

최 종
연구보고서

농지이용 효율화를 위한 개화조절유전자의
형질전환을 통한 조숙성 보리개발에 관한 연구

Development of transgenic barley having
characterization of early maturity time in use
of regulating gene flowing time for the purpose
of enhancement of effect using paddy field

연구기관
동국대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농지 이용 효율화를 위한 개화조절유전자의 형질전환을 통한 조숙성 보리개발에 관한 연구” 과제 (세부과제 “농업특성에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 08월 09일

주관연구기관명 : 동국대학교

총괄연구책임자 : 이 대 원

세부연구책임자 : 이 대 원

협동연구기관명 : 호남농업 연구소

협동연구책임자 : 박 태 일

요 약 문

I. 제 목

농지이용 효율화를 위한 개화조절 유전자의 형질전환을 통한 조숙성 보리개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구 개발 최종 목표는 보리에 *OsMADS1* 유전자를 도입하여 국내 품종 중 형질전환 된 조숙성 보리를 확보하고, 현재 형질전환이 까다로운 것으로 알려진 국내산 재배 보리품종의 일부인 식용보리 및 맥주보리를 가지고 재분화가 잘 된다고 알려진 미성숙배 (Goldstein & kranstad 1986, Lührs & Lörz,1987)를 재료로 하여 형질전환체계를 확립하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 bombardment를 이용하여 보리의 미성숙배에 *OsMADS1* 유전자를 형질전환하고 이를 검정하였다. 또한 미성숙배의 배지 및 배양환경을 개선하고 캘러스의 다량 생산 체계를 확립하였으며, 형질전환 효율 향상을 위해 bombardment의 시기 및 조건을 GUS 분석을 통해 확인하였다. 형질전환 식물체 확인을 위해 PCR 및 RT-PCR로 분석하였으며, 후대계통의 실내 포장검정을 실시하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구개발로 인하여 획득한 단원보리 및 진양보리 등의 형질전환체는 현재 호남농업시험장에서 보관하고 있으며 T3세대에 대한 분리 실험이 필요할 것으로 사료됩니다. 이후 총괄연구책임자의 동의 하에 필요한 국내의 연구기관에 한해 육종재료로서 활용될 수 있음을 밝힙니다.

SUMMARY

(영문 요약문)

1. Title

Development of transgenic barley having characterization of early maturity time in use of regulating gene flowering time for the purpose of enhancement of effect using paddy field

2. Objectives

Purpose of this study was establishment of transformation system of Korean barley cultivars by particle bombardment with *OsMADS1* gene, which was known as control gene for flowering time (An et al. 1994). The immature embryos were used as explants for transformation of some edible and beer barley cultivars.

3. Contents

Optimal medium combinations and improved culture conditions were investigated and established mass production system for callus inductions. The time and various conditions of particle bombardment were identified by GUS analysis for improvement of transformation effect.

Transgenic plants were analyzed by PCR and RT-PCR for gene expression. Agronomic quality examinations for T1 and T2 generations cultivated in green house of Honam Agricultural Research Institute were performed by barley breeders of the institute.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Outlines of Research

1. Purposes and aims of research
2. Contents and aims of research in overall years
3. Aspects of research valuation on overall years

Chapter 2. Current status of related research developed in Korea and other countries

1. Related research status in foreign countries
2. Related research status in Korea

Chapter 3. Contents and results of research

1. Materials and Methods of overall research years
1. 1. Materials and Methods of the first research year
 1. 1. 1. Plant materials
 1. 1. 2. Regeneration
 1. 1. 3. Determination of transformation method
 1. 1. 4. Improvement of transformation efficiency
 1. 1. 5. Selection and Identification of transgenic plants
1. 2. Materials and Methods of the second research year
 1. 2. 1. Plant materials and cultivars
 1. 2. 2. Regeneration
 1. 2. 3. Method of transformation
 1. 2. 4. Improvement of transformation- and regeneration efficiency
 1. 2. 5. Identification and production of transgenic plants
1. 3. Materials and Methods of the third research year

1. 3. 1. Identification of *OsMADS1* gene in transgenic plants
1. 3. 2. Investigation of agronomic characterization of T2 plants
2. Results of overall research years
 2. 1. Results of the first research years
 2. 1. 1. Improvement of media
 2. 1. 2. Determination of transformation method
 2. 1. 3. Improvement of transformation efficiency
 2. 1. 4. Comparative results of callus induction and transformation of different cultivars
 2. 1. 5. *OsMADS1* gene amplification on putative transgenic plants by PCR
 2. 1. 6. Growth of transgenic plants identified with *OsMADS1* gene ex vitro
 2. 2. Results of the second research years
 2. 2. 1. Establishment of mass product system of callus induced from immature embryo
 2. 2. 2. Improvement of culture condition and media for regeneration efficiency
 2. 2. 3. Analysis of regeneration efficiency of embryogenic callus on size
 2. 2. 4. Improvement of transformation methods to enhance viability of transgenic callus
 2. 2. 5. GUS assay of differentiated tissues of transgenic plants
 2. 2. 6. Identification of production of transgenic plants
 2. 2. 7. Investigation of agronomic characterization of T2 barley plants
 2. 3. Results of the third research years
 2. 3. 1. Improvement of transformation efficiency and establishment of transformation methods system
 2. 3. 2. Analysis of T2 barley lines
 2. 3. 3. Investigation of agronomic characterization of T2 barley plants

Chapter 4. Achievements of aims and contribution to related areas

1. Achievements of research aims on the overall years
 1. 1. Aims, evaluation scores and achievements of the first year research
 1. 1. 1. Production of transgenic plants
 1. 1. 2. Improvement of transformation efficiency
 1. 2. Aims, evaluation scores and achievements of the second year research

1. 2. 1. Improvement of transformation efficiency
1. 2. 2. Establishment of mass product system of callus induced from immature embryos
1. 2. 3. Investigation of agronomic characterization and production of transgenic plants with *OsMADS1* gene controlling flowering time
1. 3. Aims, evaluation scores and achievements of the third year research
 1. 3. 1. Establishment of transformation system
 1. 3. 2. Investigation of agronomic characterization of transgenic T2 lines
 1. 3. 3. Analysis of gene expression of T2 barley lines

2. Partial research achievement levels in overall research years
 2. 1. The first year(2001-2002)
 2. 2. The second year(2002-2003)
 2. 3. The third year(2003-2004)

Chapter 5. Application of results

Chapter 6. Information collected from abroad during the research period

Chapter 7. References

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	11
1.	연구개발 목표	11
2.	연차별 연구개발 목표 및 내용	12
3.	연차별 연구평가의 착안점	13
제 2 장	국내의 기술개발 현황	14
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	15
1절.	연도별 연구수행 방법	15
1.	1차년도 (2001) 연구수행	15
가.	실험재료 및 재료	15
나.	식물체 재분화 실험	15
다.	형질전환방법 선발	16
라.	형질전환 효율향상 실험	16
마.	형질전환체 선별 및 확인	16
2.	2차년도 (2002) 연구수행	19
가.	실험 재료 및 품종	19
나.	식물체 재분화 실험	19
다.	형질전환 방법	20
라.	재분화 및 형질전환 효율향상	20
마.	형질전환체 생산 및 확인	20

3. 3차년도 (2003) 연구수행	20
가. 형질전환체 <i>OsMADS1</i> 유전자 확인	20
나. 형질전환 식물의 재분화 및 후대 검정	21
2절. 연도별 연구수행 내용 및 결과	23
1. 1차년도 (2001) 연구수행 내용 및 결과	23
가. 배지 개선	23
나. 형질전환 방법 선택	27
다. 형질전환 효율 향상 실험	28
라. 품종별 callus 유도 및 형질전환 효율 비교	30
마. 형질전환체의 PCR을 통한 <i>OsMADS1</i> 유전자 확인	32
바. <i>OsMADS1</i> 유전자의 형질전환이 확인된 식물체의 외부로 이식	33
2. 2차년도(2002) 연구수행 내용 및 결과	33
가.. 미성숙배 배양 callus의 다량 생산체계수립	33
나. 재분화능을 위한 배지 및 배양조건개선	37
다. 배발생 callus 크기별 재분화능 검정	40
라.. 형질전환 캘러스의 생존율 향상을 위한 형질전환 방법의 개선	41
마.. 형질전환 분화 조직 GUS 분석	43
바. 형질전환체 생산 및 확인	44
사. 맥류의 형질전환체 양성 및 특성조사 (호남작물시험장)	47
3. 3차년도(2003) 연구수행 내용 및 결과	49
가. 형질전환 기술 체계 확립 및 형질전환 효율 향상	49
나. 후대 형질전환 계통 (단원보리, 진양보리)의 분석	50
다. 맥류의 형질전환체 양성 및 특성조사 (호남작물시험장)	54
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	58
1절. 연차별 연구개발 목표의 달성도	58
1. 1차년도 (2001) 연구개발 목표의 달성도	58
가. 형질전환체 생산	58
나. 식물체 형질전환 효율향상	58
2. 2차년도 (2002) 연구개발 목표의 달성도	59
가. 형질전환 효율 향상	59

나. 미숙배배양 callus의 다량 생산 체계 수립	59
다. <i>Os-MADS1</i> 개화조절유전자 형질전환체 및 생육특성조사	59
3. 3차년도 (2003) 연구개발 목표의 달성도	59
가. 형질전환 기술 체계 확립	59
나. 후대 형질전환 계통의 생물검정	59
다. 후대 형질전환 계통의 외래유전자 발현 검정	60
2절. 연도별 세부 연구 추진율	60
1. 1차년도 (2001) 세부 연구율	60
2. 2차년도 (2002) 세부 연구율	61
3. 3차년도 (2003) 세부 연구율	62
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	63
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	64
제 7 장 참고문헌	65

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발 목표와 내용

1. 연구개발 목표

본 과제의 연구 개발 최종 목표는 보리에 *OsMADS1* 유전자를 도입하여 국내 품종 중 형질전환 된 조숙성 보리를 확보하고, 현재 형질전환이 까다로운 것으로 알려진 국내산 재배 보리품종의 일부인 식용보리 및 맥주보리를 가지고 재분화가 가장 잘된다고 알려진 미성숙배 (Goldstein & Kranstadi 1986, Lührs & Lörz, 1987)를 재료로 하여 형질전환체계를 확립함으로써 향후 다음과 같은 목적 및 목표를 달성 하고자 함.

- 유전공학기술을 이용한 유용 유전인자 도입 기술 체계 확립
 - 개화조절 유전자(*OsMADS1*)가 도입된 조숙성 보리 개발
 - 조숙성 등 유전자 조작에 의한 작물 개발
- 보리, 밀 숙기의 조숙화로 이모작 작부체계의 안정화
 - 성숙기 : 보리 5월 말 → 5월 25일
- 맥류의 *OsMADS1* 유전자 형질전환 기술 개발
 - 형질전환 방법 개선
 - *Agrobacterium* 혹은 Particle bombardment를 이용한 형질전환 방법 개선
 - 형질전환체 분화 시기별 검정
- 맥류의 형질전환 기술 체계 확립
 - *OsMADS1* 유전자 형질전환
 - 형질 전환체의 분화 단계별 유전자확인 검정
- 맥류의 형질전환체 양성 및 특성검정
- 맥류의 형질 전환체 후대 검정
 - 후대 *OsMADS1* 유전자 확인
 - *OsMADS1* 유전자 형질전환체 생육특성조사

2. 연차별 연구개발 목표 및 내용

구 분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 맥류의 <i>OsMADS1</i> 유전자 형질전환 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환 방법 선발 - 형질전환 효율 향상 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환 방법 선발 <ul style="list-style-type: none"> - 미숙배 배양 캘러스 - 형질전환 방법 <ul style="list-style-type: none"> · Particle bombardment · <i>Agrobacterium</i> ○ 배지 및 배양환경 개선 <ul style="list-style-type: none"> - 배지 개선: CI, W14, C17, MS 등 <ul style="list-style-type: none"> · 배지성분 및 성장조절물질 개선 - 배양 환경 개선 : 배양시기, 진처리, 배양조건
2차년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 맥류의 형질전환 기술 체계 확립 <ul style="list-style-type: none"> - <i>OsMADS1</i> 유전자 형질전환 - 형질 전환체의 분화 단계별 유전자 확인 검정 - 형질전환 식물의 온실 이식 형질 발현 검정 ○ 맥류의 형질전환 효율 증진 <ul style="list-style-type: none"> - 맥류 형질전환 효율 향상 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환 효율 향상 <ul style="list-style-type: none"> - 형질전환 캘러스의 생존율 향상을 위한 형질전환 방법의 개선 <ul style="list-style-type: none"> · 형질전환 시기 · 캘러스의 상태 - 형질전환 분화조직 GUS 분석 ○ 미숙배배양 callus의 다량 생산 체계 수립 <ul style="list-style-type: none"> - 계대배양에 따른 캘러스의 활력 검정 <ul style="list-style-type: none"> · 분화능 및 생존력 - 형질전환 캘러스의 분화능 검정 - 형질전환 분화식물체의 재분화능 검정 <ul style="list-style-type: none"> · 배지 및 배양조건 개선
3차년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환 기술 체계 확립 및 단계별 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 형질 전환체의 분화 단계별 유전자 확인 검정 체계 수립 ○ 형질전환 식물체의 후대 검정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 형질전환 기술 체계 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 분화 식물체의 형질전환 효율 향상 ○ 형질전환체 검정 <ul style="list-style-type: none"> - Southern blot (PCR -> Sequencing) - Northern blot (RT-PCR -> Sequencing) - 재분화식물체의 형질전환 확인 PCR 등 ○ 형질전환 식물체의 재분화 및 후대 검정 <ul style="list-style-type: none"> - 후대 육성계통의 실내 형질전환 검정 <ul style="list-style-type: none"> · 온냉조절 온실 이용 - 형질전환 계통의 포장 검정 <ul style="list-style-type: none"> · 출수기, 개화기, 성숙기 비교

3. 연차별 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척도 (점수)
1차년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> ○형질전환체 생산 ○식물체 형질전환 효율향상 	50 50
2차년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> ○형질전환효율 향상 ○식물체 재분화 시스템 확립에 의한 형질전환 실험 ○형질전환체 배양 및 특성검정 	40 35 25
3차년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> ○형질전환여부 확인 및 형질전환 효율향상 ○형질전환 개체의 생물검정 및 외부도입 유전자 확인 ○후대 형질전환계통의 생물검정 및 외래유전자 발현 검정 	40 30 30
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ○형질전환 체계 확립 및 형질전환 효율향상 ○후대 형질전환계통의 외부도입 유전자 확인 ○후대 형질전환계통의 포장검정을 통한 도입 유전자 발현 여부 확인 	40 30 30

제 2 장 국내외 기술개발 현황

전 세계적으로 보리의 재분화 및 형질 전환은 무척 까다로운 것으로 알려졌다. 재분화가 성공한 사례는 독일의 Luehrs et al (1987)에 의해 최초로 이루어 졌으며 그때부터 PEG (Lazzeri et al. 1991)나 Particle gun (Wan and Lemaux et al. 1994, Cho et al. 1998)등에 의한 형질전환이 이루어져 오다가 1997년에는 *Agrobacterium*에 의한 형질전환의 성공 사례가 발표되었다(Tingay et al. 1997, Trifonova et al. 2001, Fang et al. 2002). 현재는 particle gun에 의한 방법과 *Agrobacterium*을 매개로한 방법들이 주로 사용되고 있으며 유전자의 single copy가 주로 유입되어 장점이 많은 *Agrobacterium*을 매개로한 방법을 체계화 시키려는 노력들이 이어지고 있다.

