-ip)으로 구성된 군에서 선택된 1 또는 2이상의 사이토키닌을 포함한다.
- [0040] 본 발명의 배지에 첨가되는 옥신은 식물의 생장 조절 물질 중 하나로서 성장, 발근을 촉진하고, 낙과를 방지하며, 착과를 조절한다. 본 발명에서 배지 조성물로 첨가되는 옥신은 당업계에 공지된 다양한 옥신을 포함하며, 바람직하게는 2,4-디클로로 페녹시 아세트산(2,4-D), 2,4,5-트리클로로 페녹시 아세트산, 나프탈렌 아세트산

(NAA), 인돌아세트산(IAA), 인돌부틸산(IBA) 4-아미노-3,5,6-트리클로로 피콜린산(TCP)으로 구성된 군에서 선택된 1 또는 2이상의 옥신을 포함한다.

[0041] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 상기 단계 (c)의 형질전환은 상기 미성숙배세포를 상기 적합한 배지가 포함된 페트리디쉬에 치상한 후, 아그로박테리움을 적하하여 접종을 실시할 수 있다. 형질전환은 바람직하게는 암조건에서 이루어진다. 아그로박테리움의 접종 후, 바람직하게는 종자를 세포탁심으로 세척하여 아그로박테리움을 제거한다.

[0042] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 단계 (c) 이후에 목적 유전자가 도입된 미성숙배세포를 배양하여 세포괴(Cell mass)를 형성하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 아그로박테리움으로 접종시킨 미성숙배세포를 페트리디쉬에 치상하여 명조건에서 배양한다. 상기 미성숙 배세포의 세포괴를 형성하는 단계를 거치는 경우, 식물체로 발달하는 확률이 증가할 수 있다.

[0043] 본 명세서의 용어 “세포괴”란, 미성숙배세포의 집합으로서 식물체 분화전 단계의 세포들이 치밀하게 모여 형성된 세포 집단을 말한다.

[0044] 상기 세포괴 형성은 적합한 배지에서 실시될 수 있으며, 바람직하게는, KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2EDTA , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KI, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 비타민, 카사미노산, 아미노산, 당류, 젤란검, 사이토키닌, 옥신, 세포탁심 및 카르베니실린이 포함된 배지에서 실시한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 아미노산은 L-프롤린 및 L-글루타민이고, 상기 당류는 D-만니톨 및 D-Maltose이며, 상기 비타민은 티아민, 피리독신, 니코틴산 및 이노시톨이고, 상기 옥신 및 사이토키닌은 2,4-D, NAA 및 BA이다.

[0045] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 단계 (c) 이후에 목적 유전자가 도입된 미성숙배세포를 선별하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 형질전환시킨 미성숙배세포를 톡소플라빈 함유 배지에서 증식시키면 식물 발현 벡터가 도입된 식물 세포는 톡소플라빈 분해 효소(*tfIA*)가 발현되어 배지 중의 톡소플라빈을 분해하므로, 톡소플라빈 함유배지에서 생존할 수 있다. 그러나, 식물 발현 벡터가 형질전환되지 않은 식물 세포는 톡소플라빈 분해 효소가 발현되지 않아 배지 중의 톡소플라빈을 분해하지 못하므로, 톡소플라빈 함유 배지에서 생존할 수 없게 된다.

[0046] 본 발명의 방법에 따른 형질전환된 식물세포의 선별은 형질전환 배양물을 선택제 (예: 대사 억제제, 항생제, 제초제 또는 톡소플라빈)에 노출시켜 실시될 수 있다. 형질전환되고 선택제 분해효소 유전자를 안정되게 포함하고 있는 식물 세포는 상기한 배양물에서 성장하고 분할한다. 발명의 바람직한 구현예에 따르면 상기 선별은 톡소플라빈을 이용하여 실시한다.

[0047] 상기 형질전환된 식물세포의 선별은 바람직하게는, KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2EDTA , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KI, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 비타민, 카사미노산, 아미노산, 당류, 젤란검, 사이토키닌, 옥신, 세포탁심, 카르베니실린, 톡소플라빈이 포함된 배지에서 실시한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 아미노산은 L-프롤린 및 L-글루타민이고, 상기 당류는 D-만니톨 및 D-말토오스이며, 상기 비타민은 티아민, 피리독신, 니코틴산 및 이노시톨이고, 상기 옥신 및 사이토키닌은 2,4-D, NAA 및 BA이다.

