

검정콩에서 기능성물질 안토시아닌 함량 증가를  
위한 분자유종학적 연구  
Molecular Studies on Increase of Anthocyanin Content  
in Black Soybean

동 아 대 학 교

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “김정콩에서 기능성물질 안토시아닌 함량 증가를 위한 분자육종학적 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 30 일

주관연구기관명 : 동아대학교

총괄연구책임자 : 이 재 현

세부연구책임자 : 정 영 수

연 구 원 : 김 기 영

연 구 원 : 신 상 현

협동연구기관명 : 경상대학교

협동연구책임자 : 정 종 일

## 요 약 문

### I. 제 목

검정콩에서 기능성물질 안토시아닌 함량 증가를 위한 분자유종학적 연구

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 검정콩은 오래 전부터 한방약으로 사용할 만큼, 식품 및 영양학적 기능 외에 탁월한 약효를 갖고 있기 때문에 건강 기능성 관련 유전자에 대한 클로닝 및 분석이 필요하다.
2. 국내 콩 유전자원을 germplasm source로 이용하여 신품종으로 육성하기 위하여 콩에 대한 종합적이고 체계적인 분류와 건강기능성 성분에 대한 실용적 기초조사가 필요하다.
3. 안토시아닌과 같이 검정콩에서만 특이적으로 발현하는 유전자 (seed specific gene)의 분리를 통하여 seed specific 프로모터 개발이 필요하다.
4. Flavonoid path way에 관련된 유전자들과 안토시아닌과 같은 기능성물질을 생산하는 유전자들과의 상호작용에 대한 모델이 필요하다.
5. 생명공학기술을 실제적인 작물분자유종분야에 접목시키기 위해서는 형질전환기술의 개발이 필수적이다.
6. 세계적으로 유전자조작식물(GMO)에 대한 거부감에도 불구하고 각국의 농업관계연구기관과 회사들은 품종특성이 향상된 유전자조작식물 생산의 연구에 박차를 가하고 있는 실정이다.

7. 한반도는 세계적인 콩 유전자원의 원산지이며, 20,000여점이 넘는 다양한 germplasm을 확보하고 있음에도 불구하고 국내에서는 형질전환과 같은 바이오텍 기술을 이용한 콩 분야의 연구가 전무한 실정이다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 안토시아닌 관련 유전자 library 확보 및 database구축
2. 수집된 야생종 및 재배종 콩에서 안토시아닌 생리 생화학적 분석
3. 안토시아닌 유전자의 유전 분석
4. 콩 형질전환 : 국내 콩 품종 재분화 검정

### Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 본 연구의 결과로 확보하게 될 콩 유전자원에 대한 체계적인 분류와 정보 및 유전자 database는 건강 기능성을 가진 콩 신품종을 육성하는데 매우 유용하게 쓰일 것이다.
2. 본 연구의 결과로 다양하고 종합적인 연구에 의한 콩의 유전자 클로닝 및 형질 전환 체계가 확립됨으로써, 기능성유전자에 대한 분자유전학, 생리생화학 및 생리유전학 등 생물 기초 연구분야 및 본 연구를 통하여 분자유전학과 유전학 혹은 유전학과 생리학 사이의 학문적 Gap을 제거 할 수 있는 교량역할을 함으로써, 기초 학문분야와 응용학문분야의 활성화에도 과급효과가 있을 것이다.
3. 콩에 대한 형질전환 체계가 확립됨으로써, 생명공학 기술을 도입한 콩 육성에 획기적인 기여를 하게 될 것이다.

## SUMMARY

In order to achieve highly efficient soybean transformation method, genotype screen of Korean soybean cultivars for amenability to Agro-infection and diverse experimental trials have been introduced in the current study such as hormone pre-culture and various selection techniques. The active genome projects from several academically and economically important plants have provided sequence data of many genes and accumulated in Gene Bank data base promptly. Some of those genes reported have high potentials to improve plant quality in agronomical and industrial uses. However, difficulties to achieve the successful introduction of those valuable genes into plant can be found in recalcitrant genetic transformation procedure of some agriculturally important crops. Especially none of research group in Korea have succeeded to report any formal results on the production of genetically engineered soybean variety or research publication, even though there have been several GMO soybean varieties released from abroad soybean seed companies. To achieve long term goal for producing high-value soybean variety by genetic transformation, there are couple of procedures to be improved. First, genotype screen of Korean soybean varieties whether they are amenable to Agro-infection and tissue culture responsive has to be done. Second, efficiency for genetic transformation has to be increased. In this study various experiments have been carried to achieve both proposed goals.

To determine the amenability of Korean soybean cultivars to *Agrobacterium* infection most commonly grown 31 Korean cultivars were used for genetic transformation. Cotyledonary node was used as a explant and inoculated with *Agrobacterium* strain LBA4404 harboring pTOK233, super binary vector. After placement on selection media containing 10ppm of hygromycin, 4 to 6 week old

shoots(0.5 - 1cm) were stained with GUS solution. Shoot formation rates were high in Muhankong(12%), Manrikong(10%), Eunhakomg(19%), Daewonkomg(23%), and high frequency of GUS positives were observed in Ilpungkumjeongkong, Muhankong, Eunhakomg, Daewonkomg. In addition that, strong GUS expression was found in Jangmikong and Baekwunkong.

A series of experiments were carried to determine optimal condition for soybean transformation. For washing reagent, timentin had chosen because of its positive effect on regeneration and clear removal of *Agrobacterium* over cefotaxime. Hygromycin was used as a selection agent. The result indicated that best concentration of hygromycin was 30ppm in shoot induction media and 10 or 15ppm in shoot elongation media. In another experiment, three different agar concentrations(0.4, 0.6, 0.8%) were tested. Among three tested, high shoot formation was observed in 0.6% and 0.8%, and overall transformation was great in 0.8% agar concentration. For better selection of transformants at the early stage, orientation of placement(flat side up or down) was investigated. The GUS result showed that higher transformation rate was obtain when flat side(adaxial) was placed down by directly contacting Agro-infected area on the selection media. In two different wounding methods, either using scalpel or using a bundle of needles, wonding by needles gave high frequency of GUS positive.

To increase transformation frequency hormone pre-culture during co-cultivation was applied. In shoot formation, the highest rate was observed from the non-treated(18%) and BA(6-benzylaminopurine) 5ppm(13%) and BA 10ppm(11%) followed, unexpectedly. And no clear difference in GUS positive ratio was confirmed among three treatments. However, strong GUS staining was found in hormone treated ones as well as better survival of transformed shoots in later shoot elongation(SE) media. No survival of shoots was observed in non-treated ones. After introducing hormone pre-culture during co-cultivation, hygromycin concentration for optimal selection was reestablished. Hygromycin 5 & 10ppm were effective for shoot formation and emergency of GUS positives than hygromycin 20ppm. Like the previous result, all the shoots from the non-treated ones died during later selection in SE media. In the experiment to determine proper orientation of placement, higher GUS positive were observed

in the placement of flat side down direction. The results of hormone pre-culture during co-cultivation indicated that high frequency of early shoot formation did not always lead to high frequency of genetic transformation, as shown in non-treated shoots; high frequency of shoot formation but no survival in later selection. Therefore, much effective selection method to minimize early escapes was searched. We introduced liquid selection instead of selection in solid media with limited contact. The result showed that GUS positive ratio was nearly double in the hormone treated(80%) after liquid selection than in the non-treated(44%). And survival rate of transformed shoots was also high in the hormone treated(33%) than in the non-treated(10%).

Recent reports on soybean transformation revealed that addition of thiol compounds, L-cystein, dithiothreitol(DTT), and sodium thiosulfate, improved T-DNA delivery by inhibiting the activity of plant pathogen- and wound-response enzymes, such as peroxidases (PODs) and polyphenol oxidases (PPOs). We compared regeneration frequency of shoots with or without thiol compounds addition to co-cultivation media. The efficiency of regeneration significantly increased from an average of 14.7% to 23%. We also observed much higher survival of transformed shoots in long-lasting selection on hygromycin-containing media and enhanced proliferation of multiple shoots.