보리의 형질전환 재료는 현재까지 주로 미성숙배만을 사용하고 있으며 성숙배나 유묘등 다른 재료를 사용하는 것은 아직까지 보고 된 바가 없다. 미성숙배를 사용하기 위해서는 보리의 재배와 관리가 필수적이다. 또한 자연 상태에서 재배하는 경우 오염률이 높아 형질전환 효율이 무척 떨어지며 대부분은 실패로 이어지게 된다. 따라서 최소한 이에 필요한 냉난방 조절이 되는 배양실이나 온실을 갖추는 것이 필요하다. 또 한 가지는 *Agrobacterium*을 매개로한 방법으로 형질전환이 잘되는 품종은 유럽산 golden promise라는 한 가지 품종만 국한되어 있는 현실이다.

그리고 국내에서는 보리의 형질전환에 대한 지원 자체가 미흡하여 보리 형질전환에 관심이 깊은 연구소들의 경우 숙련된 연구 인력 확보나 냉난방 조절이 되는 온실이나 배양실을 등 시설 확보가 미흡하기 때문에 효율적인 연구가 어려운 경우가 많다. 다행히 동국대학교에서는 맥류전용 냉난방 온실을 갖추고 있어 재료공급을 원활히 할 수가 있었고 국내에선 처음으로 작물과학원의 호남 농업연구소와 함께 형질전환체를 T2 세대까지 육성을 할 수가 있었던 것이다.

그밖에 국내의 연구 현황은 작물과학원과 호남농업연구소 등이 꾸준히 노력하고 있으며 주관연구기관인 동국대학교 본 연구팀과 유기적인 협조체제하에 형질전환 기술개발을 위해 끊임없는 노력을 경주하고 있다.

제 3 장 연구 개발수행 내용 및 결과

1절. 연도별 연구수행 방법

1. 1차년도 (2001) 연구수행

가. 실험재료 및 재료

- 보리의 재분화 및 형질전환을 위한 실험재료 중 가장 효율이 높은 것으로 알려진 미성숙배를 이용하였음 (총 14품종).

품종별 구분	식용 보리	맥주 보리
효율성실험 품종	올보리, 새찰쌀 보리	단원보리, 진양보리, 큰알보리, 사천6호, 사천29호, 남향보리, 제주보리, 대연보리, 대영보리, 산호보리, 대백보리, 일진보리

나. 식물체 재분화 실험

1) 배지선별

배지 및 배양환경 개선을 위해 기본배지인 MS (Murashige-Skoog, 1962) 및 배지조성을 변형시킨 CI (P. G. Lemaux 1994), PL (Yuechun et al. 1994), L1 (Paua A. Lazzeri 1991)를 이용하여 적정성 여부를 판단하였음.

2) 성장조절물질 및 첨가농도 선별

기본배지 MS, CI, PL, L1에 성장조절물질 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid를 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 4.0 mg/L의 단독처리와 Benzylaminopurine 1.0 mg/L를 혼용처리, Naphtalene acetic acid 1.0, 2.0 mg/L의 단독처리와 Benzylaminopurine 1.0 mg/L를 혼용처리하여 callus 유도율을 높여, 재분화 시스템을 안정적으로 구축하였음.

3) 당성분 개선 및 배지 응고제 농도에 따른 뿌리 발달 영향

- 당 첨가물의 영향에 따른 embryogenic callus 유도율의 조사는 통상적으로 당 첨가물로서 사용하는 Sucrose와 Maltose를 각각 30 g/L를 사용하여 비교함.

- 뿌리형성에 미치는 영향 분석을 위해 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4%까지의 다양한 양의 phytagel을 첨가하여 뿌리발달의 영향을 분석함.

다. 형질전환방법 선발

1) *Agrobacterium tumefaciens*. strain LBA4404

Agrobacterium 접종 후, hygromycine 으로 선별한 후 효율을 분석함.

2) Particle bombardment

Particle gun 의 경우에는 phosphinotrisin(PPT)가 3, 5 mg/L첨가 된 배지에서 선별 후, 효율을 분석함.

라. 형질전환 효율향상 실험

1) Osmotic treatment

Particle bombardment을 통해 사용된 유전자의 효과적인 도입을 위한 전처리 방법으로 osmotic treatment (sorbitol 0.2 M , mannitol 0.2 M 각각 첨가)를 하였으며, transgenic callus를 histochemical assay를 통해 적정성 여부를 확인함. histochemical assay를 위한 실험은 *GUS* gene이 삽입 된 pBI121을 사용하였음 (Fig. 1.).

2) 선별시기별 효율비교

Particle bombardment 후 선별시기를 조사하기 위해 1, 3, 5, 7일 등으로 선별하여 적정시기를 판정하였음.

3) Bio-rad PDS1000 과 국산 particle bombardment 장비의 성능 비교 실험

유전자 도입을 위한 전 처리 과정의 재현성을 확인하기 위해 particle bombardment는 bio-rad 社 와 영흥과학 社의 particle bombardment장비를 이용하여 *GUS* assay를 통해 형질전환 효율을 확인함.

마. 형질전환체 선별 및 확인

1) vector

- 개화촉진을 유도하기 위해 사용된 vector는 pGA2322 이며, 포항공대 기능유전체 실험실로부터 분양 받아 사용하였음(Fig. 2.).

- 형질전환 방법으로 효과적인 particle bombardment를 이용하여 선별 Marker 로써 *bar* gene (제초제 저항성 유전자) 이 포함된 pUBA를 사용함(Fig. 3.).

- 1, 2차 선별과정은 재분화 배지에 제초제인 PPT를 각각 3, 5 mg/L 씩 첨가하여 목적유전자인 *OsMADS1* gene (개화촉진유전자) 이 삽입된 형질전환체를 생산하였음.

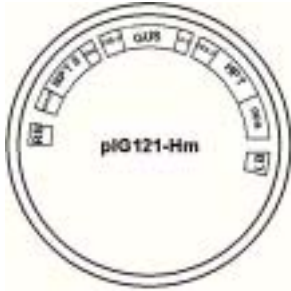


Fig.1. pBI121
(linked *GUS* gene)



Fig.2. pGA2322
(linked *OsMADS1* gene)

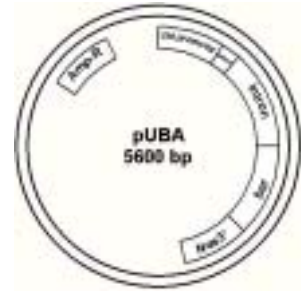


Fig. 3. pUBA
(linked *bar* gene)

2) primer 제작

pGA2322에 삽입되어 있는 개화촉진유전자 *OsMADS1*과 보리의 유전자 중 상동성이 존재하는 부위를 배제하고 specific primer를 제작하여 사용함(Fig. 4).

- *OsMADS1* gene 과 가장 유사한 보리의 유전자는 gene bank search 결과 *Hordeum vulgare* mRNA for MADS-box protein 7 (m7 gene) 로 Identities = 441/507 (86%) 를 나타내고 있음.

- *OsMADS1* cDNA sequence 와 Primer 자리

부분유사성을 보이는 부분은 1번부터 600번까지이므로, 이후의 자리에서 primer를 제작함(Fig. 4.)

1	agaaaaacta	gcttgcaaa	gggatagagt	agtagagaga	gagagagagg	agaggaggag
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
61	gaagaagatg	gggaggggga	aggtggagct	gaagcggatc	gagaacaaga	tcagccggca
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
121	ggtgacgttc	gccaagcgca	ggaacggcct	gctcaagaag	gcctacgagc	tctccctcct
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
181	ctgcgacgcc	gaggtcgccc	tcatcatctt	ctccggccgc	ggccgcctct	tcgagtcttc
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
241	cagctcatca	tgcattgaca	aaaccttggg	gaggtaccgc	agctgcaact	acaactcaca
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
301	ggtgcagca	gctccagaaa	acgaaattaa	taccaagaa	tacctgaagc	tgaaaacaag
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
361	agttgaattt	cttcaacca	cacagagaaa	tattcttggt	gaggatttgg	gccactaag
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
421	catgaaggag	ctggagcagc	ttgagaacca	gatagaagta	tcctcaaac	aaatcaggtc
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
481	aagaaagaac	caagcactgc	ttgatcagct	gtttgatctg	aagagcaagg	agcaacagct
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
541	gcaagatctc	aacaaagact	tgaggaaaaa	gttacaggaa	accagtgagc	agaatgtgct
	*****	*****	*****	*****	*****	*****
601	ccatatgtcc	tggcaagatg	gtggtgggca	cagcggttct	agcactgttc	ttgctgatca
661	gcctcatcac	catcagggtc	ttctccacc	tcaccagat	cagggtgacc	attccctgca
				>>	>>>>>>>>	>>>
721	gattgggtat	catcacccctc	atgctcacca	tcaccaggcc	tacatggacc	atctgagcaa
781	tgaagcagca	gacatggttg	ctcatcacc	caatgaacac	atcccatccg	gctggatatg
841	atgtgtgtgt	tcagttcagg	cttcaggctt	cagagaagcc	aatgcaaca	gtgtcctgta
901	atccagtaat	tacaggcat	atgtaatgta	atgtaatgta	atccctgac	tatatattgc
961	taagtacgtg	cgtgctctct	tacgaccttc	tccccaaac	agttaatcag	gggaataata
1021	atttcgtttg	atgcacgtac	tgtatgtctg	tatctgtcac	tgtatcgtag	gaccgtccat
1081	gtataacaat	ttccgttttg	gatgtggtaa	caattaattg	gcacttaaat	ttatatttgt
	<	<<<<<<	<<<<<			
1141	gatg					

Fig. 4. *OsMADS1* cDNA sequence and Primer

*** 유사성 부위

>>> Forward primer <<<< Reverse primer

3) PCR을 통한 형질전환 확인

선별된 개체를 제초제인 PPT 250 mg/L를 spray 함으로써 control과 비교하여 생존한 개체를 선별 확보하고, *OsMADS1* 유전자내의 specific primer (Forward: 5'-ATCAGGGTGACCATTC-3', Reverse 5'-CCACATCCAAAACGGAA-A-3')를 이용해 PCR을 수행함.

4) BASTA[®] spray를 통한 pot 에서의 selection

유전자가 전달된 재분화체를 pot로 이식하여 PPT 250 mg/L를 spray 하여 선별함.

2. 2차년도 (2002) 연구수행

가. 실험 재료 및 품종

- 보리의 재분화 및 형질전환을 위한 실험재료 중 가장 효율이 높은 것으로 알려진 미성숙배를 이용하였음(총 15품종).

품종별 구분	식용 보리	맥주 보리
효율성실험 품종	올보리, 재강보리, 쌀 보리	단원보리, 진양보리, 큰알보리, 사천6호, 사천29호, 남향보리, 제주보리, 대연보리, 대영보리, 산호보리, 대백보리, 일진보리

나. 식물체 재분화 실험

1) 배지배양조건 개선

배지 및 배양환경 개선을 위한 기본배지인 MS 및 배지조성을 변형시킨 MS1 (Murashige-Skoog, 1962), MS2 (Thomas, 1996), MS3 (T. Gagio 1995), MS5 (Dahleen 2002) 과 PL (Wan & Lemaux, 1994)에 생장조절물질 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid를 2 혹은 2.5 mg/L의 단독처리와 Dicamba 2.5 mg/L 단독처리 및 Benzylaminopu-line 0.1 mg/L의 혼용처리를 이용하여 미성숙배 다량생산에 필요한 시스템을 구축하였다.

다. 형질전환 방법

Particle bombardment 사용 후, PPT 3-5 mg/L 첨가된 배지에서 선별.

라. 재분화 및 형질전환 효율 향상

1) 전처리 과정 및 유전자 도입방법 개선

Particle bombardment를 통해 전달된 유전자의 효과적인 도입을 위한 전처리 방법으로, osmotic treatment (sorbitol 0.2 M , mannitol 0.2 M 각각 첨가)를 하였으며, 전처리 과정에서 DNA 농도 및 particle의 양을 조절하여 효율을 향상시켰다.

2) GUS 분석을 통한 형질전환 향상여부 확인

형질전환효율 향상 여부를 분화 조직별로 GUS 분석을 통해 확인하였다. GUS 활성분석은 histochemical assay를 위해 GUS gene이 삽입된 pBI121의 HPT 유전자를 *bar* gene으로 전환하여 선별 Marker로써 사용하였다.

마. 형질전환체 생산 및 확인

1) PCR을 통한 형질전환체를 확인

OsMADS1 유전자내의 specific primer (Forward: 5'-ATCAGGGTGACCA-TTCCC-3', Reverse 5'-CCACATCCAAAACGGAAA-3')를 이용해 PCR을 수행하여 확보된 T0는 growth chamber 내에서 18°C 16시간 명조조건과 16°C 8시간의 암조건을 수행하였다.

4) BASTA[®] spray를 통한 pot 에서의 selection

형질전환체라 추정되는 보리로부터 종자를 받아 발아(T1)시켜 춘화처리 후 약 3주 정도 재배한 후 PPT 250 mg/L를 spray 하여 선별함.

3) 포장검정

생산된 형질전환식물체를 작물과학원 호남농업연구소에서 비교 실험하여 포장검정함.

3. 3차년도 (2003) 연구수행

가. 형질전환체 *OsMADS1* 유전자 확인

1) PCR을 통한 분석

OsMADS1 유전자내의 specific primer (Forward: 5'-ATCAGGGTGACCA-TTCCC-3', Reverse: 5'-CCACATCCAAAACGGAAA-3')를 이용해 PCR로 확인한 후, *OsMADS1* 유전자의 전체적인 분석을 위해서 Solgent Sequencing Center에 의뢰를 하였음. First PCR primer (Forward: 5'-AGAAAACTAGC-TTGCAAAGGGGAT-3', Reverse: 5'-CATCACAAATATAAATTTAAGTGC-CA-3'), Nested PCR primer (Forward:5'-TGAAGCGGATCGAGAACAAGA-T-3' Reverse: 5'-TTATACATGGACGGTCCTACGAT-3')

2) RT-PCR을 통한 분석

형질전환체의 RNA를 추출한 후, Improm-II reverse transcription system (Promega)을 사용하여 RT-PCR로 확인하였음.

3) 제초제살포를 통한 형질전환체 확인

전년도에 채종한 종자로부터 발아한 T2세대와 T3세대를 제초제인 PPT 250 mg/L 살포를 통해 식물체의 생존 여부를 대조군과 비교하여 확인하였다.

나. 형질전환 식물의 재분화 및 후대 검정

1) 보리 형질전환체의 후대분석

호남 작물 농업시험장의 GMO 온실에서 격리 재배된 형질전환체 후대 T2 총 두 품종(단원보리 11계통 102개체, 진양보리 3계통 29개체)을 분석.