[0048] 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 단계 (c) 이후에 목적 유전자가 도입된 미성숙배세포를 재분화 시키는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 아그로박테리움에 의해 형질전환된 미성숙배세포는 재분화 배지에서 재분화되며, 이는 신초의 재분화를 성공적으로 야기한다. 최종적으로, 발근 배지에서 재분화된 신초의 발근에 의해 형질전환 식물이 생산된다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 형질전환된 미성숙배세포 중 초록색 부위가 보이도록 증식된 것을 선별하여 재분화 배지에 옮긴다.

[0049] 미성숙배세포의 분화에는 당업계에 알려진 다양한 식물체의 재분화 방법을 사용할 수 있다(Bhojwani, S.S. et

al., *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, Elsevier Science, New York, (1983); 및 Lindsey, K., Ed., *Plant Tissue Culture Manual*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, (1991)). 형성된 형질전환 발근 신초는 적합한 식물 성장 배지에 치상된다. 아그로박테리움에 의해 도입된 외래 유전자를 포함하는 식물체의 발달 또는 재분화는 당업계에 공지된 방법에 따라 달성될 수 있다 (미국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호).

[0050] 상기 미성숙배세포의 분화는, 바람직하게는, KNO_3 , NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KI, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , H_3BO_3 , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2EDTA , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 비타민, 아미노산, 당류, 젤란검, 사이토키닌, 옥신, 세포탁심 및 토크소플라빈이 포함된 배지에서 실시된다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 비타민은 니코틴산, 피리독신, 티아민, 이노시톨이고, 상기 아미노산은 글리신이며, 상기 당류는 소르비톨, 수크로스 및 말토오스이고, 상기 옥신 및 사이토키닌은 키네티ن, NAA 및 BA이다.

[0051] 단계 (d): 상기 세포로부터 형질전환 벼를 수득하는 단계

[0052] 상기 방법에 따라 목적 유전자가 도입된 미성숙배세포를 적절한 배지에서 배양한 경우, 미성숙배세포 또는 그의 세포괴로부터 벼의 소식물체(Plantlet)가 출현한다. 본 발명에 따라 형질전환된 벼는 당업계에 공지된 방법에 의해 형질전환 여부가 확인된다. 예를 들어, 형질전환된 식물의 조직으로부터 얻은 DNA 시료를 이용하여, PCR을 실시하면 형질전환 식물의 지놈에 삽입된 외래 유전자가 규명될 수 있다. 택일적으로, 노던 또는 서던 블롯을 실시하여 형질전환 여부를 확인할 수 있다 (Maniatis et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989)).

발명의 효과

[0053] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0054] (a) 본 발명은 벼의 신규한 형질전환 기술에 관한 것으로서, 종래 식물체의 성체에서 캘러스를 유도하여 형질전환하는 방법이 아닌, 성숙 종자를 이용하여 세미성숙배세포를 유도하고, 이를 형질전환에 사용하였다.

[0055] (b) 식물 성체로부터의 캘러스 유도는 시간이 많이 소요되는 바, 미성숙배세포의 세포괴를 유도하여 형질전환시키는 방법을 사용하면 새로운 품종의 개발 기간이 절반 이상 단축될 수 있다.

[0056] (c) 또한, 기존의 캘러스 유도 방법은 돌연변이 세포가 발생할 가능성이 높아 인간이 섭취할 수 있는 형질전환 식물체를 제조하는 것이 어려웠으나, 성숙 종자에서 발아된 미성숙배세포의 세포괴를 이용함으로써 인체에 보다 안전한 식물 성체를 얻을 수 있다.

[0057] (d) 따라서 본 발명의 방법은 벼의 품종 개량에 있어 신규한 형질전환방법으로서 이용할 수 있으며, 또한 우수 형질전환체를 단기간에 대량으로 생산할 수 있어 형질전환에 소요되는 기간, 비용 및 노력 등을 획기적으로 절감할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 인디카 벼의 형질전환과정을 나타낸 것이다.

도 2는 형질전환된 인디카 벼 소식물체에서 얻은 DNA로 PCR을 수행하고 전기영동 한 결과이다.

도 3은 토크소플라빈이 함유된 배지에서 선발된 인디카 벼 형질전환체(IR64)의 잎 절편으로부터 게놈 DNA를 분리하여 전기영동으로 확인한 결과이다.