## C O N T E N T S

Chapter 1. Summary of research .....	8
Chapter 2. Current status of research area .....	11
Chapter 3. Results .....	12
Chapter 4. Achievements and contributions of results .....	39
Chapter 5. Application of results .....	41
Chapter 6. Scientific information from foreign research .....	42
Chapter 7. References .....	43



## 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	11
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	12
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	39
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	41
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	42
제 7 장 참고문헌 .....	43

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## I. 연구개발의 필요성

### 1. 연구의 배경

한반도에서 콩 (대두, soybean)은 약 기원전 1,500년경부터 재배되었을 것으로 추정되며, 쌀, 보리, 밀과 더불어 식생활에 중요한 식용작물이다. 또 인간 및 가축을 위한 주요 단백질 및 지방 공급원으로 이용가치가 점점 증가되고 있을 뿐만 아니라, 질소 고정균인 뿌리혹 박테리아가 콩의 뿌리에 공생하기 때문에 토양의 지력을 유지시키는데 크나큰 역할을 해왔다. 콩은 극히 일부 지방을 제외하고는 기후가 알맞아 한반도 전역에 재배되고 있으며, 특히 남한에서는 어디에서나 널리 재배되고 있다. 또 시비량이나 농약의 투입이 적어서 환경 보존 면에서도 유리하며, 맥후작이나 간혹작 및 주위작 등 작부체계 면에서도 매우 유리한 특성을 지니고 있다. 그러나 오랜 재배 역사와 유리한 재배환경을 가지고 있음에도 불구하고, 최근 들어 콩의 수요가 크게 늘어나면서 전체 식용 콩 자급율은 35% 수준에 불과한 실정이다. 그래서 정부에서는 향후 세계 식량위기에 대처하기 위하여 2002년까지 45% 이상 식용 콩의 자급률을 높이기 위하여, 콩 육종사업에 많은 투자를 계획하고 있다.

일반적으로 콩 육종 목표는 시대적 요구에 따라 변화되며, 그 때의 농업 사정의 영향을 강하게 받는데, 무엇보다도 중요한 목적은 인간이 보다 효율적으로 이용할 수 있게 유전적인 특성을 개량하여, 양적 질적으로 우수한 품종을 만드는 것이 첫 번째 목표가 된다. 지금까지 선진국에서의 콩 육종 목표는 주로 수량증가, 단백질 및 지질의 질적 양적 개량 및 병해충 저항성 품종 육성을 위하여 많은 연구가 수행되어 왔다. 그러나 재배면적이 협소하고, 연구투자가 선진국에 비하여 적은 우리나라에서 콩 육종은 부가가치를 높일 수 있는 특수한 성분을 갖고 있는 건강기능성 품종육성을 통하여 연구의 차별화 및 연구의 선점을 이룸으로써, 콩재배의 확대와 농가 소득 증대를 꾀할 수 있다.

콩이 포함하고 있는 건강 기능성으로는 항암·항산화 효능, 그리고 골다공증, 신부전, 심장질환 등과 같은 만성질환에 대한 탁월한 예방효과가 있고 이와 같은 기능은 콩에 포함된 아이소플라본, 안토시아닌, 콩단백질, 펩타이드, 트립신 저해제, 사포닌 등과 같은 성분에 기인하는 것으로 알려져 왔다. 우리민족의 전통식품인 된장, 청국장, 콩나물 등과 두부, 두유 등과 같은 형태로 우리국민의 식생활과 선조 대대로 함께 해온 콩은 우리가 계속 섭취하고 식문화를 발전시켜야하는 중요한 농산

물임에 틀림없다. 이런 관점에서 국민들의 건강과 대두에 대한 관심과 소비증대를 위하여 콩의 건강기능성에 보다 초점이 맞춰진 신제품의 육성이 시급한 현실이라 하겠다. 특히 검정콩은 옛부터 식품 영양학적 기능 외에도 탁월한 약리적 효과가 있어서 한방약으로도 널리 이용되어 왔다. 그러나, 검정콩 종실의 성분은 단백질이 약 40%, 지방이 20%, 단수화물이 10% 등, 성분면에서 일반 황색콩과 큰 차이가 없고, 단지, 종피에 안토시아닌 색소가 고농도로 축적되어 있을 뿐이다. 결국 과거로부터 약용으로 이용된 검정콩의 약리활성은 종피에 다량 축적된 안토시아닌 색소의 약리작용에 의해 기인된 것으로 추측 할 수 있다. 안토시아닌은 주로 가공식품의 천연색소 및 식품보조제, 향장공업의 착색원료로 이용되고 있으나, 최근에 항산화, 항고혈압, 항암 활성의 탁월한 약리적 효과가 점차 밝혀지고 있다. 그러나, 지금까지 검정콩에서 안토시아닌에 대한 분자유전학적 연구 및 함량을 높이기 위한 연구는 제대로 수행되고 있지 않은 실정이다. 최근 들어 플라보논 (flavanone) 형성에 대한 pathway가 점차 밝혀짐으로써, 이에 대한 연구가 활성화되고 있다. 플라보논의 pathway는 3개의 main branch-pathway, 즉, 탄닌, 안토시아닌, 아이소플라본 pathway로 나누어지는데, 이와 같은 pathway는 일곱 개의 Chalcone synthase (CHS) sub-family 들에 의하여 통제된다. 최근 연구에서 CHS 유전자의 활성을 증가시키거나, CHS 유전자 중 일부 유전자의 활성을 차단시킬 경우, 특정한 branch-pathway의 최종산물의 양이 증가된다는 것을 보여 주었으며, 조직 및 성장시기 특이적으로 발현하는 promoter (tissue or developmental specific promoter)를 이용할 시 그 유전자의 발현을 인위적으로 조절할 수 있다는 것이 증명되었다. 그래서 검정콩에서 안토시아닌의 양을 증가시키기 위한 방법으로 세 가지 모델을 제시 할 수 있다. 첫째로 Transcription Factor (예, CRC, Myb 등)를 이용하여 CHS 유전자의 활성을 높이는 방법, 둘째로, 각각의 antisense-CHS를 이용하여 안토시아닌 pathway를 강화시키는 방법, 셋째로, 안토시아닌과 탄닌의 전구체인 dihydroflavonol reductase (DFR) 유전자들 중 안토시아닌에 영향을 주는 유전자의 copy number를 증가시키거나, 탄닌 pathway에 관련이 있는 DFR 유전자의 antisense로 유전자를 block할 경우 안토시아닌의 축적을 증가시킬 수 있으리라 본다. 따라서 본 연구에서는 위와 같은 모델을 바탕으로 분자유전학 및 생명공학적인 방법을 이용하여, 조직 및 성장시기 특이적으로 발현하는 promoter (seed specific-expression promoter)를 사용하여, 본 연구실에서 클로닝한 Transcription Factor (Myb-like protein)와 antisense-CHS 및 antisense-DFR을 이용하여 검정콩에서 안토시아닌의 함량을 높이기 위한 연구를 계획함과 동시에, 국제적 특히 문제로 프로모터 및 유용 유전자의 사용이 제한되고 있는 현실을 타파하기 위하여, 육종학적 방법으로 만들어질 육종집단과, 생명공학적인 방법으로 개발 될 형질전환체의 교잡을 통하여, 검정콩에서 안토시아닌 함량이 높은 건강기능성 콩 신제품 생산을 위한 기초를 마련하기 위하여 이 연

구를 수행하고자 한다.