OsMADS1 gene Transformants Lines(T2)

단 207 -1-1	단 207 -5-1	단 208 -1-1	단 209 -1-1
단 207 -1-2	단 207 -5-2	단 208 -1-2	단 209 -1-2
단 207 -1-3	단 207 -5-3	단 208 -1-3	단 209 -1-3
단 207 -1-4	단 207 -5-4	단 208 -1-4	단 209 -1-4
단 207 -1-5	단 207 -5-5	단 208 -1-5	단 209 -1-5
단 207 -1-6	단 207 -5-6	단 208 -1-6	단 209 -1-6
단 207 -1-8	단 207 -5-7	단 208 -1-7	단 209 -1-7
단 207 -1-9	단 207 -5-8	단 208 -1-8	단 209 -1-8
단 207 -1-10	단 207 -5-9	단 208 -1-9	단 209 -1-9
	단 207 -5-10	단 208 -1-10	단 209 -1-10
단 207 -2-1			
단 207 -2-2	단 207 -6-1	단 208 -2-1	단 209 -2-1
단 207 -2-3	단 207 -6-2	단 208 -2-2	단 209 -2-2
단 207 -2-5	단 207 -6-3	단 208 -2-3	단 209 -2-3
단 207 -2-6	단 207 -6-4	단 208 -2-4	단 209 -2-4
단 207 -2-7	단 207 -6-5	단 208 -2-5	단 209 -2-5

단 207 -2-8	단 207 -6-6	단 208 -2-6	단 209 -2-6
단 207 -2-9	단 207 -6-7	단 208 -2-7	
단 207 -2-10	단 207 -6-8	단 208 -2-8	
	단 207 -6-9	단 208 -2-9	
단 207 -3-1	단 207 -6-10		
단 207 -3-3		단 208 -3-1	
단 207 -3-4		단 208 -3-2	
단 207 -3-6		단 208 -3-3	
단 207 -3-7		단 208 -3-4	
단 207 -3-8		단 208 -3-5	
단 207 -3-9		단 208 -3-6	
단 207 -3-10		단 208 -3-7	
		단 208 -3-8	
단 207 -4-1		단 208 -3-9	
단 207 -4-2			
단 207 -4-3			
단 207 -4-4			
단 207 -4-5			
단 207 -4-6			
단 207 -4-7			
단 207 -4-8			
단 207 -4-9			
단 207 -4-10			

주1) "단"은 단원보리 유래 형질전환체임

주2) 1년차 및 2년차에 출수기와 개화기가 빠른 계통

OsMADS1 gene Transformants Lines(T2)

진 902 -1-1	진 902 -2-1	진 902 -3-1	
진 902 -1-2	진 902 -2-2	진 902 -3-2	
진 902 -1-3	진 902 -2-3	진 902 -3-3	
진 902 -1-4	진 902 -2-4	진 902 -3-4	
진 902 -1-5	진 902 -2-5	진 902 -3-5	
진 902 -1-6	진 902 -2-6	진 902 -3-6	
진 902 -1-7	진 902 -2-7	진 902 -3-7	
진 902 -1-8	진 902 -2-8	진 902 -3-8	
진 902 -1-9	진 902 -2-9	진 902 -3-9	
진 902 -1-10		진 902 -3-10	

주1) "진"은 진양보리 유래 형질전환체임

주2) 1년차 및 2년차에 출수기와 개화기가 빠른 계통

2) 포장검정

생산된 형질전환식물체를 호남작물시험장에서 비교 실험하여 포장 검정함.

- 실험재료 : *OsMADS1* 형질전환체 46계통
(단원보리 유래 39, 진양보리 유래 7)
대비품종 : 단원보리, 진양보리
- 파종일 : 2003년 11월 18일
- 시비 : N-P2O5-K2O = 12-8-7kg/10a(분시비율 기비:추비= 60:40)
- 농업특성 : 출현엽수, 분얼수, 개화기, 출수시, 출수기, 간장, 수장, 망장, 일수립수, 수수, 천립중 등

2절. 연도별 연구수행 내용 및 결과

1. 1차년도 (2001) 연구수행 내용 및 결과

가. 배지 개선

1) 배지 종류, 배지성분 및 성장조절물질 개선

각 배지별 embryogenic callus 유도효율을 조사하기 위하여 조직배양배지로 보편적으로 널리 쓰이고 있는 MS 배지와 CI 배지, 보리에서 특히 callus 유도에 효과적으로 알려진 L1, PL배지를 대상 (Table 1.) 으로 하여 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), Benzylaminopurine (BAP), Naphtalene acetic acid (NAA)를 단독 및 혼용 처리하여 본 결과 PL 배지에 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid 2.5 mg/L 를 첨가하였을 때 가장 좋은 효율을 확인함.

다음에서 보여지는 기본배지 MS, CI, L1, PL 배지에 식물생장조절 물질을 단독 및 혼용처리하여 본 결과 MS 배지가 가장 효율이 낮은 것으로 나타났으며, 그 중 PL배지가 보다 높은 효율은 나타내었으며, 2,4-D, NAA, BAP를 혼용처리한 결과보다 2,4-D를 단독으로 처리한 결과가 더 높은 효율을 나타내었으며, 지금까지의 실험구 중 PL 배지에 2,4-D 첨가량은 2.5 mg/L이 가장 높은 효율을 나타내었음(Fig. 5).

Table 1. Composition of culture media used for callus induction from immature embryo of barley

Compound	MS	CI	L1	PL(mg/L)
NH ₄ NO ₃	1650	165	750	1650
KNO ₃	1900	1900	1750	1900
KH ₂ PO ₄	170	170	200	170
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	370	350	370
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	440	450	440
MnSO ₄ · H ₂ O	22.3	16.9	15	22.3
H ₃ BO ₄	6.2	6.2	5	6.2
ZnSO ₄	8.6	8.6	7.5	8.6
KI	0.83	0.82	0.75	0.83
NaMoO ₄ · H ₂ O	-	0.025	0.25	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	-	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	-	-	0.025	0.025
Na ₂ EDTA	37	-	37	37.3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	28	-	28	27.8
FeNa ₂ EDTA · 2H ₂ O	-	40	-	-
myo-inositol	100	2000	100	250
nicotinic acid	0.5	-	1	-
pyridoxine	0.5	-	1	-
thiamine-HCl	0.1	0.4	10	1
ascorbic acid	-	-	1	-
p-aminobenzoic	-	-	1	-
ca-pantothenate	-	-	0.5	-
choline chloride	-	-	0.5	-
folic acid	-	-	0.2	-
riboflavin	-	-	0.1	-
biotin	-	-	0.005	-
citric acid	-	10	-	-
glutamine	-	600	750	-
proline	-	-	150	690
asparagine	-	-	100	-
casein hydrolysate	1000	300	-	1000
sucrose	-	-	-	-
maltose	30000	30000	30000	30000
phytagel	3000	3000	3000	3000

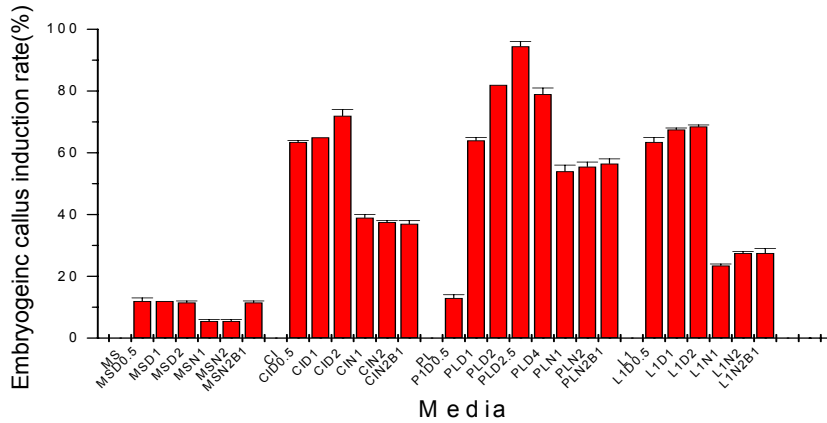


Fig. 5. Effects of concentration of plant growth regulators on embryogenic callus formation from scutellum of barley.

Basal Media : MS , CI, L1, PL

* D: 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid B: Benzylaminopurine N: Naphtalene acetic acid

2) 당 성분 개선 :

Maltose를 사용하는 것이 sucrose를 사용하는 것보다 약 30 %이상의 높은 embryogenic callus 형성율을 나타냄(Table 2.).

Table 2. Effect of sugar supplement in PL medium

Medium	Sugars ^a (g/L)		Embrogenic calli ^b
	Sucrose	Maltose	
PL	30		+
	30		++
	30		+
		30	+
		30	+++
		30	++

a) Sugares were added to PL basal medium.

b) +, poor(10-30%) ; ++, moderate(31-70%) ; +++, high(71-100%)

3) 배지 응고제 :

3%에서 직경이 굵은 뿌리 발달 효율이 20%이상 높은 것으로 확인(Table 3).

Table 3. Effect of solidifying agent on medium

Medium	Solidifying agent ^a (g/L)	Root formation ^b
	Phytigel	
1/2 MS	0.25	+
	0.5	++
	1	+
	2	+
	3	+++
	4	++

a) Solidifying agents were added to 1/2 MS medium

b) +, poor(10-30%) ; ++, moderate(31-70%) ; +++, high(71-100%)

4) 미성숙배 배양 캘러스

작물 형질전환을 위해서 효율이 높은 재분화 체계를 확립하는 것이 중요하다. 따라서 다년간의 실험을 통하여 미성숙배의 scutellum 으로부터 callus를 유기시켜 약 20-30개의 싹을 형성하는 재분화 시스템을 확보하여 국내산 보리품종들에 적용시켜 보았으며 실험 된 품종 모두에서 재분화가 잘 이루어지는 것으로 나타났습니다 (Fig. 6).

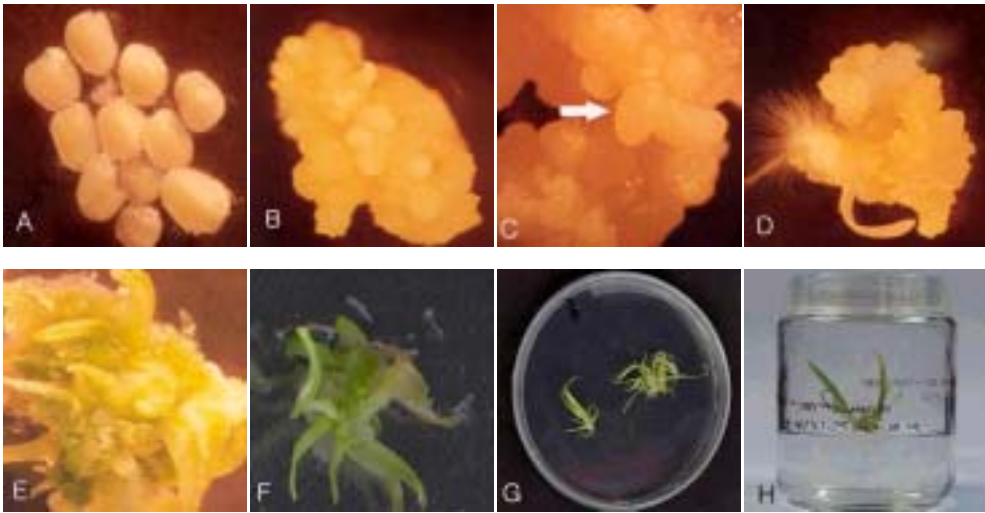


Fig. 6. Development stage of barley regeneration *in vitro* culture.

A: Immature embryo on osmotic treatment medium, B: Callus induction on PL medium supplement with 3 mg/L of basta, C: The arrow indicate Embryogenic callus formation on PL medium supplement 5 mg/L of basta, D: Shoots developed on FHG medium, E~G: Formation of multiple shoots on FHG media. H: Rooting initiation on 1/2 MS medium with 1mg/L of BAP

나. 형질전환 방법 선택

현재까지 보리의 형질전환 방법으로 주로 이용되고 있는 particle bombardment (Kantha et al., 1989) 와 *Agrobacterium* (Tingay et al., 1997)을 매개로 한 방법을 사용하고 있으며, 본 실험실에서 Particle bombardment와 *Agrobacterium*을 매개로 한 형질전환방법을 실시하고 GUS assay를 통해 효율을 비교하여 본 결과 두 가지 방법 모두가 약 10-20%의 GUS의 염색반응 현상을 나타내었고, particle bombardment의 경우는 BASTA[®]로 selection을 실시하였으며, *Agrobacterium*의 경우에는 hygromycine으로 selection을 실시함.

그 결과, particle bombardment의 경우에는 PPT가 3, 5 mg/L첨가 된 배지에서 약 4%의 selection이 나타났으나 hygromycine의 경우에는 다양한 조건에서도 selection이 잘 이루어지지 않았음.

따라서, 단기간에 형질전환이 가능한 방법으로는 particle bombardment이라 판단되어 이후 실험에서는 particle bombardment만을 이용하였으며, 다양한 실험을 실시하여 형질전환 효율을 향상시켰음.

다. 형질전환 효율 향상 실험

1) Osmotic treatment를 통한 transformation 효율향상

계대배양 0, 3, 5, 7일 후의 미성숙배를 Tissue culture testplate (8×12) (Fig. 7)에 넣고, GUS assay 결과를 분석한 결과 osmotic treatment를 통한 효과를 확인함(Fig. 8).

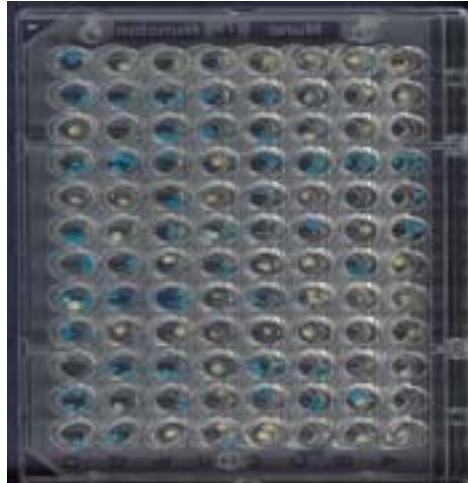


Fig. 7. Effects of histochemical assay after particle bombardment on the immature embryos

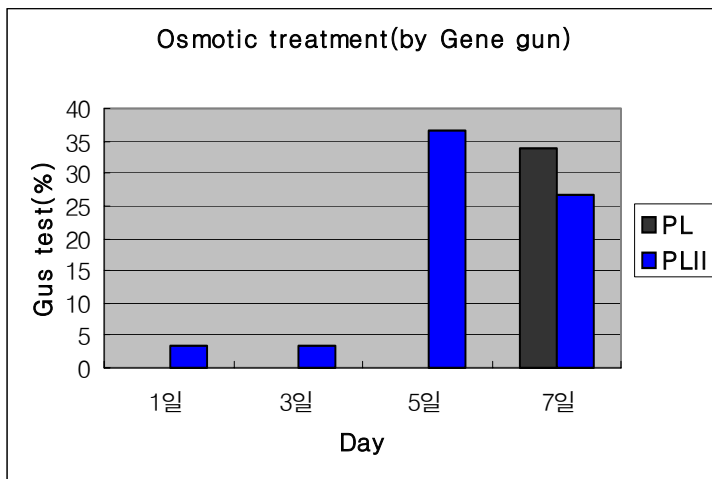


Fig. 8. GUS assay with histochemical reaction after osmotic treatment
PL: non-osmotic treatment, PLII: osmotic treatment

2) Bombardment 실시 및 이후 선별 과정

Bombardment 후, selection 배지 치상 적정 시기는 지금까지 연구 결과를 보면 1일에서 2일 사이로 나타나고 있다(Wan Y. 1994). 1, 3, 5, 7, 10, 15일로 하여 실험해본 결과 embryogenic callus 형성의 경우 1, 3일의 경우 약 3-4% 5일은 10% 7일은 12 %, 10일 30% 15일 40% 정도로 유지되나 이를 다시 2차 선별배지에 치상하였을 경우 7일 이후의 경우 유도된 callus의 신초 형성율이 1 % 밖에 지나지 않았으며 대부분은 부정근 형성만 이루어지는 것으로 거의 selection 효과를 나타내지 못하였다. 그러나 1일 이후 치상 후 선별된 embryogenic callus의 경우에는 약 30 %의 신초 형성율을 나타내었으므로 1일 이후 치상하는 것이 가장 적절하다고 판단되었음(Table 4).

Table 4. Effects of selection time on multiple shoots induction of transgenic plants.

Days in culture	No. of scutellum bombarded	No. of callus selected(A)	multiple shoots induced(B)	Efficiency(%) (B/A)×100
1	233	7	2	28.57
3	255	10	1	10
5	240	24	-	-
7	300	36	-	-
10	290	87	-	-
15	300	120	1	1.2

3) 국내벤처 회사인 영흥과학社 Gene-Gun system 과 Bio-rad社 PDS1000 system 성능 비교

영흥과학社 Gene-Gun system 과 Bio-rad社 PDS1000 system의 성능비교는 GUS gene이 삽입된 pBI121을 particle bombardment 하여 histochemical assay를 한 결과로 분석함.