도 4은 형질전환된 인디카 벼 소식물체에서 얻은 DNA로 서던블롯을 수행한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는

것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0060] 실시예

[0061] 실험 방법

[0062] *tf1A* 유전자 발현 벡터 및 인디카 벼

[0063] *tf1A* 유전자를 발현하는 식물 발현 벡터는 pTf1A 벡터(Serry Koh et al., *Plant Biotechnology Journal*, 9:348-358(2011))를 이용하였다. pTf1A 벡터의 제조과정은 다음과 같다. pCambia1304 벡터(Cambia GPO Box3200)에 Xho I 제한효소 처리하여 하이그로마이신 저항성 유전자를 제거한 후, 인디카 벼의 톡소플라빈 유전자(*tf1A*) 서열을 기반으로 인디카 벼의 cDNA로부터 PCR 합성하여 서열을 확인한 후 이를 CaMV 35S 프로모터에 정방향으로 결합시켜 제조하였다. 이 때, *tf1A*를 코딩하는 유전자인 *tf1A*는 Xho I 제한효소부위를 이용하여 결합하였는데, 제한효소부위를 도입하는 방법은 다음의 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 방법에 의해 수행하였다. 먼저, CaMV35S 프로모터와 CaMV35S 폴리A 사이에 발현되도록 양 프라이머의 말단 부위에 인위적으로 5' 말단과 3' 말단의 Xho I 제한효소부위를 첨가하였다. 제조된 프라이머로 PCR을 수행하여 클로닝에 이용될 벡터에 도입될 수 있게 *tf1A* 유전자를 증폭시켰다. 이때, PCR은 전반응(precycling reaction)으로 94℃에서 5분간 변성시킨 다음, 94℃에서 30초, 60℃에서 30초 및 72℃에서 45초의 순서로 30회 반응을 반복한 후, 마지막 반응에서 72℃에서 10분간 반응시킴으로서 PCR 반응을 종료시켰다. 상기와 같이 제조된 pTf1A 벡터를 아그로박테리움 투메파시엔스 EHA10(*Agrobacterium tumefaciens* EHA105)로 도입하고 인디카 벼의 형질전환에 사용하였다.

[0064] 인디카 벼(*Indica rice*)는 국제 벼 연구소 (International Rice Research Institute, IRRI)에서 인디카 육종의 모본으로 사용되는 RI64를 이용하였다.

[0065] 인디카 벼의 형질전환

[0066] 1. 인디카 벼 종자의 살균 및 발아

[0067] 인디카 벼 성숙 종자의 종피를 벗겨 제거한 뒤, 70% 에탄올로 1분간 세척하였다. 이어 상기 종자를 멸균수로 세척하고, Tween-20 을 첨가한 1% 소듐하이포클로라이트로 20분간 세척하였다. 세척 후, 다시 인디카 벼 종자를 멸균수로 5회 이상 세척하였다.

[0068] 이어, 살균된 인디카 벼 성숙 종자를 하기 2N6 배지에 인디카 벼 종자를 치상하여 24시간 배양하여 미성숙배세포(Immature embryos, IEs)를 형성시켰다. 2N6 배지의 조성은 하기 표 1과 같다.

표 1

2N6 배지의 조성

[0069]

성분	최종농도
수크로스	30 g/L
카사미노산	300 mg/L
프롤린	2.878 mg/L
CHU(sigma c1416)	3.981 g/L
N6-비타민	1 ml/L
2,4-D (2 mg/ml)	1 ml/L
pH : 5.8	
젤란검	2 g/L

[0070] 2. 미성숙배세포의 아그로박테리움에 의한 접종

[0071] pTf1A 벡터를 포함하는 아그로박테리움을 카나마이신이 첨가된 AB 고상 배지에 스트리킹(Streaking)하여 28℃에서 3일간 배양하였다.

표 2

[0072]

AB 배지의 조성

성분	최종농도	
소듐클로라이드	15 g/L	
트립톤	10 g/L	
효모추출물	5 g/L	
아가	15 g/L	
평균		
카나마이신	1 ml/L	

[0073]

스트리킹은 단일 콜로니를 얻는 방법을 사용하지 않고 세포가 균일하게 자라도록 하는 방법을 사용하였다.

[0074]

한편, 형질전환하기 3 시간 전, 층류 후드(Laminar flow hood)에서 페트리디쉬를 열어 표 8 내지 표9의 A201 배지를 3시간동안 건조시켰다.

[0075]

형질전환하기 1 시간 전, 멸균된 루프(Loop)를 이용하여 상기 AB 배지의 아그로박테리움을 채취하였다. 채취한 아그로박테리움을 A200 배지에 현탁시켜, 최종 농도가 3×10^9 cfu/ml, 흡광도(OD₆₈₀) 0.3이 되도록 하였다. 현탁시킨 상기 아그로박테리움을 암조건, 25℃에서 1시간동안 배양하였고, 이 때 배양액을 흔들지 않았다. A200 배지의 조성은 하기 표 3 내지 표 7과 같다.