## 2. 연구의 필요성

### 가. 기술적 측면

- 1) 검정콩은 오래 전부터 한방약으로 사용할 만큼, 식품 및 영양학적 기능 외에 탁월한 약효를 갖고 있기 때문에 건강 기능성 관련 유전자에 대한 클로닝 및 분석이 필요하다.
- 2) 국내 콩 유전자원을 germplasm source로 이용하여 신품종으로 육성하기 위하여 콩에 대한 종합적이고 체계적인 분류와 건강기능성 성분에 대한 실용적 기초조사가 필요하다.
- 3) 안토시아닌과 같이 검정콩에서만 특이적으로 발현하는 유전자 (seed specific gene)의 분리를 통하여 seed specific 프로모터 개발이 필요하다.
- 4) Flavonoid path way에 관련된 유전자들과 안토시아닌과 같은 기능성물질을 생산하는 유전자들과의 상호작용에 대한 모델이 필요하다.
- 5) 생명공학기술을 실제적인 작물분자육종분야에 접목시키기 위해서는 형질전환기술의 개발이 필수적이다.
- 6) 세계적으로 유전자조작식물(GMO)에 대한 거부감에도 불구하고 각국의 농업관계연구기관과 회사들은 품종특성이 향상된 유전자조작식물 생산의 연구에 박차를 가하고 있는 실정이다.
- 7) 한반도는 세계적인 콩 유전자원의 원산지이며, 20,000여점이 넘는 다양한 germplasm을 확보하고 있음에도 불구하고 국내에서는 형질전환과 같은 바이오텍 기술을 이용한 콩 분야의 연구가 전무한 실정이다.

### 나. 경제·산업적 측면

1) WTO 체제 출범으로 농산물 수입 자율화에 따라 국내에서 생산되는 농작물은 일부를 제외하고는 국제경쟁력이 없으나, 기능성물질을 함유한 농작물의 개발은 국제 경쟁력의 우위를 확보할 수 있는 고 소득작물로 인식되고 있다.

2) 농업분야의 치열한 국제 경쟁 속에 국내 농업의 경쟁력을 향상시키기 위하여 콩 유전자원의 효율적인 관리가 필요하며, 콩 유전자원을 학문적이고 체계적인 분류법에 의해 자원등록 함으로써, 국내 유전자원의 유출을 막고 국제적으로 유전자원의 권익을 보호받아야 한다.

3) 풍부한 유전자원의 효율적인 관리를 통하여, 품질 및 기능성이 향상된 21세기형 콩 신품종 생산의 기초를 마련함으로써 국내 콩 생산 및 수요 증대를 통해 농가소득 증대를 이루어야 한다.

4) 형질전환체 생산을 위하여 농업적으로 유용한 유전자나 프로모터를 이용해야 하는데, 이들은 대부분 국제특허로 묶여 있어서, 비싼 로열티를 주고 이용해야하는 실정이므로, 국내에서도 유전자 클로닝 및 프로모터 개발이 시급한 실정이다.

#### 다. 사회·문화적 측면

1) 된장, 간장, 두부, 콩나물 등과 같은 다양한 형태의 민족전통음식의 재료로 쓰이고 있는 콩은 우리민족에게 없어서는 안될 한국 특이적이고 독특한 작물이다.

2) 국민의 건강과 직접 연관된 중요작물로서 콩 유전자원내 항암, 항산화 등 기능성 물질의 발굴을 통하여 식생활을 통한 국민건강을 증진시켜야 한다.

3) 근래에 식문화의 서구화로 어린 세대에서도 당뇨나 비만과 같은 성인병증세가 증가하고 있는데, 건강 기능성 품종개발을 통하여 건전한 식문화를 유도해야 한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### I. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

1. 국내·외에서 기능성물질 관련 유전자의 기작에 대한 연구는 활발히 진행되고 있지만, 검정콩에서 기능성 물질인 안토시아닌 증가를 위한 연구는 시도되어진 바가 없다.
2. 검정콩의 안토시아닌은 포도나 다른 과일의 것보다 양적 질적인 면에서 극히 우수하나, 국제적으로 검정콩 안토시아닌에 대한 연구는 극히 미약하므로, 국내에서 안토시아닌에 대한 연구가 선행된다면, 국제적 경쟁력을 선 점 할 수 있다.
3. 검정콩에서 형질전환을 이용하여 고 함량의 기능성 물질을 지닌 품종의 개발은 이루어진 적이 없다.
4. 현재 국내에서 콩 형질전환에 대한 연구는 전혀 이루어지고 있지 않음.
5. 형질전환체계의 확립을 위하여 품종들에 대한 조직배양적응성과 *Agrobacterium*의 감염여부에 대한 기초 스크린이 있어야 하는데 이와 같은 기초연구가 전무한 실정임
6. 미국에서는 이미 제초제 저항성 콩과 해충저항성 콩을 생산하여 품종화 하였으며, 최근에는 듀풍사에서 콩에 항암·항산화 성분이 보강된 건강 기능성 콩 품종을 육성하여 곧 시판할 예정임.

### II. 앞으로의 전망

본 연구는 콩에서 스트레스를 주었을 때 특이적으로 발현되는 유전자를 선발하는 기초연구 뿐 아니라, 콩의 원산지인 만주 및 한반도 일대에 산재해 있는 수많은 야생종 및 재배종의 안토시아닌 함량 및 특성을 측정하여 isoflavonoid pathway를 지배하는 유전자의 유전학적 연구를 기반으로 실제 육종 프로그램에 응용 가능한 토대를 마련하며, 클로닝된 농업적으로 유용한 유전자를 형질전환 하고, 안토시아닌의 기능성 연구, 품종 및 가공에 따른 함량변화와 특성을 규명하는데 목적이 있기 때문에, 식물

분자유전학 전공자, 작물육종학 전공자, 식품화학 전공자가 밀접하게 협력하여야 가능하다. 따라서 동아대학교 BK21 작물유전자원개발 팀에서 수행하고 있는 cDNA cloning, EST sequencing, Southern 및 Northern 분석, 형질전환 등 분자유전학적 접근방법과, 경상대학교에서 수행하고 있는 콩 육종연구 팀의 온실 및 포장실험 결과를 종합하고, 영남농업시험장에서 안토시아닌의 함량변이와 특성을 규명하여, 보다 체계적이며 전문적인 연구를 실시함으로써 장기적으로 콩의 건강기능성 및 내재해성 육종 모본을 만드는 토대를 마련할 수 있다.

앞으로 선진국의 바이오텍 기술은 계속 향상될 것으로 예상되며, 신기술의 개발과 더불어 바이오텍을 이용한 신품종 육성이 가속화 될 것으로 보이며, 신품종 육성의 방향도 고부가가치를 창출하기 위하여 기능성이 첨가된 품종 육성쪽으로 많은 연구가 집중될 것으로 전망된다.

### III. 기술도입의 타당성

본 연구에 참여하는 연구진은 과제를 수행하기 위한 충분한 연구수행능력을 갖추고 있고, 해외에서도 본 연구진이 수행하려는 것과 같은 콩 유전자원에 대한 종합적이고 체계적인 연구수행시도는 없기에 이와 같은 연구를 수행하기 위한 기술도입의 필요성은 없음.

### IV. 현기술의 취약점

1. 국내에는 수 많은 종류의 안토시아닌 고함량 검정콩 유전자원이 존재 함에도 불구하고, 이에 대한 체계적인 조사와 연구가 미비하였고, 검정콩의 약리작용에 대한 연구가 극히 취약하다.

2. 위에 언급한 유전자들을 이용하여 형질전환 식물체를 만들고자 할 경우 유전자의 충분한 발현을 유도하기 위한 만족할 만한 국부적 식물발현벡터가 없는 실정이다. 특히 식물체의 특정 기관 발현 프로모터, 특정 발달단계 발현 프로모터, 유도 발현 프로모터 등의 사용은 유전자의 발현 수준이 낮아 이에 관한 많은 노력이 요구되고 있다.