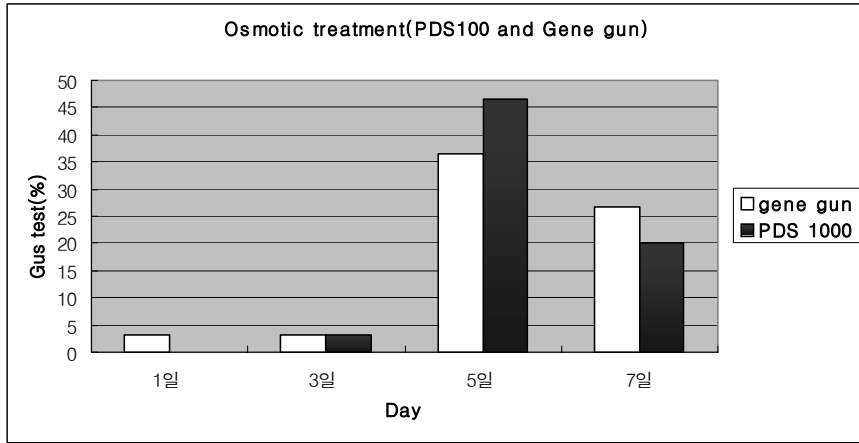


Fig. 9. Comparative analysis of GUS assay effects between gene gun systems of Yonghung Sci. Co. (domestic brand) and Bio-rad Co. (abroad brand)

대부분의 실험실에서는 뚜렷한 검증 없이 고가의 Bio-rad 社의 장비를 사용함으로써 많은 외화 낭비를 초래하고 있는바 국내 벤처회사인 영흥과학사에서 제작한 Gene-Gun의 성능을 이와 비교하였다. 위 실험을 통해 두 제품간의 유의적인 차이는 발견하지 못함. 따라서 국산 장비를 사용하여도 효율적인 측면에서 문제가 없는 것으로 판단됨

라. 품종별 callus 유도 및 형질전환 효율 비교

1) 국내산 보리품종 중 겉보리 1품종과 쌀보리 1품종, 맥주보리 13품종에 대해 particle bombardment를 통한 형질전환을 시도하여 다음과 같은 결과를 얻었음 (Table 5.).

Table 5. Efficiency of basta selection in various barley cultivars

Cultivars		No. of IE ^a bombarred(A)	No. of calli selected(B)	No. of calli selected(C)	1st selection efficiency(B/A) ×100%)	2nd selection efficiency(%)	No. of calli having plantlet
겉보리	올보리	1490	176	58	11.8	32.95	11
쌀보리	새찰쌀보리	1924	734	189	38.14	25.7	3
맥주보리	단원보리	1336	568	122	42.51	21.47	11
	진양보리	2786	918	326	32.9	35.5	12
	큰알보리	300	-	-	-	-	-
	사천6호	356	-	-	-	-	-
	사천29호	300	16	-	5.3	-	-
	남향보리	300	12	-	4	-	-
	제주보리	289	5	-	1.73	-	-
	대연보리	450	20	-	4.4	-	-
	대영보리	412	11	-	2.6	-	-
	산호보리	525	24	3	4.57	12.5	-
	대백보리	300	12	-	4	-	-
	일진보리	373	4	-	1.07	-	-

a) IE : immature embryo

2) 외부로 이식 후 제초제 spary를 통한 Basta 저항성 형질전환체 선별
*ex vitro*에 이식된 7개체를 PPT 250 mg/L으로 spray하여 한 개체를 선별함.



Fig. 10. Selection of transgenic plants by PPT spray (basta 250mg/L)
 A: photo before basta spray, B: photo after basta spray

마. 형질전환체의 PCR을 통한 *OsMADS1* 유전자 확인

선별된 개체의 앞에서 genomic DNA를 추출하여 *OsMADS1* 과 보리의 MADS box에서 상동성이 존재하지 않는 부위에서 specific primer를 제작하여(Forward: 5'-ATCAGGGTGACCATTCCC-3' Reverse 5'-CCACATCCAAAACGGAA-A-3') 를 이용해 band 약 400bp를 확인함(Fig. 11).

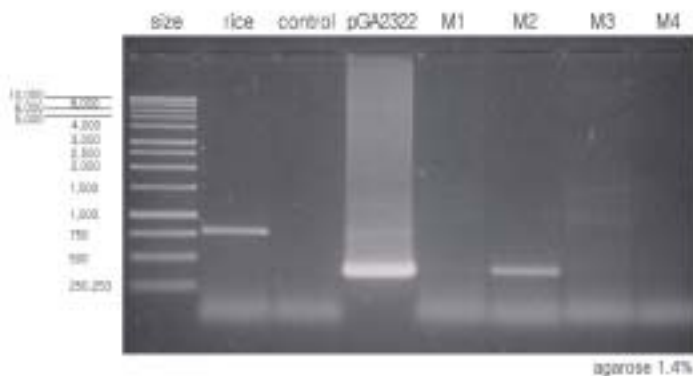


Fig. 11. The *OsMADS1* gene amplification in putative transgenic barley by PCR

size: promega 1Kb ladder, rice: positive control , negative control: Wild type barley, pGA2322: positive control , M1~M4: transgenic line

바. *OsMADS1* 유전자의 형질전환이 확인된 식물체의 외부로 이식 BASTA[®] spray 및 PCR을 통해 유전자 전달이 확인 된 식물체를 외부로 이식 (Fig. 12).



Fig. 12. Transgenic plant

2. 2차년도(2002) 연구수행 내용 및 결과

가. 미성숙배 callus의 다량 생산체계수립

callus 유도를 위한 배지를 개선하여 계대배양 및 분화능 및 생존력을 확인하여 미성숙배 배양 callus의 다량 생산체계를 확립하였다.

1) 계대배양에 따른 callus의 활력 검정

가) 실험방법

배지조성을 변형시킨 MS1, MS2, MS3, MS5, PL1, PL2 를 도입하여 국내산 보리 품종 (서둔찰, 대연, 재강쌀, 태평)에 적용하였다(Table 6).

Table 6. Composition of culture media used for callus induced from immature embryo of barley

Compound	MS1 (mg/ℓ)	MS2 (mg/ℓ)	MS3 (mg/ℓ)	MS5 (mg/ℓ)	PL (mg/ℓ)
NH ₄ NO ₃	1650.0	1650.0	1650.0	1650.0	1650.0
KNO ₃	1900.0	1900.0	1900.0	1900.0	1900.0
CaCl ₂ 2H ₂ O	440.0	440.0	440.0	440.0	440.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	370.0	370.0	370.0	370.0	370.0
KH ₂ PO ₄	170.0	170.0	170.0	170.0	170.0
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6
H ₃ BO ₄	6.2	6.2	6.2	46.4	6.2
KI	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.3	13.9	37.3
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8
Thiamine- HCl	1.0	1.0	-	1.0	1.0
Pyridoxine	-	0.5	-	-	-
glutamine	-	-	750.0	-	-
Nicotinic acid	-	0.5	-	-	-
asprogein	-	-	100.0	-	-
Myo-Inositol	100.0	-	-	250.0	250.0
L-ploline	-	-	150.0	690.0	690.0
caseinhydrolysate	1000.0	500.0	1000.0	1000.0	1000.0
maltose	30000.0	60000.0	60000.0	30000.0	30000.0
pytagel	3000.0	3000.0	3000.0	3000.0	3000.0

Immature embryo는 한 개의 Dish 당 20-30개를 기본배지인 MS1, MS2, MS3, MS5 과 PL에 식물생장조절물질인 2,4-D, BAP, dicamba를 단독 및 혼용처리 한 것에 치상하였고, 각 실험구의 callus 유도율과 callus growth rate 및 callus quality를 분석 하였다.

각각의 실험은 3회 반복 실험 하였으며, callus induction rate는 유도된 비율을 백분율로 평균하여 분석 하였고, initial callus growth rate는 최초의 치상 당 일의 무게(W0)를 callus 유도배지에서 14일간 배양 후 무게(W1)의 변화량을 수

치화($W=W1-W0$)한 뒤, embryo 당 1일간 변화량을 계산하기 위해 총 변화된 무게(W)를 embryo 개수로 나누고, 유도일(14일)로 나누어 환산하였다 (g/embryo/day).

Callus의 Quality는 현미경하에서 관찰하여 경험적으로 embryogenic callus로 발달이 가능한 shiny, compact, nodular, yellow-colored callus는 높은 점수(++++로 표시)를 주었고, 전반적으로 soft, friable, white callus는 낮은 점수(+로 표시)를 주어 평가하였다.

나) 실험결과

Table 7의 다양한 배지조건에서 callus 유도율은 적용된 모든 배지에서 높은 callus 유도율을 보여주고 있었으며, 품종별로 서둔찰 보리의 callus 유도율이 일부 저조한 양상을 보이고 있으나 전반적으로 양호하여, callus 유도는 모든 배지에서 적용 가능한 것으로 나타났다.

Immature embryo를 다량 생산하기 위해서는 callus의 유도율이 높은 배지 및 callus가 1일간 성장할 수 있는 최적 조건을 가진 배지를 선별하여야 하며, 본 실험에서는 모든 품종에서 MS5, PL1, PL2 배지에서 높은 효율을 얻었다.

Callus의 Quality는 현미경하에서 관찰하였을 때 경험적으로 보아서 embryogenic callus로 발달 가능한 것을 기준으로 삼았고, 모든 품종에서 callus quality를 높이는 것은 식물생장조절물질의 단독 처리구보다 혼용 처리구에서 좋은 효과를 얻었다. 또한 PL1 보다 PL2에서 quality는 높게 평가된 것은 일부 품종에서 2,4-D의 효과보다 Dicamba의 처리가 효율을 높일 수 있음을 확인하였다.

결론적으로 다양한 국내산 보리의 callus을 다량 생산하기 위해서는 MS5와 PL 배지를 사용하였을 경우보다 나은 결과를 얻을 수 있었다.

Table 7 Callus induction frequency, initial callus growth rate and callus quality of four barley cultivars

Cultivars	Medium	Composition			Callus induction frequency ^a (%)	Initial callus growth rate ^b (mg/embryo /per day)		Callus quality ^c
		2,4-D (mg/ℓ)	Dicamba	BAP (mg/ℓ)				
Jaekang -bori	MS1	2.5			100±0	7.60	± 0.59	+
	MS1	2.5		0.1	100±0	8.91	± 0.13	+
	MS2	2.0			100±0	9.68	± 1.04	++
	MS2	2.0		0.1	100±0	7.22	± 0.22	++
	MS3	2.0			100±0	7.70	± 0.49	+
	MS3	2.0		0.1	100±0	10.18	± 2.53	++
	MS5	2.5			100±0	10.52	± 1.72	+++
	MS5	2.5		0.1	100±0	9.76	± 0.79	+++(+)
	PL1	2.5			100±0	9.05	± 0.74	++
	PL1	2.5		0.1	100±0	7.55	± 0.55	++
	PL2			2.5	100±0	8.60	± 0.31	+++(+)
	PL2			2.5	0.1	100±0	9.21	± 0.97
Taepyong -bori	MS1	2.5			100±0	12.82	± 1.65	++
	MS1	2.5		0.1	100±0	15.47	± 2.28	++(+)
	MS2	2.0			100±0	12.74	± 2.95	+++
	MS2	2.0		0.1	100±0	12.37	± 2.17	+++
	MS3	2.0			100±0	10.15	± 4.37	+
	MS3	2.0		0.1	100±0	10.73	± 2.18	++
	MS5	2.5			100±0	11.88	± 0.96	++++
	MS5	2.5		0.1	100±0	14.98	± 1.28	++(+)
	PL1	2.5			100±0	12.37	± 1.50	++
	PL1	2.5		0.1	100±0	8.33	± 0.26	++(+)
	PL2			2.5	100±0	13.71	± 2.45	++++
	PL2			2.5	0.1	100±0	12.21	± 3.20
Daeyan -bori	MS1	2.5			100±0	11.31	± 0.18	+++
	MS1	2.5		0.1	100±0	10.20	± 1.75	+++
	MS2	2.0			100±0	9.29	± 0.07	+++(+)
	MS2	2.0		0.1	100±0	11.95	± 1.96	+++
	MS3	2.0			100±0	11.00	± 2.96	++(+)
	MS3	2.0		0.1	96.7±5.8	12.49	± 2.31	++
	MS5	2.5			100±0	12.27	± 2.63	+++++
	MS5	2.5		0.1	100±0	11.22	± 1.15	+++
	PL1	2.5			100±0	12.73	± 3.64	+++(+)
	PL1	2.5		0.1	100±0	14.02	± 1.99	+++
	PL2			2.5	100±0	11.22	± 1.15	+++
	PL2			2.5	0.1	100±0	14.47	± 1.18

Cultivars	Medium	Composition			Callus	Initial callus	Callus quality ^c
		2,4-D (mg/ℓ)	Dicamba	BAP (mg/ℓ)	induction frequency ^a (%)	growth rate ^b (mg/embryo /per day)	
	MS1	2.5			46.7±10.0	11.31 ± 0.18	+
	MS1	2.5		0.1	66.78±5.4	10.21 ± 1.75	+
	MS2	2.0			100±0	9.29 ± 0.07	+(+)
	MS2	2.0		0.1	100±0	11.95 ± 1.96	+(+)
	MS3	2.0			100±0	11.00 ± 2.96	+
Surdunch	MS3	2.0		0.1	100±0	12.49 ± 2.31	+
al-bori	MS5	2.5			100±0	12.27 ± 2.63	+++
	MS5	2.5		0.1	100±0	11.22 ± 1.15	+(+)
	PL1	2.5			100±0	12.73 ± 3.64	+
	PL1	2.5		0.1	100±0	14.02 ± 1.99	+
	PL2		2.5		96.7±5.8	12.22 ± 1.15	++
	PL2		2.5	0.1	100±0	14.47 ± 1.18	++(+)

++++ : shiny, compact, nodular, slightly brown or yellow-colored callus

+++ : shiny, nodular, slightly brown or yellow-colored callus

++ : shiny, nodular, white callus

+ : soft , friable, white callus

나. 재분화능을 위한 배지 및 배양조건개선

1) 실험방법

다음의 Table 8는 MS 기본 배지를 변형하여 다양한 조성을 변화 시켰으며, MS(-)R (Murashige-Skoog, 1962), MS2R(Thomas 1996), PLR(Wan & Lemaux, 1994), XPR(Dahleen 2002) 과 FHG (Wan & Lemaux, 1994)를 도입하여 국내산 보리 품종(서둔찰, 대연, 재강쌀 , 태평, 올보리)에 적용하여 보았다. Selection된 Embryogenic callus를 각각의 배지에 10-20개씩 치상하여 명 배양 후 multiple shoot 형성과정을 통해 재분화능을 확인 하였다. 효율에 대한 통계는 shoot 형성율, multiple shoot 길이, multiple shoot의 형태에 대하여 분석하여 표기하였다.

Table 8. Composition of culture media used for regeneration of immature embryo of barley

Compound	MS(-)R (mg/ℓ)	MS2R (mg/ℓ)	PLR (mg/ℓ)	XPR (mg/ℓ)	FHG (mg/ℓ)
NH ₄ NO ₃	1650.0	1650.0	1650.0	1650.0	1650.0
KNO ₃	1900.0	1900.0	1900.0	1900.0	1900.0
CaCl ₂ 2H ₂ O	440.0	440.0	440.0	440.0	440.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	370.0	370.0	370.0	370.0	370.0
KH ₂ PO ₄	170.0	170.0	170.0	170.0	170.0
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6
H ₃ BO ₄	6.2	6.2	6.2	46.3725	6.2
KI	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025	0.025	0.049	0.025	0.025
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8	27.8	27.8	13.9	27.8
Thiamine- HCl	-	-	1.0	1.0	1.0
Pyridoxine	-	-	-	-	0.5
glutamine	-	750.0	750.0	-	730
Nicotinic acid	-	-	-	-	-
asprogein	-	100.0	-	-	-
Myo-Inositol	-	-	250	250.0	100.0
L-poline	-	150.0	690	690.0	250.0
caseinhydrolysate	1000.0	500.0	1000.0	1000.0	1000.0
maltose	30000.0	60000.0	40000.0	40000.0	40000.0
IAA	-	-	-	-	1.5
BAP	-	-	1.0	0.1	0.5
pytagel	3000.0	3000.0	3000.0	3000.0	3000.0

2) 실험결과

Table 8의 재분화 배지를 이용하여 shoot 형성을 관찰한 내용으로 기존에 사용해 온 MS(-)R 배지는 50% 이상의 효율을 높이는 것으로 나타났으며, FHG 배지는 모든 품종에서 높은 효율을 보였으므로, 보다 효율적인 형질전환체 재분화

배지로 적합함을 확인하였다(Table 9).