[0076]

상기 건조시킨 A201 배지에, 상기 종자의 미성숙배세포(Immature embryos, IEs)를 배반 부위가 위쪽을 향하도록 올리고, 건조시켰다. 이 때, 한 페트리디쉬 당 약 50개의 미성숙배세포를 치상하였다. 미성숙배세포에 상기 현탁시킨 아그로박테리움 5 µL를 적하하고 건조시킨 후 암조건, 25℃에서 3일 동안 배양하여 형질전환 과정을 실시하였다.

표 3

[0077]

A200 배지의 조성

성분	최종 농도
AA salts Macro 10X	1X
AA salts Macro 1000X	1X
AA Iron 100X	1X
L- 글루타민	876 mg/L
아스파르트산	266 mg/L
아르기닌	174 mg/L
글리신 1000X 용액	7.5 mg/L
B5 비타민	1X
카사미노산	500 mg/L
수크로스	20 g/L
D+-글루코스-모노하이드레이트	10 g/L
PH 5.2	
아세토시린곤(2M)	0.1 mM

표 4

[0078]

AA macro salt 10X 스톡의 조성

성분	10배 농도
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1499.6 mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2489 mg/L
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1700 mg/L
KCl	29.5 g/L

표 5

[0079] AA macro salt 1000X 스탁의 조성

성분	1000배 농도
CoCl ₂ , 6H ₂ O	25 mg/L
CuSO ₄ , 5H ₂ O	25 mg/L
H ₃ BO ₃	3000 mg/L
KI	750 mg/L
MnSO ₄ , H ₂ O	10000 mg/L
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	250 mg/L

표 6

[0080] AA IRON 100X 스탁의 조성

성분	100배 농도
FeNaEDTA	3670 mg/L

표 7

[0081] 클리신 1000X 스탁의 조성

성분	1000배 농도
클리신	7500 mg/L

표 8

[0082] A201 배지의 조성

성분	최종농도	배지 1 L당 첨가량	단위
N6 major-1		20	ml
N6 major-2		10	ml
N6 major-3		10	ml
N6 major-4		10	ml
B5 minor-1		10	ml
B5 minor-2		10	ml
B5 minor-3		10	ml
B5 minor-4		10	ml
B5 비타민		5	ml
카사미노산	500 mg/L	0.5	g
L-프롤린	500 mg/L	0.5	g
수크로스	20 g/L	20	g
글루코스	10 g/L	10	g
PH 5.2			
아가로오스 타입 I	5.5 g/L	5.5	g
멸균 15분			
2,4-D(1mg/ml)	2 mg/L	2	ml
NAA(1mg/ml)	1 mg/L	1	ml
BA(1mg/ml)	1 mg/L	1	ml
0.1M 아세트시린곤	0.1 mM/L	1	ml

표 9

[0083]

A201 배지, A202 배지 및 A203 배지 내 용액의 조성

용액명	성분	최종농도
N6 major-1	KNO ₃	141.5 g/L
N6 major-2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	18.5 g/L
	(NH ₄) ₂ SO ₄	46.5 g/L
N6 major-3	KH ₂ PO ₄	40 g/L
N6 major-4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	16.6 g/L
B5 minor-1	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.78 g/L
	Na ₂ EDTA	3.73 g/L
B5 minor-2	MnSO ₄ ·4H ₂ O	1 g/L
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g/L
	H ₃ BO ₃	0.3 g/L
B5 minor-3	KI	0.075 g/L
B5 minor-4	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025 g/L
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025g/L
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0025g/L
B5 비타민	티아민	200 mg/100 ml
	피리독신	20 mg/100 ml
	니코틴산	20 mg/100 ml
	i-이노시톨	2000 mg/100 ml

[0084]

3. 선별

[0085]

상기 접종과정 후, 인디카 벼의 종자에서 자라난 발아 부위(shoot)를 메스를 이용하여 제거한 뒤, 종자를 세포 탁심(LPS solution, Korea)으로 3회 세척하여 아그로박테리움을 제거하였다. A202 배지가 포함된 페트리디쉬에 배반부위가 위쪽을 향하도록 종자를 옮겨, 명조건, 30℃에서 7일 동안 배양하였다. 이 때, 한 페트리디쉬 당 약 16개의 미성숙배세포를 치상하였다. A202 배지의 조성은 하기 표 10와 같다.

[0086]

A202 배지에서 배양 후, 세포괴(cell mass)와 종자를 분리하여 세포괴 부분만 새로운 A202 배지에 치상하고 7일간 더 배양하였다. 식물체로 발달할 확률을 더 높이기 위해 A202 배지에서 세포괴를 추가배양하는 과정을 거칠 수도 있다.