3. 콩은 재분화나 형질전환이 어려운 작물이며 지금까지 국내에서는 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있지 않은 실정이다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### I. 연구개발 목표의 달성도

1. 안토시아닌 관련 유전자 library 확보 및 database 구축 : 100 % 달성
  - subtractive library 제작 - 100 %
  - partial sequencing을 통한 EST database 구축 - 100 %
2. 수집된 야생종 및 재배종 콩에서 안토시아닌 생리 생화학적 분석 : 100 %
  - 수집 검정콩 유전자원 증식 : 검정콩 유전자원 100계통 - 100 %
  - 증식 검정콩 유전자원 안토시아닌 분석 : 유전자원 선발 - 100 %
3. 안토시아닌 유전자의 유전 분석 : 100 %
4. 콩 형질전환 : 국내 콩 품종 재분화 검정 : 100 %
  - 조직배양 배지조건 확립 및 선정 - 100 %
  - 국내 콩 품종 수집 및 재분화 능력 검정 - 100 %

### II. 연구수행 방법

1. 콩에서 저온, 상처 등 스트레스 관련 유전자 및 종피 착색단계별 유전자 선발

스트레스를 처리한 콩(tester)과 처리하지 않은 콩(driver)의 mRNA를 double-stranded cDNA로 전환하고, RsaI으로 digestion하여 일정한 크기로 만들어 tester를 둘로 나누어, 서로 다른 adapter를 ligation한 다음 2차례의 hybridization을 실시한다. 첫 번째 hybridization은 서로 다른 adapter를 가진 tester 각각의 tube에 driver를 넣고 1.5  $\mu$ l의 hybridization buffer (50 mM HEPES, pH 8.3, 0.5 M NaCl, 0.02 mM EDTA, pH 8.0, 10% (w/v) PEG 8000)에 혼합하여 98  $^{\circ}$ C에서 2분간 denaturation시키고 68  $^{\circ}$ C에서 8시간 동안 hybridization시킨다. 이들 sample을 denaturation시킨 driver와 함께 섞고, 68 $^{\circ}$ C에서 다시 hybridization한 다음 200  $\mu$ l의 dilution buffer (20 mM HEPES, pH 8.3, 50 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, pH 8.0)로 희석시켜 primer를 사용하여 PCR로 증폭시킨 뒤, T/A cloning (Invitrogen)을 하여 library를 제작한다. 종피 착색 전 콩 (1~20DAF)과 착색 후 콩(25~35DAF)의 시료를

채취하여 위와 같은 방법으로 library를 제작한다.

## 2. Sequencing

Cloning된 cDNA를 정제하여 dye termination method를 이용하여 증폭한 다음 ABI 310 Genetic Analyzer로 automatic sequencing을 한다.

## 3. Full gene cloning

분석하여 선발된 clone들은 유전자의 일부분이므로 full sequence를 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 기법을 이용하여 확보한다. 일부만이 분석된 sequence로부터 specific primer를 만들어 밝혀지지 않은 부분까지 증폭하는 방법이다. 2  $\mu\text{g}$ 의 mRNA와 1  $\mu\text{l}$ 의 cDNA synthesis primer (10  $\mu\text{M}$ )를 잘 섞은 후 70  $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 처리한다. 2  $\mu\text{l}$ 의 5X first strand buffer와 1  $\mu\text{l}$ 의 dNTP (10 mM), 1  $\mu\text{l}$ 의 MMLV reverse transcriptase (100 U/ $\mu\text{l}$ )를 혼합시킨 후에 42  $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간동안 반응하여 first-strand cDNA를 만들고, 이어서 16  $\mu\text{l}$ 의 5X second strand buffer와 1.6  $\mu\text{l}$ 의 dNTP (10 mM), 4  $\mu\text{l}$ 의 20X second strand enzyme cocktail을 잘 혼합하여 16  $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 반응시킨 후에 10 unit의 T4 DNA polymerase를 넣어서 같은 온도에서 1시간 반응시켜 second-strand cDNA를 만든다. 이렇게 만든 double-stranded cDNA에 2  $\mu\text{l}$  cDNA adaptor (10  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{l}$ 의 5X DNA ligase buffer와 1  $\mu\text{l}$ 의 T4 DNA ligase (1 U/ $\mu\text{l}$ )를 잘 섞고 16  $^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight ligation을 수행한다. adapter primer와 gene specific primer를 사용하여 PCR을 수행한다.

## 4. 김정콩 형질전환 기술개발

가. 재료: 김정콩 1호, 김정콩 2호, 일품김정콩

나. 실험내용; 종자는 70% ethanol에 30초간 담궈 1차 표면살균을 하고 1% sodium hypochloride에 30분간 shaking 하면서 소독한 후, 10분 간격으로 멸균수로 3회 수세하였다. Petri-dish에 파종 후 24 $^{\circ}\text{C}$  배양실에서 16시간 광조건과 8시간 암조건으로 5일간 발아시켰다.

콩의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 supervector pTOK233을 가지고 있는 LBA4404를 사용하였다. *Agrobacterium*은 형질전환 3일 전 hygromycin 50mg/ $\ell$ 이 포함된 고체 YEP 배지(yeast 5g/ $\ell$ , pepton 5g/ $\ell$ , NaCl 2.5g/ $\ell$ , pH 7.0)에 streaking 한 후, 28 $^{\circ}\text{C}$  incubator에서 3일간 배양하였다. 공배양 배지로는 100 $\mu\text{M}$ 의

acetosyringone이 포함된 AAM 배지{AAM salts and amino acids(Toriyama and Hinata, 1985), MS vitamins(Murashigs and Skoog, 1962), casamino acid 0.5g/l, sucrose 68.5g/l, glucose 36g/l, pH 5.2}를 사용하였다. 형질전환 당일 왕성히 자란 *Agrobacterium*을 50ml 코닝튜브에 AAM 액체배지를 30ml 채운 후 spatula를 이용하여 OD값 0.5정도의 혼탁액이 되도록 풀어 넣었다. 발아한 식물체의 hypocotyl을 떡잎 밑 약 1cm되는 곳에서 자른 후 양 떡잎 사이로 메스를 넣어 하배축까지 수직으로 자르고 새로 나온 본엽을 제거하였다. 떡잎 기부에서 위로 약 0.5cm와 아래 하배축쪽으로 약 0.1cm 이내의 부위를 scalpel을 이용하여 7-12회 반복하여 상처 내었다. *Agrobacterium*을 희석시킨 AAM 배지에 상처를 낸 떡잎을 20분간 접종시킨 후 flat side를 배지쪽으로 치상하여 3일 간 24°C에서 암배양시켰다. 3일간 공배양 후 *Agrobacterium*의 제거를 위하여 멸균수로 2회 세척한 후 500mg/l의 cefotaxime과 0.05%의 Triton X-100이 포함된 멸균수로 5회 세척하였다. 30ml의 세척 용액을 넣은 50ml 코닝 튜브에 떡잎을 넣었으며, mini 3D-shaker를 이용하여 매회 20분간 상하로 shaking 하였다. 5회 세척된 떡잎은 SI(shoot induction; B5 salt 3.16g/l, BAP 1.67mg/l, sucrose 3%, Agar 0.6%)-①(cefotaxime 500mg/l, hygromycin 30mg/l) 배지에 치상하여 24°C 배양실에서 신초발생을 관찰하였다. 그후 2주 간격으로 SI-②(cefotaxime 200mg/l, hygromycin 10mg/l), SI-③(cefotaxime 100mg/l, hygromycine 10mg/l)로 옮겨 치상하면서 관찰하였다. 형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronie (X-Gluc)을 150 $\mu$ l dimethyl formamide에 녹인 후, 850 $\mu$ l의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. SI 배지 치상 후 0.5cm 크기로 자란 shoot 및 callus는 절단하여 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37°C incubator에서 overnight 처리 하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4°C에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