Table 9. Efficiency of regeneration for four korean barley cultivars

Cultivars	Medium	Multiple	Multiple		Shoot quality ^c
		green shoot frequency ^a (%)	shoot length (length/embryo)	shoot length	
밀양74	MS(-)R	28.57	1.33 ±	0.85	+(+)
	PLR	86.21	1.70 ±	1.34	++++
	XPR	33.34	1.50 ±	0.14	+
	FHG	92.31	1.29 ±	1.12	++++
	MS2	66.87	1.16 ±	0.68	++
을	MS(-)R	40.00	1.20 ±	0.72	+(+)
	PLR	14.29	0.88 ±	0.62	+
	XPR	30.00	0.92 ±	0.47	++
	FHG	71.79	1.24 ±	0.85	+++(+)
	MS2	18.19	0.38 ±	0.11	+
일진	MS(-)R	66.67	0.65 ±	0.21	+
	PLR	69.23	1.09 ±	0.89	++
	XPR	77.78	3.25 ±	0.46	+++
	FHG	75.00	0.72 ±	0.15	++(+)
	MS2	84.21	0.91 ±	0.44	+++(+)
큰알1호	MS(-)R	16.67	1.62 ±	0.52	+(+)
	PLR	57.14	0.36 ±	0.15	+
	XPR	31.25	0.83 ±	0.68	+++
	FHG	84.00	0.81 ±	0.59	+++
	MS2	73.08	0.35 ±	0.11	+++(+)

++++ : 잎이 푸르고 꼬임이 없으며 외관상 튼튼해 보이는 경우

+++ : 잎이 푸르고 꼬임이 일부 있으며 외관상 튼튼해 보이는 경우

++ : 잎이 푸르고 꼬임이 일부 있으며 외관상 약해 보이는 경우

+ : 잎이 일부 하얗고 꼬임이 있으며 외관상 약해 보이는 경우

다. 배발생 callus 크기별 재분화능 검정

1) 실험방법

모든 품종에서 대체로 높은 효율을 나타내는 FHG 배지에 올보리와 큰알1호 보리를 도입하여 embryogenic callus 전체크기에서 1/10, 1/2, 전체 크기로 분획하여 multiple shoot 형성을 관찰하였다.

2) 실험결과

FHG 재분화 배지는 높은 효율을 나타내었으며, callus 분획 크기가 작아 질수록 shoot 형성은 줄어들며 multiple shoot 형성율도 저하되는 것을 보여 주고 있다.

미성숙배에서 유도된 embryo-genic callus는 부정형의 주변 조직으로부터 분리될수록 분화능이 감소하는 것을 보인다.

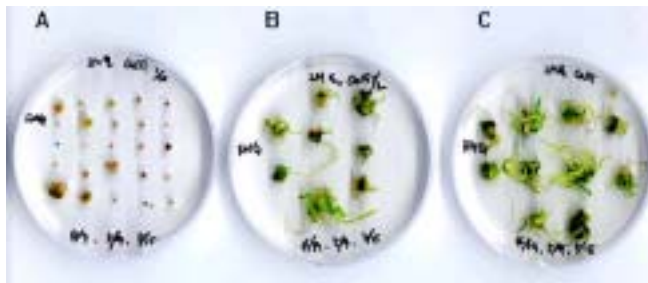


Fig. 13. Analysis of multiple shoots formation in size of embryogenic callus of Owul-Bori on FHG regeneration medium.

A: callus, 1/10 size, B: callus, 1/2 size, C: callus, control

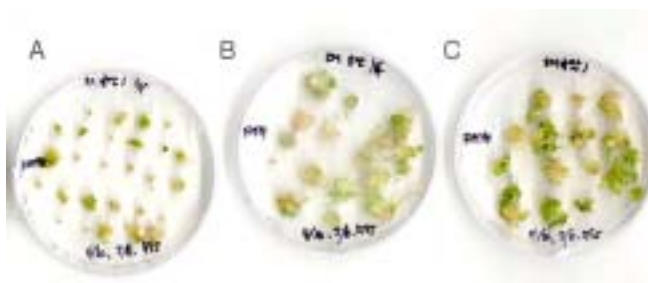


Fig. 14. Analysis of multiple shoots formation in size of embryogenic callus of Kunal-1-ho-Bori on FHG regeneration medium

A: callus, 1/10 size, B: callus, 1/2 size, C: callus, control

라. 형질전환된 캘러스의 생존을 향상을 위한 형질전환 방법의 개선

Bombardment 시기 및 선별효율향상을 위해 tungsten과 DNA농도별 변화를 다양한 방법으로 준비하여 실시하였고, DNA농도별 효율 분석과 osmotic treatment의 시간대별 효과를 비교 확인함.

1) DNA 농도별 분석

다음의 Table 10과 같이 다양한 농도로 DNA로 준비하여 Immature embryo를 대상으로 실험대상구의 Osmotic처리시간을 2시간부터 24시간까지 일정주기로 실시하고 bombardment를 실시하여, embryo당 GUS spot 평균면적을 completely blue spot (Fig. 15.)과 image 분석 장치 (Labwork UVP 4.0)를 이용하여 비교 후 수치화하였다.

Table 10. The different DNA preparation tested showing the amount of tungsten and DNA used per shot with each preparation.

Preparation	particle size	Particle/shot (mg)	DNA/shot (μg)	Volume/shot (μl)
A	0.9 μm	0.76	0.32	5.0
B	0.9 μm	0.76	0.63	5.0
C	0.9 μm	0.76	0.96	5.0
D	0.9 μm	0.76	1.80	5.0
E	0.9 μm	0.76	3.75	5.0

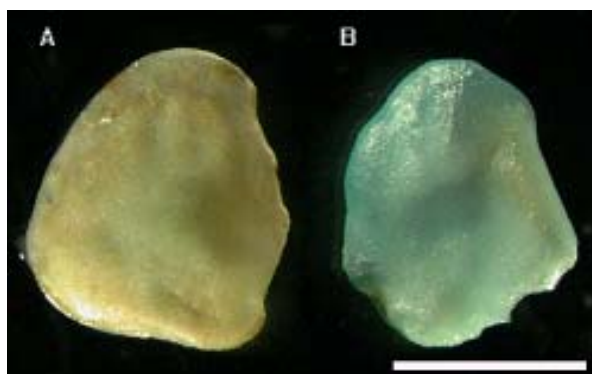


Fig. 15. Histochemical assay for GUS activity in transgenic plant.

A: control, B.: completely blue spot

bar = 1mm

2) Osmotic treatment와 DNA 농도에 관련된 실험결과

Fig. 16.에서 보는 바와 같이 2 시간에서 6시간 사이에서 효과를 확인할 수 있었으나 C (DNA 0.96 μg) 와 D (1.80 μg) 에서는 6시간부터는 감소하는 경향을 보였으며, 낮은 DNA 농도(0.63 μg 이하)를 제외한 모든 농도에서 12시간 이후부터 처리구의 효율은 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 16.). 결과적으로 Osmotic treatment는 6시간 이내, 즉 4시간 정도에서 처리하는 것이 바람직하다고 판단되며, DNA 농도는 0.96 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이상에서 뚜렷한 GUS 발현을 보이는 것으로 나타났다(Fig 17.).

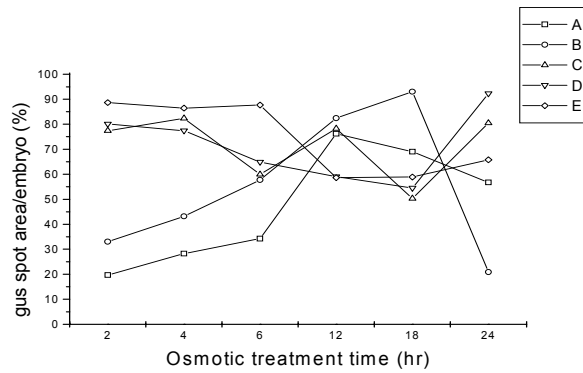


Fig. 16. The effect of tungsten coating procedure on *GUS* gene expression using the particle bombardment. DNA concentration of A: 0.32 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, B: 0.63 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, C: 0.96 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, D: 1.80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ E: 3.75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
A~E: each preparation (table 10)

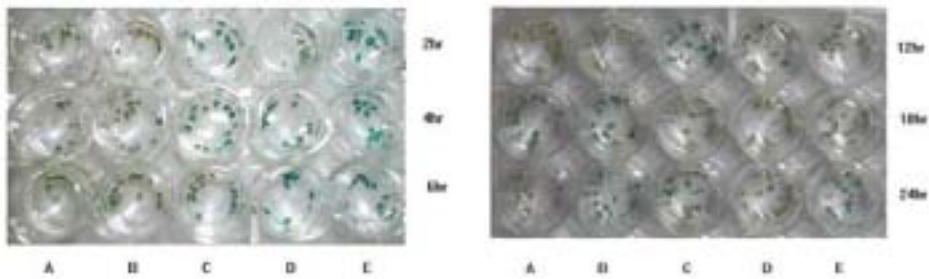


Fig. 17. GUS expression on immature embryos of 1 day after bombardment using the various tungsten preparation and the difference in time on osmotic treatment media. DNA concentration of A: 0.32 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, B: 0.63 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, C: 0.96 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, D: 1.80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ E: 3.75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
A~E: each preparation (table 10)

마. 형질전환 분화 조직 GUS 분석

1) 실험방법

100 mM sodium phosphate buffer , 5 mM Potassium ferricyanide, 5 mM Potassium ferrocyanide 0.5% Triton x-100, 10 mM EDTA, 20% DMSO, 0.10% x-glu, 20% Me-OH을 넣고 식물체 조직을 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 침척 시켜, 70% EtOH에서 1시간 그리고 100% EtOH에 24시간 탈색 후 현미경으로 관찰함.

2) 실험결과

Particle bombardment를 하기위한 적정 DNA농도를 알아보기 위하여 4시간 Osmotic 처리를 한 후 다양한 농도에 따른 GUS 반응을 비교해 보았다 (Fig. 18.), 이후 실험은 효과가 높은 농도인 $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이상의 DNA농도를 적용하여 particle bombardment 실시 후 basta selection 단계를 수행하였다. Fig. 19. 는 식물체의 발달을 관찰하여 미성숙배의 GUS 활성 분석을 통해 분석하였으며, 이후 embryogenic callus 단계, shoot 형성 단계에서 gus 활력 분석을 수행 하였다.

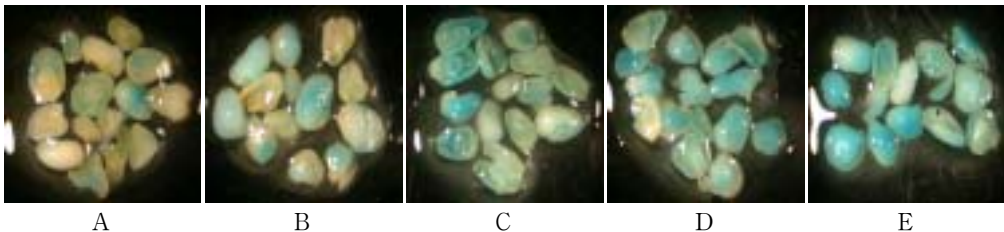


Fig. 18. GUS expression on immature embryos of 1 day after bombardment using the various tungsten preparation and after 4 hours on osmotic treatment media DNA concentration of A: $0.32\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$, B: $0.63\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$, C: $0.96\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$, D: $1.80\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ E: $3.75\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$
A~E: each preparation (table 10)

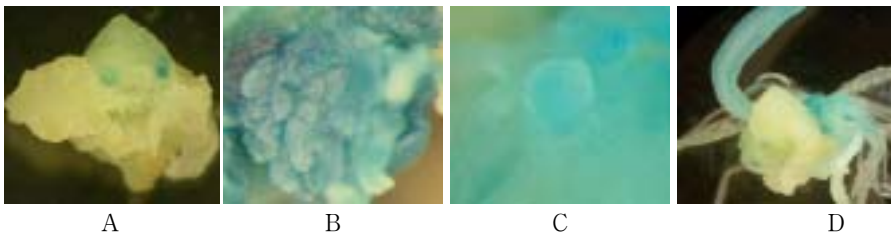


Fig. 19. Analysis of GUS expression patterns on transgenic plant tissues. A: Stage of callus induction, B: Stage of embryo genic callus, C: embryo genic callus, D: Stage of shoot formation

바. 형질전환체 생산 및 확인

T₀는 growth chamber 내에서 18℃ 16시간 명조조건과 16℃ 8시간의 암조건을 하에서 재배하여(Fig. 20.) 종자를 획득하고 획득된 종자를 배양하여 단원보리와 진양보리를 각각 17계통씩 양성하였으며 이를 재료를 가지고 협동연구기관인 호남농업연구소에서 포장검정 및 특성조사를 실시하였다(Fig. 22).

PCR product를 대상으로 위의 동일 primer로 bioneer sequencing center (Bioneer Co.)에 sequencing을 의뢰한 결과 100% 같은 염기 서열을 확인할 수 있었다(Fig. 21.).



Fig. 20. T₀ plants growing in growth chamber

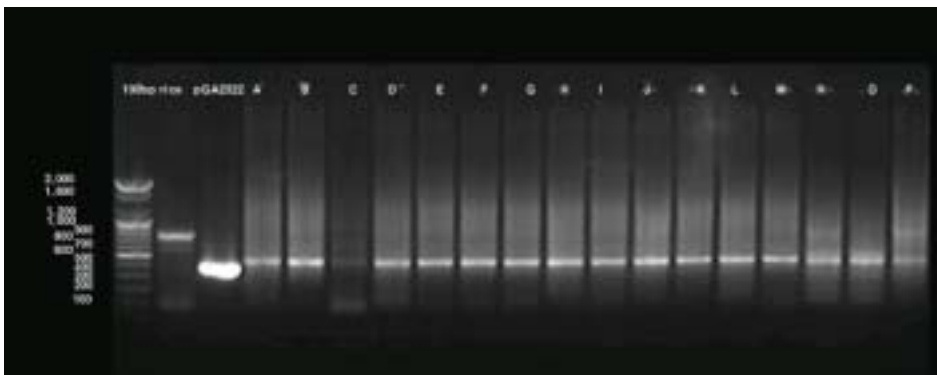
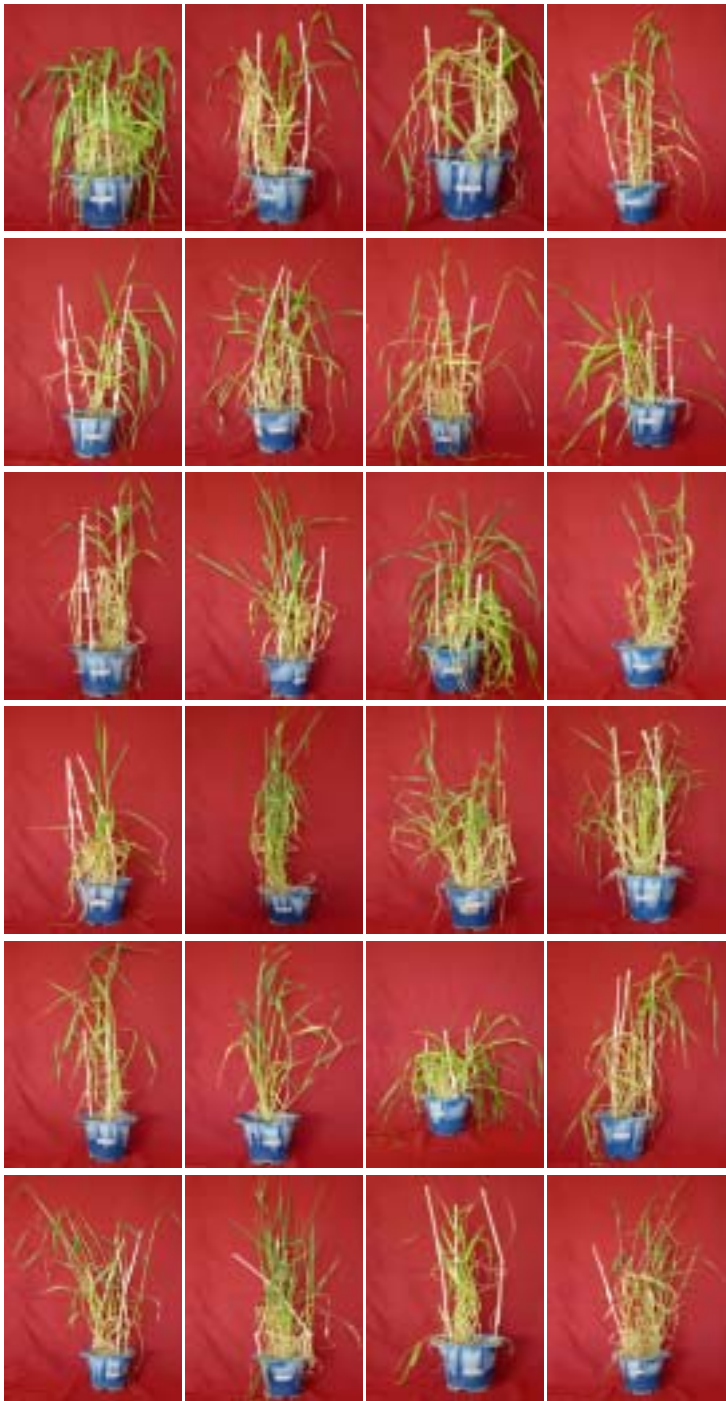


Fig. 21. The *OSMADSI* gene amplification in putative transgenic plants by PCR. positive control used Rice genom DNA and pGA 2322
a-p: Genomic DNA of putative transgenic lines were amplified by specific primer



A non-transgenic susceptible plant.