표 10

[0087]

A202 배지의 조성

성분	최종농도	배지 1 L당 첨가량	단위
N6 major-1		20	ml
N6 major-2		10	ml
N6 major-3		10	ml
N6 major-4		10	ml
B5 minor-1		10	ml
B5 minor-2		10	ml
B5 minor-3		10	ml
B5 minor-4		10	ml
B5 비타민		5	ml
카사미노산	500 mg/L	0.5	g
L-프롤린	500 mg/L	0.5	g
L-글루타민	300 mg/L	0.3	g
D-만니톨	36 g/L	36	g
D-말토오스 (2%)	20 g/L	20	g
PH 5.8			
젤란검	5 g/L	5	g

평균 15분			
2,4-D(1 mg/ml)	1 mg/L	1	ml
NAA(1 mg/ml)	1 mg/L	1	ml
BA(1 mg/ml)	0.2 mg/L	0.2	ml
세포탁심 (100 mg/ml)	250 mg/L	2.5 /1	ml
카르베니실린 (100 mg/ml)	100 mg/L	1	ml

[0088] 상기 A202 배지에서의 배양 후, 5일이 더 경과한 뒤 세포괴를 A203 배지(토코플라빈 10 mg/L)로 옮겨 10일 동안 배양하여 pTf1A 벡터에 의해 형질전환된 세포괴를 선별되도록 하였으며, 이 때 한 페트리디쉬 당 약 8-10개의 세포괴를 치상하였다. A203 배지의 조성은 하기 표 11과 같다.

표 11

[0089] A203 배지의 조성

성분	최종농도	배지 1 L당 첨가 량	단위
N6 major-1		20	ml
N6 major-2		10	ml
N6 major-3		10	ml
N6 major-4		10	ml
B5 minor-1		10	ml
B5 minor-2		10	ml
B5 minor-3		10	ml
B5 minor-4		10	ml
B5 비타민		5	ml
카사미노산	500 mg/L	0.5	g
L-프롤린	500 mg/L	0.5	g
L-글루타민	300 mg/L	0.3	g
D-만니톨	36 g/L	36	g
D-말토오스 (2%)*	20 g/L	20	g
PH 5.8			
젤라이트/젤란검	5 g/L	5	g
평균 15분			
2,4-D(1 mg/ml)	1 mg/L	1	ml
NAA(1 mg/ml)	1 mg/L	1	ml
BA(1 mg/ml)	0.2 mg/L	0.2	ml
세포탁심 (100 mg/ml)	250 mg/L	2.5 /1	ml
카르베니실린 (100 mg/ml)	100 mg/L	1	ml
토코플라빈 (10 mg/ml)	10 mg/L	1	ml

[0090] 5. 형질전환된 인디카 벼의 재분화(Regeneration)

[0091] 전재분화(Pre-regeneration) 배지인 A204 배지(토코플라빈 10 mg/L)에 형질전환된 세포괴를 옮겨 10-14일 동안 배양하였으며, 한 페트리디쉬 당 약 6-8개의 미숙배세포 세포괴를 치상하였다. 배양한 세포괴 중 초록색 부위가 보이도록 증식된 것을 선별하여 재분화(Regeneration) 배지인 A205 배지로 옮겨 10-14일 동안 배양하였으며, 이 때 한 페트리디쉬 당 4개의 세포괴를 치상하였다. 상기 배양 후, 각각의 세포괴 라인(Line)을 동정하였다. A204 배지 및 A205 배지의 조성은 하기 표 12 내지 표 14과 같다.

표 12

[0092]

A204 배지의 조성

성분	최종농도	배지 1 L당 첨가 량	단위
MS1		20	mℓ
MS2		10	mℓ
MS3		10	mℓ
MS4		10	mℓ
Fe-EDTA		10	mℓ
MS 비타민		5	mℓ
말토오스	30 g/L	30	g
소르비톨	20 g/L	20	g
PH 5.8			
아가로스 타입 I	10 g/L	10	g
멸균 15분			
키네틴(1 mg/mℓ)	2 mg/L	2	mℓ
NAA(1 mg/mℓ)	0.5 mg/L	0.5	mℓ
BA(1 mg/mℓ)	0.2 mg/L	0.2	mℓ
세포탁심	250 mg/L	2.5	mℓ
(100 mg/mℓ)		/1	
토코플라빈	10 mg/L	1	mℓ
(10 mg/mℓ)			

표 13

[0093]