## 5. 안토시아닌 양상 분석 및 안토시아닌 induction 조건설정

가. 안토시아닌 분석시료 수집: 재래 수집종 및 국내산 안토시아닌 특이 품종

나. 안토시아닌 추출 및 분리: 안토시아닌은 수용성 flavonoid 색소로서 식물체 내에 주로 배당체 형태로 존재하므로 극성이 높고, 중성 또는 알칼리용액에서는 구조적으로 불안정하며, 산성용액에서는 비교적 안정하나, 장시간 강한 빛이나 열에 노출되면 쉽게 고유의 색을 잃어 버린다. 그러므로 검정콩 종피에 함유된 안토시아닌의 추

출시 암소 및 저온조건에서 추출한다. 안토시아닌은 알코올류에 잘 용출되나 순수정제 및 분리시 column 분리를 시도하므로 알코올 함유 정도가 높으면 높을수록 분리도 및 이론단수는 저하되므로 불가피하게 알코올을 증발시켜야 한다. 일반적으로 추출용매를 증발시켜 농축하는 방법은 동결건조, 감압농축 및 질소농축을 이용할 수 있다. 알코올의 경우 빙점이 낮으므로 동결건조가 불가능하기 때문에 일반적으로 알코올의 증발은 감압농축장치를 이용하거나, 질소농축 방법을 쓰지만 감압농축의 경우 불가피하게 온도상승효과가 발생되고, 질소농축시에는 대량농축이 불가능하다. 그러므로 검정콩의 안토시아닌 추출은 구조적 안정을 위해 염산을 첨가한 증류수로 추출하고, 추출 후 열에 의한 노출을 최소화하는 동결건조로 농축하는 것이 바람직하다. 추출 농축된 안토시아닌 조 추출물은 Sephadex LH-20 및 C18 open column chromatography를 실시하여 순수 분리한다.

검정콩에서 안토시아닌을 추출할시 우선 종피와 배 부분을 양분하고, 종피는 1% HCl-H<sub>2</sub>O 용액으로 4. C 조건에서 24시간 씩 3회 추출한다. 추출된 조 색소를 혼합하고 여과지로 여과하여 불용물을 제거한 뒤 -20. C 조건에서 동결 시킨 후 동결건조기에서 물 및 염산을 제거하여 농축한다. 안토시아닌 조 색소의 농축물은 소량의 증류수에 용해하여 Sephadex LH-20 및 C18 open column chromatography를 실시한다. 이때 컬럼의 용리용매는 1% 염산함유-증류수와 1% 염산함유-메탄올을 이용한 stepwise 방식을 사용하여 처음에는 1% 염산함유-증류수만을 사용하여 분리하고, 순차적으로 메탄올의 함량을 증가 시킨다. 분리된 각 분획은 다시 C18 open column chromatography를 실시하여 더욱 순수하게 분리를 수행한 후 reverse phase-HPLC로 단일성분의 순도를 확인한다.

다. 구조분석 : Reverse phase-HPLC에서 단일성분으로 확인된 순수 안토시아닌은 <sup>1</sup>H·<sup>13</sup>C-NMR, FAB-MS, FT-IR, UV-Vis, spectrometer 등의 분광분석 장비를 이용하여 각 안토시아닌의 정확한 구조를 분석한다.

## II. 연구수행 내용 및 결과

세부과제명 : 식물유래 기능성유전자 클로닝

1. 안토시아닌 관련 유전자 library 확보 및 database구축:

Suppression subtractive hybridization (SSH)을 통해 얻은 subtracted cDNA를

TA cloning vector에 삽입하여 대장균에 형질전환 시킨 결과, 상처와 저온처리, 종자 발달단계에서 각각 1500여개씩, 도합 4500여개의 양성 colony를 확보하였다. SSH에서 확보한 유전자 library로부터 differential screening 방법으로 300여개의 스트레스 유도 cDNA 및 100여개의 종자발달 특이적 유전자 선별하였다. SSH와 differential screening을 거쳐 얻어진 400개의 cDNA clone들의 염기서열을 결정하고 blastx 분석을 통해 타 유전자와의 상동성을 분석하였다 (Table 1, Table 2, Table 3 참조). 그 결과 다양한 생체반응에 관계하는 유전자들을 확인할 수 있었다. 상처유도 유전자로는 pathogenesis-related protein, DnaJ-like protein, lipoxygenase, cytokinin-repressed protein, RNA binding protein, beta-amyrin synthase 등이 있었고, 저온 유도 유전자로는 ribosomal proteins, cold-stress protein, asparaginase, metalloproteinase, translation elongation factors, granule-bound starch synthase, RNA helicase등이 확인되었다. 종자발달 초기에 발현되는 유전자로는 aluminum-induced protein, dormancy related protein, terminal flower TFL1, proline-rich protein, phosphate transporter 등이 확인되었다. 그러나, 종자발달후기에 주로 발현되는 유전자들은 모두 conglycinin, glycinin등 이미 잘 알려진 seed storage protein들이었다.

안토시아닌관련 주요유전자들의 full-length cDNA를 확보하기 위해, 7일된 콩나물 에 yeast elicitor와 빛을 처리하여 유전자발현을 유도한뒤에 hypocotyl에서 mRNA를 분리하여 RACE용 cDNA를 합성하였다. SSH database와 Genbank database, TIGR database를 검색해 chalcone isomerase, dihydroflavonol reductase, anthocyanidin synthase (leucoanthocyanidin dioxygenase), anthocyanidin reductase의 염기서열 정보를 확보한 후, 그 염기서열정보를 토대로 RACE PCR primer를 제작하였고, 앞서 합성한 cDNA로부터 PCR를 통해 각 유전자의 cDNA를 확보하였다. 각 cDNA는 pGEM-TEasy vector에 삽입하여 그 염기서열을 확인하였다. Blastx 검색결과 각 cDNA가 타 작물의 동일 유전자와 높은 상동성을 보이고 있음이 확인되었다.

GmCHI (chalcone isomerase) 는 775 bp의 길이에 218 aa의 단백질을 암호화하고 있으며, *Pueraria montana*의 chalcone flavanone isomerase와 85 %의 상동성을 보였다. Chalcone isomerase는 chalcone을 flavonone으로 변환시켜주는 효소로서, 플라보노이드 합성에 있어서 bottleneck 으로 작용한다는 보고가 있다. GmDFR (dihydroflavonol reductase)은 1181 bp의 길이에 348 aa의 단백질을 암호화하고 있으며, *Lotus corniculatus*의 dihydroflavanol reductase 3와 87 %의 상동성을 보였다. Dihydroflavonol reductase는 안토시아닌합성의 key enzyme으로 많은 연구가 이루어진 효소이다. GmANS (anthocyanidin reductase)는 약 1.3 kb의 크기이며 아직 sequencing이 완료되지 않았지만, 일부 염기서열의 Blastx search 결과, *Vitis labrusca*의 leucoanthocyanidin dioxygenase (anthocyanidin synthase)와 80 %의 상동성을 보였다. Anthocyanidin synthase는 DFR에 의해 생성된 leucoanthocyanidin을 산

화시켜 anthocyanidin을 합성하는 효소로서, 안토시아닌 합성에 있어 결정적인 역할을 한다.

GmANR (anthocyanidin reductase)는 약 1.2 kb의 크기이며 아직 sequencing이 완료되지 않았지만, blastx search 결과 *Medicago truncatula*의 anthocyanidin reductase와 84 %의 상동성을 보였다. Anthocyanidin reductase는 최근에 새롭게 규명된 효소로서 anthocyanidin을 환원시켜 프로안토시아닌의 전구체인 flavan-3-ol을 합성하는 효소로서, 프로안토시아닌 합성에 key step으로 받아들여지고 있다. Anthocyanidin reductase gene (BAN)이 기능을 못하는 애기장대 돌연변이체의 경우, 프로안토시아닌 축적이 줄어드는 대신 종자발달 초기부터 안토시아닌의 축적이 이루어진다.