Fig. 22. Growth of transgenic plant(T0) in 15 cm clay pots, photographed 14 days after the PPT spray (250 mg/L)

- Sequence 분석

형질전환체로 추정되는 보리의 PCR product 를 Bionner sequencing center 에 분석 의뢰하여 다음과 같은 결과를 얻었으며, 분석된 결과를 <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>에 align 한결과 forward 및 reverse 방향에서 100% 동일한 결과를 얻었으므로, 식물체는 *OsMADS1* 유전자가 도입된 것으로 판단되었다(Fig. 23).

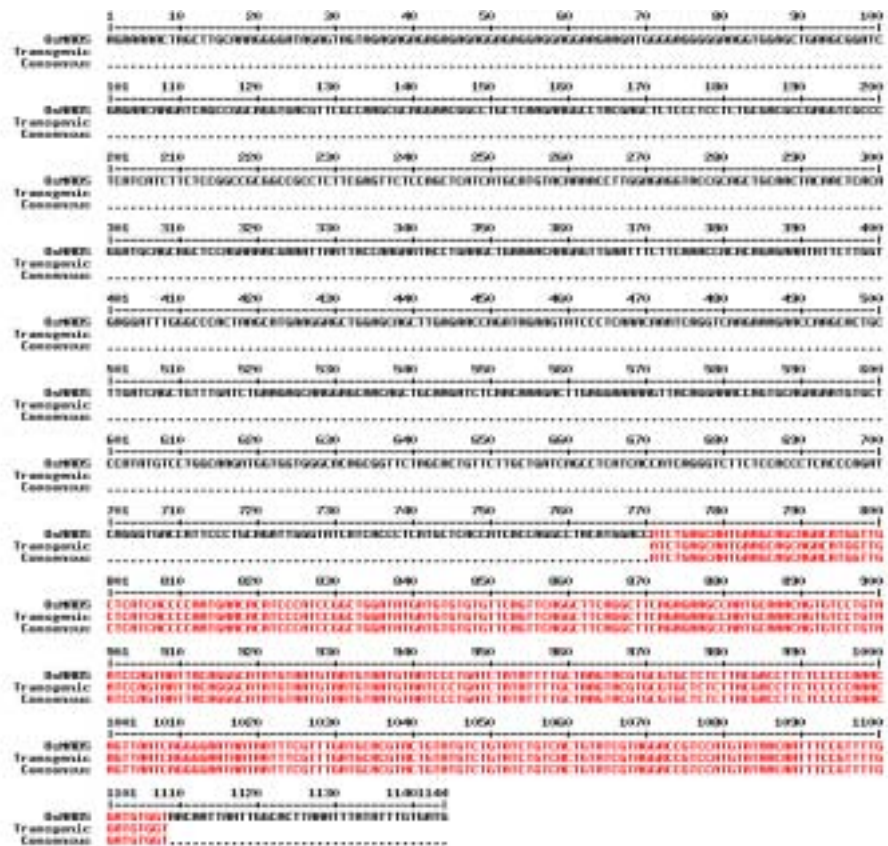


Fig. 23. The results of sequencing and alignment of genomic gene of putative transgenic plants and *OsMADS1* gene.

- Alignment 결과 100% 일치함.

사. 맥류의 형질전환체 양성 및 특성조사 (호남작물시험장)

1) 실험방법

가) 실험장소: 호남작물시험장 형질전환 식물체 GMO 격리 온실

나) 실험재료 :

- 주관 연구기관인 동국대학교 생명과학 실험실에서 particle bombardment법에 의해 얻어진 형질전환체로 추정된 식물체를 PCR과 Sequencing을 수행한 결과 *OsMADS1* 유전자가 삽입이 되고 각각의 다른 5개의 조직에서 PCR결과가 일치해, 키메라의 가능성이 아주 낮을 것이라고 추정하였고, 이 Transgenic Plants에서 얻은 T1 종자를 두 품종 각 17계통 총 34 계통 (단원보리 유래 17, 진양보리 유래 17) 양성하여 각각의 대비 품종 (각각 10본 이상)과 같이 실험을 수행하였음

다) 파종일 : 2003년 1월 9일 ~ 1월 27일

* Petri dish에서 최아 시킨 후 최아된 종자부터 pot에 이식 재배

라) 시비 : N-P2O5-K2O = 12-8-7kg/10a(분시비율 기비 : 추비= 60 : 40)

마) 농업적 특성조사 항목 : 출현엽수, 출수시, 출수기, 간장, 수장, 망장, 일수립수, 수수, 천립중 등

2) 실험결과

Table 11. *OsMADA1* 개화조절유전자 형질전환체의 모품종 대비 특성조사

구분	단원보리(CK)	T1	진양보리(CK)	T1
출현엽수(엽)	11.0	11.2	13.0	10.9
출수시일수(일)	80.9	84.5	88.5	80.0
출수기일수(일)	87.6	90.9	94.7	86.5
간장(cm)	73.0	61.9	47.6	68.4
수장(cm)	6.7	7.1	6.6	7.2
망장(cm)	10.7	11.0	10.0	12.2
일수립수(립)	27.2	26.5	24.8	27.4
수수(개)	6.2	4.9	2.7	7.7
천립중(g)	46.6	44.1	31.0	48.4

CK : Check(대비품종)

- 단원보리를 모품종으로한 *OsMADA1* 개화조절유전자 전환 식물체 17 line 91립 중 16 line (94.1%) 80립(87.9%)이 출현되었으며, 진양보리는 17 line 67립 중

11 line(64.7%) 22립(32.8%)이 출현되었음.

- 출현엽수는 단원보리 11엽에 비해 T1은 11.2엽, 출수시 및 출수기의 평균일수는 모품종의 각각 80.9일과 87.6일에 비해 84.5일, 90.9일로 3-4일 정도 늦어지는 유의적인 차이라고는 판단할 수 없는 변화를 보였다. 반면에 진양보리는 출현엽수 13엽에 비해 10.9엽으로 단축되었고 출수시와 출수기가 평균일수 88.5일과 94.7일에 비해 80.0일과 86.5일로 8일 이상 짧아졌다.

- 간장은 단원보리의 경우 모품종 73.0cm에 비해 T1 line은 평균 61.9cm로 짧아졌으나 진양보리는 모품종 47.6cm에 비해 68.4cm로 반대의 경향이었음.

- 수장과 망장은 단원보리 모품종에서 각각 6.7cm와 10.7cm로 T1 line의 평균 7.1cm, 11.0cm로 비슷하였으나 진양보리는 모품종의 6.6cm, 10.0cm에 비해 7.2cm, 12.2cm로 증가하였음.

- 일수립수도 단원보리는 모품종 27.2립에 비해 T1 line은 26.5립으로 비슷한 경향이나 포기당 이삭수는 모품종 6.2개에서 T1 line 4.9개로 감소한 반면 진양보리는 모품종의 일수립수는 24.8립에서 T1 line 27.4립으로 증가하였으며 이삭수도 모품종 2.7개에서 T1 line 7.7개로 크게 증가하였음.

- 천립중은 단원보리에서는 유의적인 차이를 보이지 않았고 진양보리는 모품종 31.0g에서 48.4g으로 크게(155%) 증대되었음.

- 엽수의 생육기간 중 변화는 단원보리와 진양보리 T1 line은 모두 비슷하였으나 진양보리의 T1 line은 파종 후 70일경에 지엽이 출현한 반면 모품종은 계속하여 2엽 정도가 더 출현하였음.

- 분얼경의 경시적인 변화는 단원보리의 경우 모품종과 T1 line이 비슷한 속도로 증대하였으나 진양보리는 파종 후 60일경부터 T1 line에서 분얼경이 크게 증대되었음.

- 실험결과 분석

전체적으로 진양보리의 경우에는 *OsMADS1* 유전자의 특성인 출수시기가 모품종에 비해 8일 정도 빨라지는 현상을 보이고 있고 계통간 혹은 개체간의 출수기의 차이도 미미한 것으로 나타났다 (계통간 77일 --> 82일; 개체간 79일 --> 81일). 그러나 단원보리의 T1은 모품종에 비해 간장을 제외한 거의 모든 항목에서 유의적인 차이를 보여주지 못하고 있다. 게다가 *OsMADS1* 유전자의 특성인 출수기가 빨라지는 현상은 나타나지를 않고 있다. 그러나 T1 에서의 출수기가 계통 간 (81일 --> 90.1) 혹은 개체 간 (84 --> 102) 차이가 크게 나타났다. 따라서 이들이 각각 형질진환체 한 개로부터 유리된 계통들로서 PCR과 Sequencing결과에 의해 *OsMADS1* 유전자의 삽입이 증명되긴 하였으나, 후대에 발현 여부는 3차년도에 연구과제로서 아직 확인이 안 된 상태이다.

출수시기가 빨라져 *OsMADS1* 유전자의 특성을 나타내는 진양보리의 T1는 모 품종에 비해 종자의 무게도 약 155% 정도로, 크게 증가하는 경향을 보이고 있다. 반면에 엽수는 2개 정도 감소하는 경향을 보인다. 이는 모품종이 T1보다 엽수가 2개정도 더 출현하는데 기인되어 나타나는 현상일 수가 있다. 이러한 현상이 후 대 검정과정에서 계속 유지되고 발현 여부가 확인된다면, 이는 조기개화유전자의 도입이 어찌면 수확량의 유지나 제고를 보장하지 못 할 수도 있으리라는 일각의 우려를 불식시킬 수 있는, 아주 긍정적인 결과를 보여주는 것이다.

3. 3차년도(2003) 연구수행 내용 및 결과

가. 형질전환 기술 체계 확립 및 형질전환 효율 향상

1) 형질전환 기술 체계 확립

Particle bombardment를 이용한 형질전환법은 우선 미성숙배를 재료로 캘러스 유도 배지(PL 배지 + 2.5 mg/L)에 치상한 뒤, bombardment를 하기 전 osmotic treatment 를 4시간 동안 실시하였다. 그 다음 bombardment 시 plasmid DNA 양을 최적 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 으로 분사하였다. 형질전환체 선별을 위해 두 번에 걸쳐 PPT 3, 5 mg/L 첨가된 배지에서 키웠으며, 보다 많은 재분화체 유도를 하기 위해 FHG 배지에 올려서 배양하였다. 선별이 끝난 형질전환 식물체는 pot로 이식하여 유전자 확인을 위해 molecular 분석을 실시하였으며, 결과적으로 particle bombardment 법에 의한 형질전환 체계를 확립하였다.

2) 형질전환 효율 향상

1차년도 단위, 진양 보리의 형질전환체 생산율은 0.6%가 나왔으며, 이를 검정하기 위하여 2, 3차년도에 *bar* 와 *GUS* 유전자가 들어간 pCAMBIA3301로 형질전환을 실시한 결과 아래 표와 같이 2차년도 0.9%, 3차년도 1.5%로 나타났다. 이 결과는 1차년도와 3차년도를 비교하였을 때 2.5배 형질전환 효율이 향상되었음을 확인할 수 있다.

Table 12. Overall efficiency of transgenic plants production

연도	형질전환체 생산율(%)
1차년도	0.6
2차년도	0.9
3차년도	1.5

나. 후대 형질전환 계통 (단원보리, 진양보리)의 분석

1) PCR 수행

Transgenic line DNA를 추출하여 PCR 한 결과 밴드가 확인되었고(Fig. 24), PCR product를 대상으로 specific primer로 sequencing한 결과 100% 같은 염기 서열을 확인할 수 있었다.

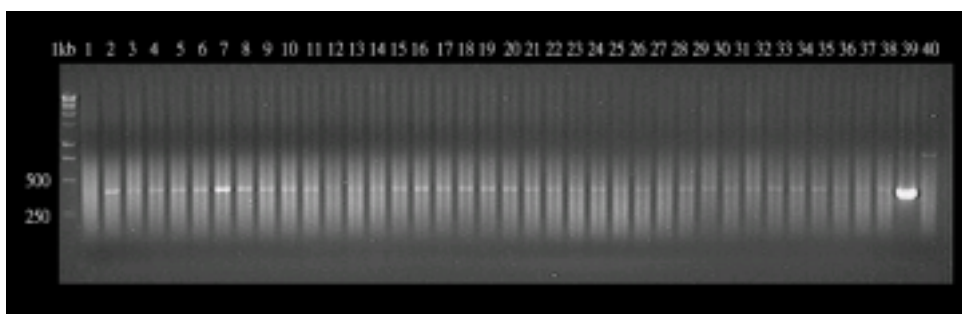


Fig. 24. PCR analysis of transgenic barley from lines showing amplification of a 409 bp fragment of the *OsMADS1* gene.

1Kb (promega 1kb ladder), Lane 1: negative control (Danwon Bori) Lane 2-38: transgenic plants (Danwon Bori 207-1-3, 207-1-6, 207-2-1, 207-2-8, 207-3-1, 207-3-10, 207-4-1, 207-4-6, 207-4-10, 207-5-3, 207-5-7, 207-6-1, 207-6-4, 207-6-8, 208-1-2, 208-1-7, 208-2-1, 208-2-5, 208-2-9, 208-3-1, 208-3-3, 208-3-5, 208-3-8, 209-1-2, 209-1-7, 209-1-9, 209-2-1, 209-2-4, Jinyang Bori 902-1-1, 902-1-5, 902-1-7, 902-2-4, 902-2-9, 902-3-1, 902-3-5, 902-3-10), Lane 39: positive control (pGA2322), Lane 40: positive control (Rice)

- Sequence 분석

sequence 분석은 Transgenic barley 의 PCR product를 sequencing center(Solgent Co.) 에 분석 의뢰하였다. 위의 결과를 바탕으로 full sequence를 분석위하여 primer 다음과 같은 결과를 얻었으며 분석된 결과를 <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>에서 alignment 한 결과 specific sequence의 100% 동일한 결과를 얻었으므로, T3 형질전환 식물체는 *OsMADS1* 유전자가 도입된 것으로 확인되었다(Fig 25.).