A204 배지, A205 배지 및 MSO 배지 내 용액의 조성

용액명	성분	최종농도
MS1	KNO ₃	95 g/L
	NH ₄ NO ₃	82.5 g/L
MS2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	37 g/L
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.23 g/L
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.86 g/L
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025 g/L
MS3	CaCl ₂ ·2H ₂ O	44 g/L
	KI	0.083 g/L
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0025 g/L
MS4	KH ₂ PO ₄	17 g/L
	H ₃ BO ₃	0.62 g/L
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025 g/L
Fe-EDTA	Na ₂ EDTA	3.725 g/L
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.785 g/L
MS 비타민	Nicotinic acid	10 mg/100mℓ
	Pyridoxine HCl	10 mg/100mℓ
	Thiamine HCl	2 mg/100mℓ
	Glycine	40 mg/100mℓ
	Myo-inositol	2000 mg/100mℓ

표 14

[0094]

A205 배지의 조성

성분	최종농도	배지 1 L당 첨가량	단위
MS1		20	ml
MS2		10	ml
MS3		10	ml
MS4		10	ml
Fe-EDTA		10	ml
MS 비타민		5	ml
수크로스	30 g/L	30	g
젤란검	3 g/L	3	g
PH 5.8			
멸균 15분			
키네틴(1 mg/ml)	2 mg/L	2	ml
NAA(1 mg/ml)	1 mg/L	1	ml
BA(1 mg/ml)	0.2 mg/L	0.2	ml
세포탁심 (100 mg/ml)	250 mg/L	2.5 /1	ml
톡소플라빈 (10 mg/ml)	10 mg/L	1	ml

[0095] 6. 발근 (Rooting)

[0096] A205 배지에서 배양 후, 재분화되지 않은 세포괴 라인은 새로운 A205 배지로 옮겨 14일간 더 배양하였고, 재분화된 인디카 벼의 소식물체(Plantlet)는 MS0 배지가 포함된 튜브로 옮겨 10-14일간 배양하였다.) 한 튜브 당 하나의 소식물체를 담고, 한 세포괴 라인 당 3개의 소식물체를 채취하여 각각 A, B 및 C로 라벨링 하였다. 추후 시험을 위해 A205 배지의 페트리디쉬를 보관하였다. MS0 배지의 조성은 하기 표 15와 같다.

[0097] 상기 인디카 벼 소식물체(A, B, C)를 토양이 포함된 화분으로 옮겨 온실에서 배양하였다. 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR) 및 서던블롯을 위하여, 인디카 벼 소식물체 개체별로 잎을 채취하고 샘플번호를 기재하였다.

표 15

[0098]

MS0 배지의 조성

성분	최종농도	배지 1 L당 첨가량	단위
MS1		20	ml
MS2		10	ml
MS3		10	ml
MS4		10	ml
Fe-EDTA		10	ml
MS 비타민		5	ml
수크로스	30 g/L	30	g
PH 5.8			
젤란검	2 g/L	2	g
멸균 15분			

[0099] 6. 중합효소연쇄반응 (Polymerase chain reaction)

[0100] 형질전환 후 *tflA* 유전자가 식물 내로 도입되었는지 여부를 확인하기 위하여, 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 구체적으로, 톡소플라빈이 함유된 배지에서 선발된 인디카 벼 형질전환체(IR64)의 잎 절편으로부터 게놈 DNA를 분리한 후, 정방향 프라이머 5'-GCGGCTTGGTGAATTGCTAACGGAA-3'와 역방향 프라이머 5'-AGTTCACCTGTCTCTGTAATGCC-3'를 PCR 반응에 이용하였다. 이때, PCR은 전반응(precycling reaction)으로 94℃에서 5분간 변성시킨 다음, 94℃에서 30초, 60℃에서 40초 및 72℃에서 30초의 순서로 35회 반응을 반복한 후,

마지막 반응에서 72℃에서 10분간 반응시킴으로서 PCR 반응을 종료시켰다. 도 2는 톡소플라빈 형질전환 인디카 벼 식물체의 PCR 분석 결과를 나타내는 그림이다. 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, 형질전환 인디카 벼 식물체에서는 약 500bp의 PCR 산물을 관찰할 수 있었다.

[0101] 6. 형질전환검증 - 서던블롯(Southern blot)

[0102] 상기 인디카 벼의 형질전환 후 *tf1A* 유전자가 식물 내로 도입되었는지 여부를 확인하기 위하여, 서던 블롯 분석을 수행하였다. 구체적으로는, 톡소플라빈이 함유된 배지에서 선발된 인디카 벼 형질전환체(IR64)의 잎 절편으로부터 게놈 DNA를 분리하여 전기영동으로 확인하였다(도 3). 그 다음 DNA를 EcoRI 으로 절단하여 절단 산물을 아가로스 겔 전기영동을 수행하고, 통상적인 서던 블롯 분석 절차에 따라 서던블롯 분석을 수행하였다.