표 1. 상처에 의해 유도되는 유전자

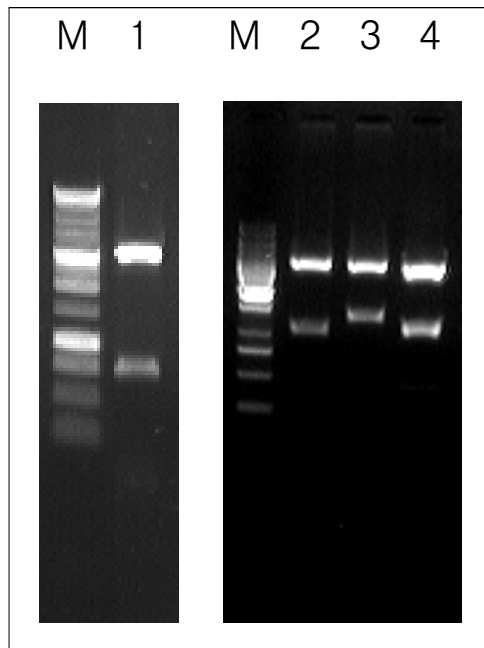
Clone #	Homology to (% identity)	Clone #	Homology to (%identity)
W12	pathogenesis related protein [H. vulgare] (48%)	W157	CCAAT-binding transcription factor subunit B [N. tabacum] (70%)
W23	heat shock-like protein [P. glauca] (45%)	W179	Similar to receptor-like serine/threonine kinase [A. thaliana] (50%)
W33	beta-amyrin synthase [G. glabra] (93%)	W244	Pentameric polyubiquitin [N. tabacum] (98%)
W37	Zinc metallothionein class II homolog [P. hybrida] (40%)	W274	Vegetative storage protein [G. max] (98%)
W51	Cytokinin-repressed protein CR9 [C. sativus] (74%)	W313	Retrovirus-like element calypso2-2 [G. max] (93%)
W86	putative alanine aminotransferase [A. thaliana] (74%)	W320	Retroelement diaspora gag-pol polyprotein [G. max] (85%)
W107	Proline-rich protein [A. thaliana] (42%)	W328	Cell wall protein (SbPRP3) precursor [G. max] (100%)
W114	Lipoxygenase L-5 [G. max] (84%)	W463	Nodulin-26 [G. max] (93%)
W123	Oligouridylate binding protein [N. plumbaginifolia] (61%)	W646	Putative glycine dehydrogenase [A. thaliana] (93%)
W139	Acyl-CoA synthetase [B. napus] (62%)	W732	Histon H2A [A. thaliana] (96%)
W143	Dihydroflavonol 4-reductase-like [A. thaliana] (67%)		

표 2. 저온에 의해 유도되는 유전자

Clone #	Homology to (%identity)	Clone #	Homology to (%identity)
LT3	Putative retroelement pol polyprotein [A. thaliana] (33%)	LT216	ATPase a subunit [L. japonicus] (94%)
LT39	Vegetative storage protein [G. max] (96%)	LT222	Cytochrome P450 CYP93D1 [G. max] (64%)
LT50	Retrovirus-like element Calypso2-1 [G. max] (87%)	LT248	RNA helicase, putative [A. thaliana] (73%)
LT66	Cold stress protein SRC1 [G. max] (85%)	LT253	Nodulin-like protein [A. thaliana] (56%)
LT60	Putative transposase [Oriza sativa] (45%)	LT258	Glycolate oxidase [L. esculentum] (88%)
LT98	Putative ABC transporter [A. thaliana] (81%)	LT375	Nonsymbiotic hemoglobin [G. max]
LT100	eEF-1a [G. max] (97%)	LT383	Putative MYB family transcription factor [A. thaliana] (51%)
LT110	Acetyl CoA beta-carboxyltransferase subunit [G. max] (97%)	LT410	Granule-bound starch synthase [P. frutescens] (82%)
LT114	Metalloproteinase [G. max] (36%)	LT479	Fructose-bisphosphatase [P. sativum] (98%)
LT121	Retroelement pol polyprotein-like [A. thaliana] (82%)	LT629	Cold stress protein Peaci11.8 [P. sativum] (74%)
LT171	Rubisco activase [M. domestica] (91%)	LT667	Nodulin-26 [G. max] (93%)
LT182	l-asparaginase [A. thaliana] (91%)	LT698	60S ribosomal protein L37 (80%)
LT199	Phloem specific protein [V. faba] (36%)	LT731	Translation elongation factor EF-G [G. max] (99%)
LT211	p80 TNF-alpha receptor [M. musculus] (44%)		

표 3. 종자발달단계 초기에 발현되는 유전자

Clony#	Homology(% identity)	Clony#	Homology(% identity)
GR1	Sali3-2 protein, aluminium - induced [soybean] (98%)	GR82	Dormancy related protein, putative [Arabidopsis thaliana] (67%)
GR29	Glycinin chain A7 [soybean] (100%)	GR13	Bd 30K [Glycine max] (100%)
GR31	7S seed globulin precursor [Glycine max] (100%)	GR20	phosphatidylethanolamine-binding domain-containing unknown protein [Arabidopsis thaliana] (63%)
GR44	Lipoxygenase-1 [Glycine max] (100%)	GR39	hypothetical protein CP0987 [Chlamydomophila pneumoniae] (50%)
GR50	Proline-rich-like protein [Asparagus officinalis] (66%)	GR40	26s rRNA



**Figure 1.** Full-length cDNAs of GmCHI, GmDFR, GmANS, and GmANR, which are cloned in pGEM-Teasy vector. M, size marker; lane 1, GmCHI; lane 2, GmDFR; lane 3, GmANS; lane 4, GmANR

```
>gi|5921724|sp|Q43056|CFI_PUELO Chalcone--flavanone isomerase (Chalcone isomerase)
gi|944815|dbj|BAA09795.1| chalcone flavanone isomerase [Pueraria montana var. lobata]
Length = 224
```

```
Score = 362 bits (928), Expect = 4e-99
Identities = 187/218 (85%), Positives = 193/218 (88%)
Frame = +1
```

```
Query: 13 MATISAVQVEFLEFPVAVTSPASGKTYFLGGAGERGLTIEGKFIKFTGIGVYLEDKAVPS 192
+ATISAVQVEFLEFPVAVTSPASG+TYFLGGAGERGLTIEGKFIKFTGIGVYLEDKAV S
Sbjct: 7 VATISAVQVEFLEFPVAVTSPASGRTYFLGGAGERGLTIEGKFIKFTGIGVYLEDKAVSS 66
```

```
Query: 193 LAAKWKGKTSEELVHTLHFYRDIISGPFEKLIRGSKILPLAGAEYSKKTENCVAHMKSV 372
LAAKWKGK SEELV TL FYRDIISGPFEKLIRGSKILPL+G EYSKKV ENCVAHMKSV
Sbjct: 67 LAAKWKGPSEELVETLDFYRDIISGPFEKLIRGSKILPLSGVEYSKVMENCVAHMKSV 126
```

```
Query: 373 GTYGDXXXXXXXXXXXXXXXXXNVNFAPGASVFCRQSPDGI LGLSFSEDAT IPEKEAAV IENK 552
GTYGD NVNF PGA+VF RQSPDG+LGLSFSED TIP+ EAAV IENK
Sbjct: 127 GTYGDAAAAIEKFAEAFKNVNFQPGATV FYRQSPDGV LGLSFSEDVT I PONEAAV IENK 186
```



Query: 553 AVSAAVLETMI GEHAVSPDLKRSLASRLPAVLSPGIIV 666  
AVSAAVLETMI GEHAVSPDLKRSLASRLPAVLS GIIV  
Sbjct: 187 AVSAAVLETMI GEHAVSPDLKRSLASRLPAVLSHGIIV 224