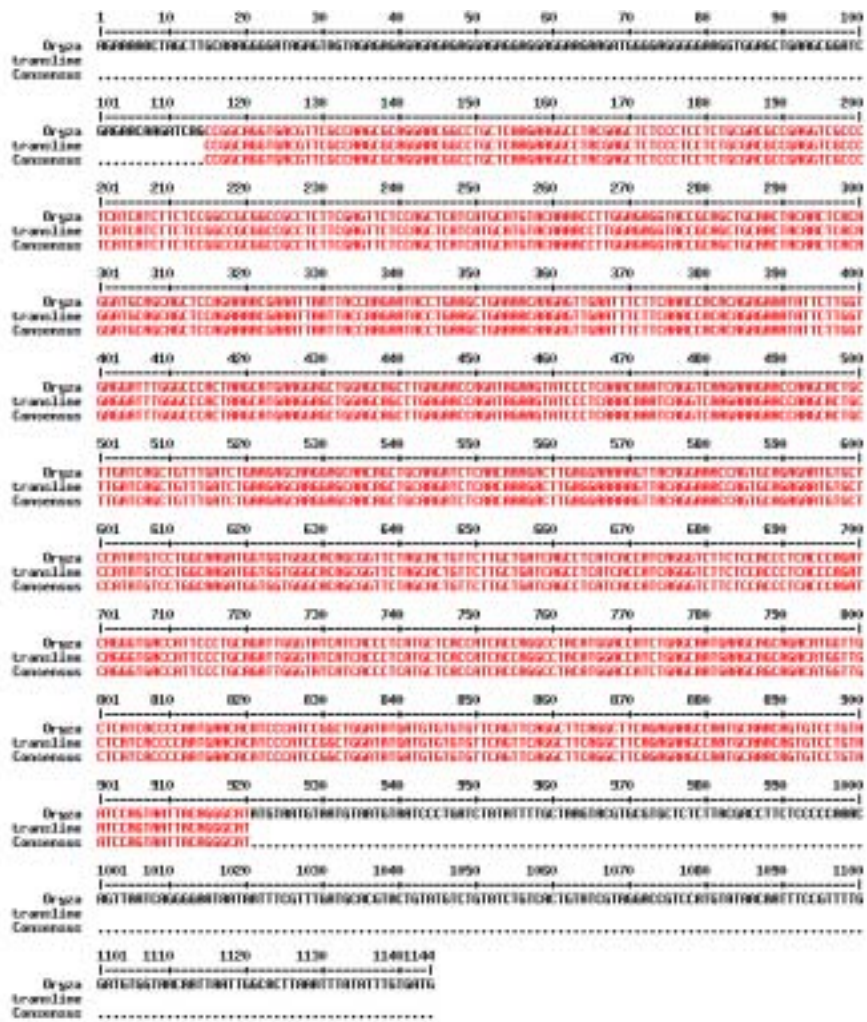


Fig. 25. Analysis of PCR sequence

- Alignment 결과 : 100 % 일치함

2) RT-PCR 수행

Transgenic line RNA를 추출하여 RT-PCR 한 결과 밴드가 확인되었고(Fig. 26.), RT-PCR product를 대상으로 위의 동일 primer로 sequencing한 결과 100% 같은 염기 서열을 확인할 수 있었다(Fig. 27.).

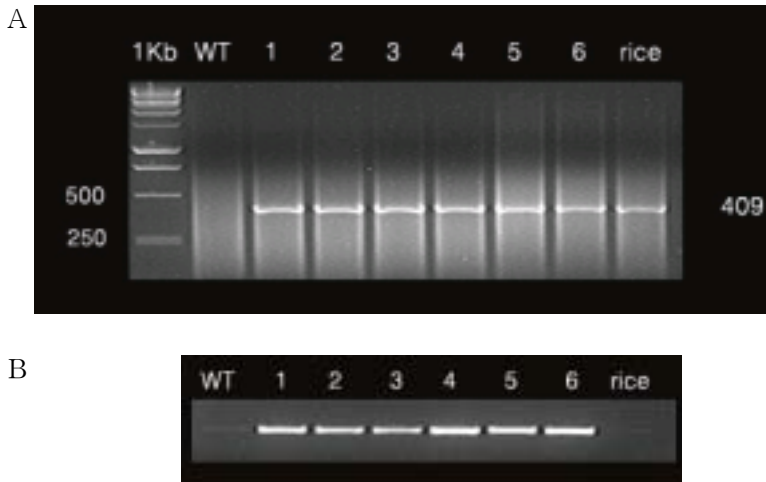


Fig. 26. RT-PCR analysis of Transgenic barley from lines showing amplification of a 409 bp fragment of the *OsmADS1* gene (A) and actin gene (B).

1Kb (promega 1kb ladder), WT: negative control (Danwon Bori), Lane 1-6: transgenic plants (Danwon Bori 207-3-10, 207-4-10, 208-2-9, 209-2-1, Jinyang Bori 902-1-8, 902-2-4), rice: positive control

- Sequence 분석

sequence 분석은 Transgenic barley 의 PCR product를 Solgent sequencing center 에 분석 의뢰하여 다음과 같은 결과를 얻었으며(Fig. 27.), 분석된 결과를 <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>에서 alignment 결과 specific sequence의 100% 동일한 결과를 얻었으므로, T3 형질전환식물체는 *OsMADS1* 유전자가 안정적으로 도입되어 발현되는 것으로 판단된다.

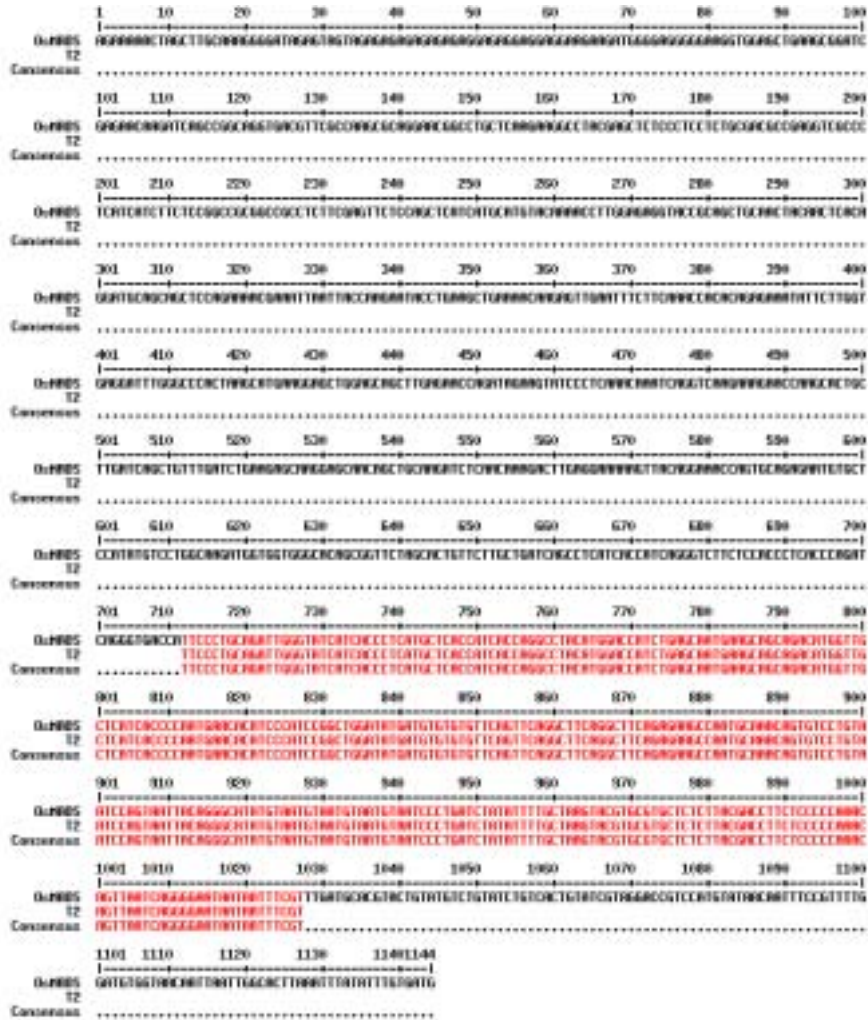


Fig. 27. Analysis of RT-PCR sequence.

- Alignment 결과 : 100 % 일치함.

주2) 약 710 bp까지는 벼의 *OsMADS1* 유전자와 보리의 *MADS* 유전자가 상당히 유사한 sequence를 가지기 때문에 후반 sequence를 분석하였다.

다. 맥류의 형질전환체 양성 및 농업적 특성조사 (호남작물시험장)

Table 13. *OsMADS1* 형질전환체의 주요 선발계통 농업적 특성(단원보리)

모품종 및 주요계통	출현수 (엽)	최고 분얼수 (개)	간장 (cm)	수장 (cm)	망장 (cm)	일수 립수 (립)	이삭수 (개)	출수시 일수 (일)	출수기 일수 (일)	개화기 일수 (일)	천립중 (g)
단원보리 (check)	11	16.7	86.2	7.0	8.7	30.6	12.9	116.2	127.1	120.0	47.88
단 207 -1	12	16.1	79.0	7.2	9.5	28.2	10.2	106.4	118.4	110.8	52.23
단 207 -2	11	15.5	79.5	7.3	9.4	25.7	11.1	111.8	127.2	115.5	49.31
단 207 -3	12	14.2	72.1	6.9	8.7	26.8	11.4	109.6	123.0	113.7	52.0
단 207 -4	12	14.6	64.5	6.9	8.5	26.2	13.7	107.8	120.3	113.0	44.01
단 207 -5	12	16.4	65.9	6.8	8.6	26.4	9.9	104.8	118.8	108.8	52.99
단 207 -6	11	12.3	69.0	6.7	8.3	25.8	7.6	104.4	117.9	108.6	55.1
단 208 -1	12	14.1	72.9	7.0	9.0	28.6	7.7	110.3	119.7	114.4	49.84
단 208 -2	12	11.7	86.7	6.7	9.5	26.6	4.7	107.1	115.4	110.8	52.04
단 208 -3	12	15.2	79.0	6.9	9.1	27.4	7.4	105.8	114.8	109.6	54.40
단 209 -1	12	15.7	72.9	6.3	8.8	23.3	8.3	111.0	121.8	115.2	51.63
단 209 -2	12	15.3	86.8	6.7	10.3	27.7	7.2	112.2	118.0	115.8	51.81
11계통 평균	11.8	14.7	75.3	6.9	9.1	26.6	9.0	108.3	119.6	112.4	51.4

Table 14. *OsMADS1* 형질전환체의 주요 선발계통 농업적 특성(진양보리)

모품종 및 주요계통	출현수 (엽)	최고 분얼수 (개)	간장 (cm)	수장 (cm)	망장 (cm)	일수 립수 (립)	이삭수 (개)	출수시 일수 (일)	출수기 일수 (일)	개화기 일수 (일)	천립중 (g)
진양보리 (check)	12	14.9	92.5	7.1	11.0	30.5	10.8	116.9	126.1	120.9	53.70
진 902 -1	12	15.1	75.3	6.6	9.1	26.2	7.7	112.7	121.8	116.5	53.74
진 902 -2	12	15.4	86.2	6.7	10.2	28.1	8.1	111.6	119.2	115.1	55.16
진 902 -3	11	14.4	79.8	6.5	9.7	26.6	6.5	110.3	118.6	114.2	54.58
3계통 평균	11.7	15.0	80.4	6.6	9.7	27.0	7.4	111.5	119.9	115.3	54.5

Table 15. 단원보리 모품종과 *OsMADSI* gene 형질전환체 특성

Factors	Original variety	Transformants
	Mean+SD	Mean+SD
No. of days by fist heading time	116.2 ±2.7	108.2 ±5.2
No. of flowing date	120.0 ±2.4	112.3 ±5.2
No. of days by heading time	127.1 ±2.3	119.7 ±4.9
Culm length(cm)	86.2 ±3.7	74.7 ±9.1
Panicle length(cm)	7.0 ±0.5	6.9 ±0.7
Awn length(cm)	8.7 ±0.7	9.0 ±0.8
No. of spikelets per panicle	30.6±2.1	26.6 ±4.4
No. of panicle per hill	12.9±5.5	9.1 ±4.0
1000 grains weight (g)	47.9±2.9	51.3 ±9.2

Table 16. 진양보리 모품종과 *OsMADSI* gene 형질전환체 특성

Factors	Original variety	Transformants
	Mean+SD	Mean+SD
No. of days by fist heading time	116.9 ±5.3	111.5 ±2.9
No. of flowing date	120.9 ±5.2	120.4 ±2.4
No. of days by heading time	126.1 ±5.3	119.9 ±3.6
Culm length(cm)	92.5 ±3.3	80.2 ±7.2
Panicle length(cm)	7.1 ±0.2	6.6 ±0.5
Awn length(cm)	11.0 ±0.3	9.7 ±0.8
No. of spikelets per panicle	30.5 ±1.4	26.9 ±0.8
No. of panicle per hill	10.8 ±2.9	7.4 ±1.7
1000 grains weight (g)	53.7 ±2.9	47.9 ±2.9



Fig. 28. *OsMADS1* 형질전환체 및 모품종간 생육비교

1: 단원보리,

2: 진양보리,

A: check, B: 형질전환체

A: 형질전환체, B: check

○ 단원보리와 진양보리의 *OsMADS1* 유전자 형질전환체 T2 세대 39계통 및 7계통을 육성하여 그중 개화기가 빠른 계통은 단원보리 11계통과 진양보리 3계통을 선발하였음.

○ 출수시와 개화기 일수는 단원보리 모품종 116일에 비하여 계통별로 4-11일이 단축되었고 진양보리는 4-6일이 단축되었으며 각각 평균 8일과 5일이 빨라졌음.

○ 천립중은 개화기 단축에 따른 등숙일수의 증가로 인하여 모품종에 비해 단원보리 3.52g, 진양보리 0.8g 정도가 증가하였으며 최고 증가량은 각각 6.52g, 1.46g의 차이를 나타내었음.

○ 출현엽수는 모품종에 비해 같거나 1엽이 더 출현한 11-12엽으로 T1세대와 비슷하였으며 T1 세대와의 엽수증가 차이는 시험기간의 파종기 차이로 보여짐.

○ 최고 분얼경은 전체적으로 적은 경향이나 경시적 변화를 보면 초기생육에서는 분얼수가 많았으나 상대적으로 유효경 비율이 적었음.

○ 간장은 모품종에서 각각 유의하게 짧아졌으며 수장과 망장도 비슷하거나 줄

어드는 경향으로 T1 세대와 약간의 차이를 보였음.

○ 일수립수는 단원보리는 모품종 30.6립에 비해 T2 line은 26.6립으로, 포기당 이삭수도 모품종 12.9개에서 T2 line 9.0개로 감소하였으며, 진양보리도 같은 경향으로 모품종의 일수립수는 30.5립 에서 T2 line은 27.0립으로, 이삭수도 모품종 10.8개에서 T2 line 7.4개로 감소하였음.

○ 출수시기와 개화기가 빨라지는 현상은 T1세대에 이어 T2세대에서도 관찰되었다. 우려했던 천립중의 감소는 나타나지 않았고 오히려 개화기 단축에 따른 등숙일수의 증가로 인하여 모품종에 비해 높게 나타나거나 비슷하게 나타남 것으로 보아 *OsMADS1* 유전자의 발현으로 개화기와 등숙기를 단축시킬 수 있다는 것이 확인되었다.