[0103] 서던 블롯 분석을 위한 *tf1A* 프로브(probe) 서열은 다음과 같으며, 각 프로브는 마크로젠(MacroGen)에 의뢰하여 제작하였다. 정방향 프로브 서열은 5'-GCGGCTTTGGTGAATTGCTAACGGAA-3'이며 역방향 프로브 서열은 5'-AGTTCACCTGTCTCTGTAATCGCC-3'이다.

[0104] 도 4은 형질전환된 인디카 벼 식물체의 서던 블롯 분석 결과이다. 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, 형질전환 인디카 벼 식물체에서 양성 밴드를 확인할 수 있었다. 상기 결과로써, 외래 유전자(*tf1A*)가 인디카 벼 식물체로 도입되었음을 알 수 있었다.

[0105] 상기 실시예의 단계를 더 반복하였으며, 그 결과는 표 16에 나타내었다. 표 16는 각 단계별 생존한 인디카 벼 종자의 개수를 나타낸 것이다.

표 16

각 단계별 생존한 종자의 개수 (배지 내 톡소플라빈 농도 : 10 mg/L)

반복시험회수	접종	휴면	선별	전 재분화	재분화	발근	PCR - 양성 개수
1 th	200	200	22	45	16	8	8
2 th	200	200	23				
3 th	200	200	81	145	94	30	30
4 th	200	200	64				
5 th	200	53	49	14	7	6	2
종자생존율 (%)	100	85.3	23.9	20.4	11.7	4.4	4.0

[0107] 본 발명에 의한 형질전환 방법을 사용하였을 때, 최종 형질전환율은 4.0%를 나타내었다. 이는 캘러스 유도가 어려워 형질전환율이 매우 저조한 인디카 벼에서 괄목할 만한 수치이다.

[0108] 인디카 벼와 자포니카 벼의 형질전환 기간 비교

[0109] 1. 인디카 벼의 형질전환

[0110] 종래 캘러스 유도를 이용한 형질전환기간과 본 발명의 형질전환기간을 비교하기 위하여 인디카 벼와 자포니카 벼를 이용한 형질전환시험을 수행하였다.

[0111] 인디카 벼의 형질전환방법은 상기 실시예에 기재된 방법을 사용하였으며, 형질전환기간은 총 8-9주가 소요되었다. 보다 상세하게는, 인디카 벼의 형질전환단계는 세포기 유도단계(3일), 접종단계(3일), 휴면단계(7일), 선별단계(7일), 전재분화단계(14일), 재분화단계(14일) 및 발근단계(7일)로 이루어진다.

[0112] 2. 자포니카 벼의 형질전환

[0113] 자포니카 벼의 형질전환방법은 종래 캘러스 유도 방법을 이용하였으며, 형질전환기간은 총 17~18주가 소요되었다. 보다 상세하게는, 자포니카 벼의 형질전환단계는 캘러스 유도단계(4주), 집종단계(3일), 1차 선별단계(1주), 2차 선별단계(3주), 1차 재분화단계(3주), 2차 재분화단계(4주) 및 3차 재분화단계(2주)로 이루어진다.