**Figure 2.** Blastp search result of GmCHI, chalcone ismerase gene.

```

10      20      30      40      50      60      70      80
TTAAATAGAAAAGAGGAGTTTGAAGATGGCAACGATCAGCGCGGTTGAGGTGGAGTTCCTGGAGTTCCAGCGGTGGTTA
      M A T I S A V Q V E F L E F P A V V
90      100     110     120     130     140     150     160
CTTACCAGCCTCCGGCAAGACCTATTTCCCTCGGCGGCGCAGGGGAGAGAGGATTGACGATTGAGGGGAAGTTTCATAAAG
T S P A S G K T Y F L G G A G E R G L T I E G K F I K
170     180     190     200     210     220     230     240
TTCACAGGCATAGGAGTATACTTGGAGGATAAGGCGGTGCCATCACTCGCCGTAAGTGGAAAGGTA AAACTTCAGAGGA
F T G I G V Y L E D K A V P S L A A K W K G K T S E E
250     260     270     280     290     300     310     320
GTTAGTTCACACCTCCACTTCTACAGGATATCATTTGAGGCGGTTTGAAAAGCTAATTAGAGGGTCGAAGATTCTGC
L V H T L H F Y R D I I S G P F E K L I R G S K I L
330     340     350     360     370     380     390     400
CATTGGCTGGCGTGAATACTCAAAGAAGGTGACGGAAAAGTGCCTGGCACACATGAAGTCTGTTGGGACTTACGGTGTG
P L A G A E Y S K K V T E N C V A H M K S V G T Y G D
410     420     430     440     450     460     470     480
GCTGAAGCCGCGACGCATTGAAAAGTTTGCTGAAGCCTTCAAGAATGTGAATTTGCACCAGGTGCCTCTGTTTTCTGCAG
A E A A A I E K F A E A F K N V N F A P G A S V F C R
490     500     510     520     530     540     550     560
ACAATCACCTGATGGAATCTTGGGGCTTAGTTTCTCTGAAGATGCAACAATACCAGAAAAGGAGGCTGCAGTGATAGAGA
Q S P D G I L G L S F S E D A T I P E K E A A V I E
570     580     590     600     610     620     630     640
ACAAGGCTGTATCAGCGCGGCTTGGAGACCATGATTGGTGAACATGCTGTTCCCTGACTTAAACGCAGTTTGGCT
N K A V S A A V L E T M I G E H A V S P D L K R S L A
650     660     670     680     690     700     710     720
TCTCGATTGCTGCGGTATTGAGCCCCGGCATTATAGTCTGAGAAATGAGAAGGATCAACTTTACCTTTTCAAATATTC
S R L P A V L S P G I I V -
730     740     750     760     770
TTGTTTTTCTCCTTTCTTCTTGTGCGCTTGTGATGATTTCTACTGTTTAAATCAC

```

**Figure 3.** The nucleotide and the derived amino acid sequence of GmCHI.

```

>gi|31324464|gb|AAF23884.2|AF117263_1 dihydroflavanol reductase 3 [Lotus corniculatus]
Length = 336

Score = 289 bits (740), Expect = 2e-77
Identities = 137/156 (87%), Positives = 146/156 (93%)
Frame = -2

Query: 645 WKFAKEQGLDFITIIIPPLVVGPFLLMPTMPPSLITALSPITGNEHYSIIKQGQFVHLLDL 466
      WKFAKE G+DFITIIIPPLVVG FLMPTMPPSLITALSPITGNE HYSIIKQGQ+VHLLDL
Sbjct: 175 WKFAKEHGIDFITIIIPPLVGSFLMPTMPPSLITALSPITGNEAHYSIIKQGQYVHLLDL 234

Query: 465 CLAHIFLFEPEVEVEGRYICSA CDATIHDI AKLINQKYPEYKVP TKFKNIPDQLL VRFSS 286
      CLAHIFLFE PE EGRYICSA +ATIHDI AKLIN KYPEY +PTKFKNIPD+LLEL VRFSS
Sbjct: 235 CLAHIFLFEHPESEGRYICSA SEATIHDI AKLIN SKYPEYN IPTKFKNIPDELEL VRFSS 294

Query: 285 KKIITDLGFKFKYSLEDMYTGAIDTCRDKGLLPKPAE 178
      KKI D+GF+FKYSLEDMYTGAIDTC+KGLLPK AE
Sbjct: 295 KKI KDMGF EFKYSLEDMYTGAIDTC KEKGLLPKAAE 330

```

**Figure 4.** Blastx search result of GmDFR, dihydroflavanol reductase.

```

10      20      30      40      50      60      70      80
CTAGCTAAAAAATGGGTTTCAGCATCCGAAAGTGTTCGCGTTACAGGAGCTTCTGGTTTCATCGGGTCATGGCTTGTCA
M G S A S E S V C V T G A S G F I G S W L V

90      100     110     120     130     140     150     160
TGAGACTCATCGAGCGTGGCTACACCGTTCGAGCCACCGTACGCGACCCAGTAAACATGAAGAAGGTGAAGCATTGGTG
M R L I E R G Y T V R A T V R D P V N M K K V K H L V

170     180     190     200     210     220     230     240
GAACTACCAGGCGCAAAGAGCAAACGTGTCTGTGGAAGGCTGATCTTGCTGAAGAGGGAAGCTTTGATGAAGCCATTAA
E L P G A K S K L S L W K A D L A E E G S F D E A I K

250     260     270     280     290     300     310     320
AGGCTGCACCGGAGTTTTCCACGTGGCCACCCCATGGACTTTGAATCCAAGACCCGTGAGAATGAAGTGATAAAGCCTA
G C T G V F H V A T P M D F E S K D P E N E V I K P

330     340     350     360     370     380     390     400
CAATAAATGGGGTACTAGACATCATGAAAGCATGCTTGAAGGCAAAACGTGCGAAGGCTAATATTCAGCTCCTCAGCC
T I N G V L D I M K A C L K A K T V R R L I F T S S A

410     420     430     440     450     460     470     480
GGAACCTCAACGTTATTTGAGGCGCAAAGCCCGTTTTTCGACGACACATGCTGGAGTGACGTTGAGTTTTGCCGTAGAGT
G T L N V I E R Q K P V F D D T C W S D V E F C R R V

490     500     510     520     530     540     550     560
TAAGTAGCTGGTGGATGATTTGTTCTAAAACACTGGCGGAGAAAGCATGGAATTTGCCAAAGAGCAGGGCC
K M T G W M Y F V S K T L A E K E A W K F A K E Q G

570     580     590     600     610     620     630     640
TGGACTTCATCACTATCATCCACCTCTTGTTCGCGTCCCTTCTGATGCCAACCATGCCACCTAGCCATACACGGCT
L D F I T I I P P L V V G P F L M P T M P P S L I T A

650     660     670     680     690     700     710     720
CTATCGCCAATCACAGGAAATGAGGACCATTACTCGATCATAAAGCAAGGTCAATTGTCGCCACTAGATGATCTCTGTCT
L S P I T G N E D H Y S I I K Q G Q F V H L D D L C L

730     740     750     760     770     780     790     800
TGCTCACATATTTCTGTTTGAAGAACCCAGAAGTGAAGGGGAGGTACATATGCAGTGCATGTGACGCTACCATTGATGACA
A H I F L F E E P E V E G R Y I C S A C D A T I H D

810     820     830     840     850     860     870     880
TTGCCAAATTAATTAACCAAAAATACCCGTGAGTACAAGTCCCCACCAAGTTCAGAATATTCAGATCAATTGGAGCTT
I A K L I N Q K Y P E Y K V P T K F K N I P D Q L E L

890     900     910     920     930     940     950     960
GTGAGATTTTCTTCCAAGAAGATCACAGACTTGGGATTCAAAATTTAAATACAGCTTAGAGGACATGTACACTGGAGCAAT
V R F S S K K I T D L G F K F K Y S L E D M Y T G A I

970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040
TGACACATGCAGAGACAAAGGGCTTCTTCCGAAACCTGCAGAAAAGGGCTTTTACTAAACCTGCAGAAAACCTCAGTGA
D T C R D K G L L P K P A E K G L F T K P A E T P V

1050    1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
ATGCCATCATGCATAAATAGGCATTCATATCTTTGTATCTGTGTGATGGCTGTGCAACTTGCTTTTCTTATTCGGTTTCT
N A I M H K -

1130    1140    1150    1160    1170    1180
TGATTAACGTTTCTGTTTTATGAAAAATTAGAAATGTGAGTGGCTTGTAAAGCCAGGTTAG