○ 이는 국내에서 개발한 최초의 형질전환 보리품종으로서 향후 육종을 통한 품종개량에 유용하게 이용될 것으로 사료된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절. 연차별 연구개발 목표의 달성도

1. 1차년도 (2001) 연구개발 목표의 달성도

가. 형질전환체 생산(100% 달성)

이미 전 세계적으로 보리의 형질전환은 보고 된 바가 있으나(Lührs and Lörz, H 1998) 국내에서는 그동안 보리의 형질전환체를 생산하지 못하고 있었다. 따라서 1차년도 목표를 우선 그간의 보고된 방법을 참조로 하여 실험계획을 수립하여 형질전환체 생산을 추진하였으며 *OsMADS1* 유전자의 보리에서의 형질전환 여부를 PCR을 통하여 확인하였다.

- Particle bombardment를 통한 형질전환 방법으로 bar selection maker로 basal medium 에 1차적으로 PPT 3mg/L로 선별과정 후 2차적으로 5mg/L를 첨가한 선별과정을 통해 *OsMADS1* gene 이 전달된 개체를 생산하였음.

나. 식물체 형질전환 효율향상(90% 달성)

보리의 형질전환은 매우 까다롭기 때문에 형질전환 효율이 매우 낮은 것으로 알려져 있다. 국내에서는 보리의 형질전환 system이 아직 확립되지 않았기 때문에 1차년도에는 좀더 가능한 형질전환 system 이 무엇인지 알아보기 위하여 particle bombardment의 직접도입법과 *Agrobacterium*을 이용한 간접도입법을 시행하여 향후 2년 내에 다양한 품종들의 형질전환과 형질전환체의 포장에서의 생산을 남은 기간 동안에 이루기 위해서는 효율이 높고 형질전환이 확실히 이루어지는 particle bombardment에 의한 형질전환을 하고자 하였다.

1). 형질전환 방법 선발(100% 완료)

미성숙배 배양 캘러스 체계를 확립하여 하였으며, 형질전환 방법으로 particle bombardment를 이용하는 방법을 선택하였음.

2) 배지 및 배양환경 개선(90% 달성)

- 배지 개선 : 당초 과제 신청서 기재내용에서 실험예정이었던 배지는 MS, WI4, C17, CI 였으나, 그 중 효율이 높은 것으로 보고 된 PL, L1 배지 등을 추가로 실험하여 CI, PL, L1, MS를 기본배지로 하여 callus 유도율의 최적 조건을

확립함.

- 배지성분 및 성장조절물질 개선 : 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid, Benzylaminopurine, Naphtalene acetic acid를 첨가하여 callus 유도 효율을 향상 시킴

- 배양 환경 개선 : callus 재분화 system을 구축을 위해 배양시기, 전처리, 배양조건(온도, 광)을 개선하여 보리 재분화 효율을 개선함

2. 2차년도 (2002) 연구개발 목표의 달성도

가. 형질전환 효율 향상(100%)

형질전환 캘러스의 생존율 향상을 위한 형질전환 방법의 개선 방법으로 전년도 실험내용의 개선사항을 통해 형질전환시기에 대한 효율을 향상 시켰으며, 형질전환 분화조직을 관찰하기 위해 GUS 분석을 통하여 형질전환 여부를 확인하였다.

나. 미숙배유래 callus의 다량 생산 체계 수립(100%)

미숙배 유래 callus를 식물성장조절물질을 중심으로 배지성분을 실험하고 배양조건을 개선함으로써 다량 생산체계를 수립 하였다.

다. *OsMADS1* 개화조절유전자 형질전환체 및 생육특성조사 (100%)

1차년도에 형질전환체를 이미 생산하여 PCR과 Sequencing을 통해 유전자 삽입을 확인 하였고 BASTA[®]살포 (250 mg/L)를 통해 대조군과는 달리 아무런 장애 없이 생존하는 것을 확인하였다.

형질전환체 종자를 2차년도에 호남작물 시험장의 GMO온실에서 재배를 하였다. 형질전환 T1계통 중 진양보리와 단원보리를 각각 17개 계통씩 양성하였고 생육특성을 검정하였다. 조사결과 *OsMADS1*유전자의 특성인 출수기의 단축이 이루어짐을 확인하였다.

3. 3차년도 (2003) 연구개발 목표의 달성도

가. 형질전환 기술 체계 확립(100%)

진양, 단원 보리를 대상으로 한 1차년도 형질전환체 생산율 0.6%에 비하여 3차년도 형질전환체 생산율은 1.5%로 2.5배 효율이 향상되었음을 확인하였다.

나. 후대 형질전환 계통의 생물검정(100%)

1, 2차 년도에 이미 생산된 형질전환체를 호남작물 시험장의 GMO 온실에서

재배하였다. 형질전환체는 진양보리와 단원보리의 T2, T3를 생산하였고 T2 계통은 진양보리 102개체, 단원보리 29개체를 양성 생육 특성을 검정하였다. 검정결과 *OsMADS1* 유전자의 특성인 출수기가 빨라지고 등숙이 빨라지며 종자의 무r 계는 오히려 증가하거나 유사한 것으로 나타났다.

다. 후대 형질전환 계통의 외래유전자 발현 검정

T2와 T3 계통에서 분석을 통하여 *OsMADS1* 유전자의 형질전환 여부와 발현 여부를 확인하였다.

2절. 연도별 세부 연구 추진율

1. 1차년도 (2001) 세부 연구율

세부 연구 분야	월 단 위 추 진 계 획														진도 (%)
	2001년					2002년									
	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
o 유용유전자의 보리 형질전환 기술체계 확립															
- 적정 형질전환방법 확인															120
- 형질전환 효율향상															90
- 식물체 재분화 효율향상															100
- 재분화 배지 개선															90
총진도율															100

2. 2차년도 (2002) 세부 연구율

세부 연구 분야	월 단 위 추 진 계 획														진도 (%)
	2002년					2003년									
	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
○ 형질전환 효율 향상															
- 형질전환 캘러스의 생존율 향상을 위한 형질전환 방법의 개선															100
· 형질전환 시기 · 캘러스의 상태															
- 형질전환 분화조직 GUS 분석															100
○ 미성숙배 callus의 다량 생산체계 수립															
- 계대배양에 따른 캘러스의 활력 검정															100
· 분화능 및 생존력															
- 형질전환 캘러스의 분화능 검정															100
- 형질전환식물체의 배양 및 재배 검정															90
- 배지 및 배양조건 개선															100
○ 형질전환 식물체 특성 조사															100
- 형질전환 식물체 GMO 격리 온실 양성 (T1 27 계통 102 개체)															100
-농업적 특성 검정															100
총진도율															100

3. 3차년도 (2003) 세부 연구율

세부 연구 분야	월 단 위 추 진 계 획														진도 (%)
	2003년					2004년									
	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7			
○ 형질전환 기술 체계 확립															
- 분화 식물체의 형질전환 효율 향상															100
○ 형질전환체 검정															
- PCR (Southern blot)															100
- RT-PCR (Northern blot)															100
- 재분화 식물체의 형질전환 확인 PCR 등															90
○ 후대 <i>OsMADS1</i> 유전자 확인															
- 형질전환체 식물체 GMO 격리 온실 양성															100
- <i>OsMADS1</i> 유전자 검정															100
총진도율															100

○ 당초계획은 진도는 ————— 표시

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

이상과 같은 결과는 국내에서 최초로 보리의 형질전환을 성공시킨 사례라고 판단한다. *OsMADS1* 유전자는 벼에서 개화를 촉진하는 조절유전자 중의 하나인 것으로 알려져 왔으며(An GH 1994) 보리에서도 이러한 동일한 결과가 확인이 되었다. T1과 T2 및 T3세대에서 DNA삽입이 확인되고 RNA발현이 나타나는 것으로 보아 유전자는 분리가 되지 않고 안정적으로 유지되는 것으로 판단된다. 또한 종자 수확량의 감소는 일어나지 않는 것으로 보아 유용한 조숙품종으로의 개발이 가능한 것으로 여겨진다.

본 종자는 보리 연구를 하는 국가 기관인 작물과학원과 호남농업연구소에 제공하여 계속해서 농업적 특성검정을 실시할 것이며 이를 바탕으로 *Agrobacterium* 을 매개로한 방법 등 형질전환 기법의 다양화를 시도할 예정으로 있다. 따라서 궁극적으로 애초에 구상하였던 다음과 같은 기대효과를 달성할 것으로 판단된다.

- 유전공학 기술의 실용화 체계 확립
- 논밭 작부체계의 안정화 체계 확립
 - 밭에서의 보리+고구마, 보리+콩 등 작부체계 확립
 - 논에서의 벼+보리, 작부체계 확립
- 농가소득 향상 및 국가농업 경제의 획기적 개선

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해외에서는 particle bombardment에 의한 보리의 형질전환의 경우에는 독일 함브르크 대학의 Loerz 교수팀이 주로 많이 실시하고 있으며 *Agrobacterium*을 매개로한 경우에는 Koeln의 Maxplankt 육종학 연구소에서 가장 성공적으로 실시되고 있다. 이들 연구자들이 주장하는 형질전환의 노하우는 숙련된 기술 인력의 확보와 재료의 선택이 가장 중요하다고 한다.

미성숙배라는 한정된 재료의 선택을 해야 함은 결국 좋은 재료를 공급하기 위해서 이에 걸 맞는 시설을 갖추는 것이 급선무이며 기후조건에 관계없이 튼튼하게 정상적 보리 재배를 해야 하는 문제점을 해결해야만 한다.

현재 독일의 Koeln에 있는 Maxplankt 육종학연구소로부터 얻은 정보를 통해서 *Agrobacterium*을 매개로한 형질전환을 시도하여 선별하고 있는 중이다.

제 7 장 참고문헌

Adelina T, Sten M, Annette O (2001) *Agrobacterium*-mediated transgene delivery and integration into barley under a range of in vitro culture conditions. *Plant science* 161:871-880

An GH (1994) Regulatory genes controlling flowering time or floral organ development. *Plant Mol. Biol.* 25:335-337

Bregitzer P, Dahleen LS, Campbell RD (1998) Enhancement of plant regeneration from embryogenic callus of commercial barley cultivars *Plant Cell Rep.* 17:941-945

Chan MT, Lee TM, Chang HH (1992) Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Physiol.* 33: 577-583

Chang Y, Zitzewitz J von, Hayes PM, Chen TH (2003) High frequency plant regeneration from immature embryos of an elite barley cultivars (*Hordeum vulgare* L. cv. *Morex*) *Plant Cell Rep.* 21:86-80

Cho MJ, Jiang W, Lemaux PG (1998) Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. *Plant Sci* 138:229-244

Chung YY, Kim SR, Finkel D., Yanofsky MF, An GH (1994) Early flowering and reduced apical dominance result from ectopic expression of a rice MADS box gene. *Plant Mol. Biol.* 26: 657-665

Fang YD, Akula C, Altpeter F (2002) *Agrobacterium*-mediated barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation using green fluorescent protein as a visual marker and sequence analysis of the T-DNA :: barley genomic DNA junctions *J. Plant Physiol.*

Funatsuki H, Kuroda H, Kihara M, Lazzeri PA, Meuller E, Lörz H, Kishinami I (1995) Fertile transgenic barley generated by direct DNA transfer to protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* 91:707–712

Goldstein GS, Kronsad WE (1986) Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley, *Hordeum vulgare* *Theor. Appl. Genet.* 71: 631–636

Gurel F, Gozukirmizi N (2000) Optimization of gene transfer into barley (*Hordeum vulgare* L.) mature embryos by tissue electroporation. *Plant Cell Rep.* 19:787–791

Hagio T, Hirabayashi T, Machii, Tomutsune H (1995) Production of fertile transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plants using the hygromycin-resistance marker. *Plant Cell Rep.* 14:329–334

Han MJ (1998) GUS Analysis for transformation via *Agrobacterium tumefaciens* and Regeneration of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Master Theses of Dongguk University

Han MJ, Lee DW (1999) Effects of various Medium Components on plant Regeneration and formation of embryogenic callus from immature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.) *The Korean Journal of Plant Breeding* 31(3):246–253

Harwood W, Ross S, Bulley S, Travella S, Busch B, Harden J, Snape J (2002) Use of the firefly luciferase gene in a barley (*Hordeum vulgare*) transformation system. *Plant Cell Rep.* 21:0721–7714

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.

Holm PB, Olsen O, Schnorf M, Brinch-Pederson H, Kundsén S (2000) Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts.

Transgenic Res 9:21-32

Huixia W, Alex CM, Malcolm C. Elliott, Dong-Fang Chen (1998) *Agrobacterium*-mediated stable transformation of cell suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54: 161-171

Jähne A, Becker D, Brettschneider R and Lörz H (1994) Regeneration of transgenic microspore-derived fertile barley. Theor. Appl. Genet. 89:525-533

Junker B., Zimny J., Lührs R., Lörz H (1987) Transient expression of chimeric genes in dividing and nondividing cereal protoplasts after PEG induced DNA uptake. Plant Cell Rep. 6 : 329-332

Kang HG, Jeon JS, Lee SC, An GH (1998) Identification of class B and class C floral organ identity genes from rice plants Plant Molecular Biology 38 : 1021-1029

Kartha KK, Chibbar RN, Georges F, Leung N, Gaswell K, Kendall E, Qureshi J (1989) Transient expression of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene in barley cell cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. Plant Cell Rep. 8 : 429-432

Kihara M, Saeki K, Ito K (1998) Rapid production of fertile transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) by direct gene transfer to primary callus derived protoplast. Plant Cell Rep. 17: 937-940

Koperk T, Haensch R, Nerlich A, Memde RR, Schulze J (1996) Fertile transgenic barley of different cultivars obtained by adjustment of bombardment conditions to tissue response. Plant Sci. 119:70-91.

Lazzeri PA, Brettschneider R, Luehrs R and Lörz H (1991) Stable transformation of barley via PEG-induced direct DNA uptake into protoplasts. Theor. Appl. Genet 81:437-444

Lynn S. Dahleen and Phill Bregizer (2002) An improved media system for

high regeneration rates from barley immature embryo derived callus cultures of commercial cultivars. *Cro Sci.* 42:934-938

Manohatan M, Dahleen LS (2002) Genetic transformation of the commercial barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar conlon by particle bombardment of callus. *Plant Cell Rep.* 21:76-80

Murray F, Brettell R, Matthews P, Bishop D, Jacobsen J (2004) Comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation of four barley cultivars using the GFP and GUS reporter genes. *Plant Cell Rep.* 22: 397-402

Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, Hinata K (1995) Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in indica rice. *Plant Cell Rep.* 15: 727-730.

Rikiishi K, Matsuura T, Maekawa M, Noda, Takeda K (2003) Barley lines showing prominent high green shoot regeneration in cultures derived from immature embryos. *Plant Breeding* 122:105-111

Ritala A, Mannonen L, Aspegren K, Kurtén U, Hannus R, Lozano JM, Teeri TH, Kauppinen V (1993) Strable transformation of barley tissue culture by particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 12:317-325

Ritala A, Aspegren K, Kurten U, Marttila SM, Mannonen L, Hannus R, Kauppinen V, Teeri TH and Enari TM (1994) Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. *Plant Mol. Bio.* 24:317-325

Salmenkallio martila M, Aspegren K, Akerman S, Kurtén U, Mannonen L, Litala A, Teeri TH, Kaauppinen V (1995) Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) by electroporation of protoplasts. *Plant Cell Rep.* 15:301-304

Thompson, CJ, Novva NR, Tizard R, Crameri R, Davies JE, Lauvereys M, Botterman J. (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene BAR from streptomyces hygroscopicus. *EMBO J.* 6: 2519-2523

Tingay S, McElroy D, Kalla R, Fieg S, Wang M, Thronton S and Brettell R

(1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. The Plant Journal 11(6):1369-1379

Wan Y, Lemaux PG (1994) Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. Plant Physiol 104:37-48

Zhabg S, Cho MJ, Koprek T, Yun R, Bregitzer P, Lemaux PG (2002) Genetic transformation of commercial cultivars of oat (*Avena sativa* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) using *in vitro* shoot meristematic cultures derived from germinated seedlings. Plant Cell Rep. 18:959-966