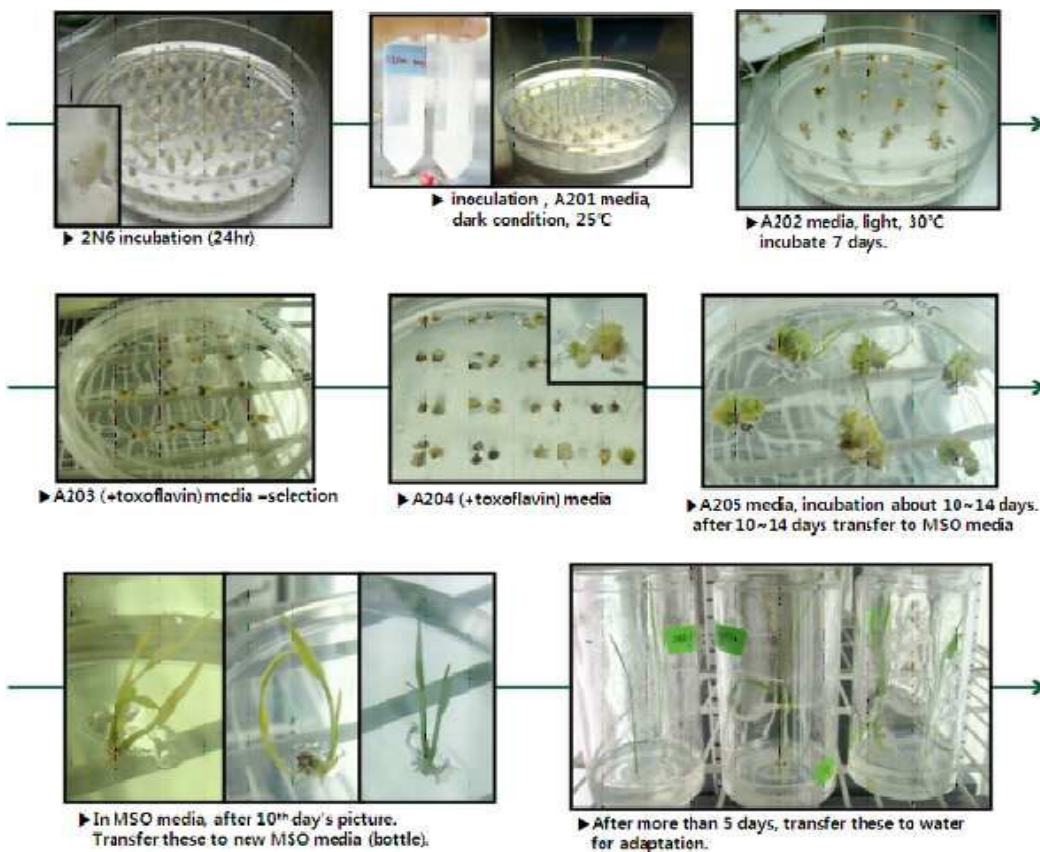
[0114] 자포니카 벼의 형질전환방법은 다음과 같다. 소독한 벼 종자를 pH 5.8로 조정한 캘러스 유도 배지인 2N6 배지에서 한 달간 배양하였다. 이 후, 형성된 캘러스를 모아 pTf1A백터가 형질 전환된 아그로박테리움을 이용 AAM 배지에 30초간 접종한 후, 3MM 종이를 칸 페트리디쉬 안에 접종된 캘러스를 얹어 호일로 싸 빛을 차단한 후 3일 동안 24℃에서 배양하였다. 처음 1주일간은 5mg/L 농도로 톡소플라빈이 들어있는 2N6 배지에서 배양하고, 두 번째 3주간은 10mg/L의 톡소플라빈이 들어있는 2N6배지에 옮겨 배양함으로써 저항성을 갖는 캘러스만을 고르는 작업을 수행하였다. 선별된 캘러스들을 재분화 배지(톡소플라빈 농도 10 mg/ml)로 옮겼다. 3주후 생존한 캘러스들만을 골라 최종적으로 재분화 배지(톡소플라빈 무첨가)에 배양하였으며, 그 결과 4주 후부터 소식물체가 출현하였다. 소식물체들은 기본배지 (MS media)로 옮겨 2주간 배양하였으며 정상 식물과 동일한 과정으로 증식하였다.

[0115] 상기 결과로서, 본 발명의 형질전환방법은 캘러스 유도를 통한 기존의 방법과 비교하여 형질전환 기간을 절반이 하로 단축시키는 것을 확인할 수 있었다.

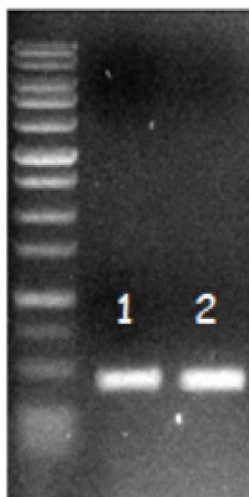
[0116] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

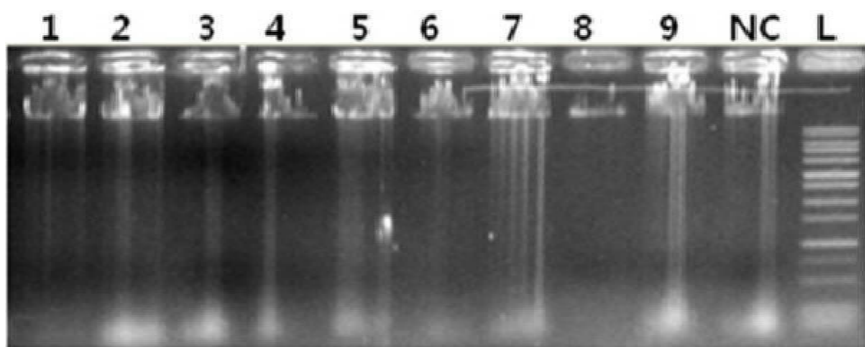
도면1



도면2



도면3



도면4