```

**Figure 5.** The nucleotide and the derived amino acid sequence of GmDFR, dihydroflavonol reductase.

```

>gi|22266677|dbj|BAC07545.1| leucoanthocyanidin dioxygenase [Vitis labrusca x Vitis vinifera] Length = 355
Score = 231 bits (590), Expect = 1e-60
Identities = 112/140 (80%), Positives = 123/140 (87%), Gaps = 1/140 (0%)
Frame = +3
Query: 3 EELKSI GNVFEEKK--EGLQVPTIDLREIDSEDEVVRGKCRELKKAAEEWGMHLVNHG 179
EEL S I GNVFEEKK EG QVPTIDL++I+SEDEVVR +CRE+LKKAA EWGMHLVNHG
Sbjct: 29 EELTSI GNVFEEKKDEGPQVPTIDLKDI ESEDEVVRERCREELKKAAMEWGMHLVNHG 88
Query: 180 IPDELI ERVKKAGETFFGLAVEEKEKYANDLESKIQGYGSLANNASGQLEWEDYFFHL 359
I D+LI RVK AGETFF L +EEKEKYAND SGK I GYGS LANNASGQLEWEDYFFHL
Sbjct: 89 ISSDLINRVKVAGETFFNLPMEEKEKYANDQASGKIAGYGSKLANNASGQLEWEDYFFHL 148
Query: 360 AFPEDKROLSFWPKPADYI 419
FPEDKRD++ WPK P+DY+
Sbjct: 149 IFPEDKROMTIWPKTPSYDV 168

```

**Figure 6.** Blastx search result of GmANS partial cDNA sequence.

```

>gi|27966032|gb|AA77735.1| anthocyanidin reductase [Medicago truncatula]
Length = 338
Score = 310 bits (795), Expect = 8e-84
Identities = 151/179 (84%), Positives = 163/179 (91%)
Frame = -3
Query: 646 EYLSTAKPPTWGY PASKALAEKAAWKFAEENHIDLITV IPTLTGPSVTTDIPSSVGMMA 467
E+L+TAKPPTWGY P SK LAEKAANKFAEEN+IDLITV IPTLT GPS+T DIPSSV M
Sbjct: 158 EFLNTAKPPTWGY PVSKVLAEKAANKFAEENIDLITV IPTLTIGPSLTQDIPSSVAMGM 217
Query: 466 SLITGNDFLINALKGMQLLSGSI SITHVEDICRAQIFVAEKESASGRYICCAHNTSVPEL 287
SL+TGNDFLINALKGMQ LSGSISITHVEDICRA IFVAEKES SGRYICCAHNTSVPEL
Sbjct: 218 SLLTGNDFLINALKGMQFLSGSISITHVEDICRAHIFVAEKESTSGRYICCAHNTSVPEL 277
Query: 286 AKLLSKRYPQYKIPTEFDDCPSKAKL IISSEKLVKEGFSFKYGI EEIYDQTLEYLKS KG 110
AK LSKRYPQYK+PTEFDD PSKAKL I ISS KL+KEGFSFK+ I E +DQT+EYLK++G
Sbjct: 278 AKFLSKRYPQYKVPTEFDDFPSKAKL IISSGKLIKEGFSFKHSIAETFDQTVEYLK TQG 336

```

**Figure 7.** Blastx search result of GmANR partial cDNA sequence.

## 2. 형질전환용 벡터 제작

안토시아닌 함량증진을 위해서는 종자특이적인 발현을 유도할 수 있는 형질전환용 벡터 시스템이 필요하다. 본 연구에서는 널리 쓰이는 CAMV 35S 프로모터 대신 seed-specific expression을 보이는 beta-conglycinin의 프로모터를 이용하였다. pCAMBIA1301 vector에 beta-conglycinin 프로모터 (P<sub>BCP</sub>)를 삽입하여 형질전환용 벡터 시스템을 확립하였다. 안토시아닌 관련 유전자로서 Chalcone isomerase를 암호화하고 있는 CHI-A 유전자를 페투니아 게노믹 DNA로부터 PCR 증폭하여 형질전환용 벡터에 삽입하였다. 안토시아닌 합성관련 transcription factor인 옥수수 B-Peru 유전자 역시 pSK111 플라스미드로부터 절단하여 형질전환용 벡터에 삽입하였다.

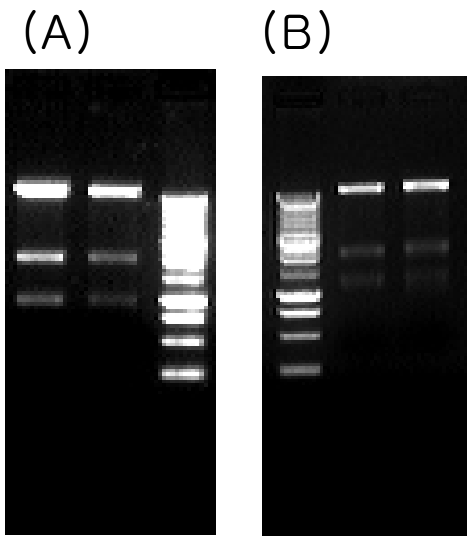


그림 8 . B-Peru 유전자가 삽입된 pCPC-B plasmid의 Restriction pattern. (A) EcoRI digestion (B) PstI digestion

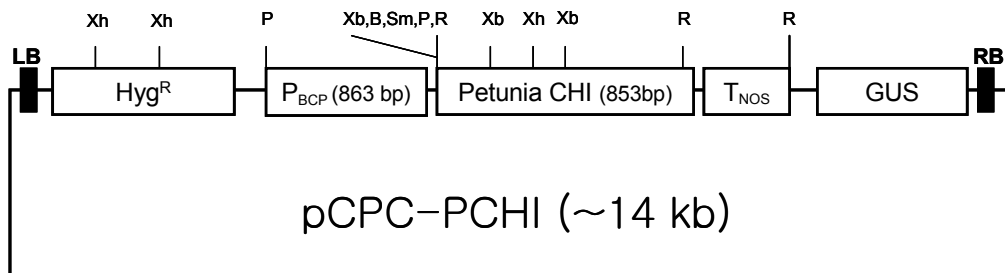


그림9 . 페투니아 CHI-A 유전자를 삽입한 콩 형질전환용 벡터 pCPC-PCHI.

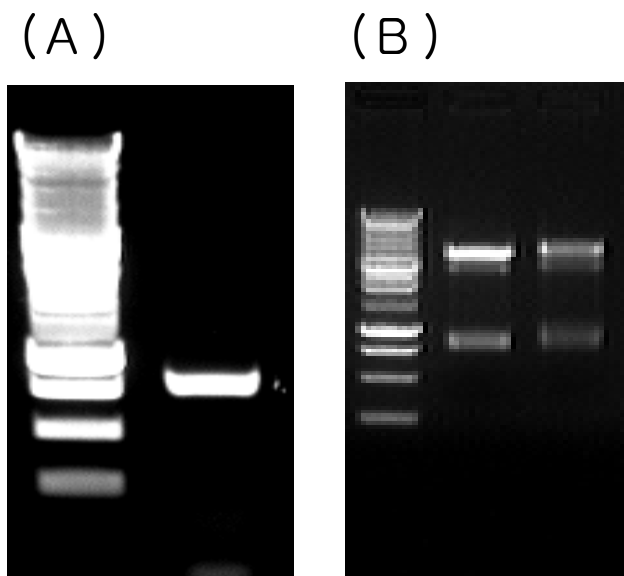


그림10 . 페투니아 CHI-A 유전자 클로닝. (A) 페투니아 genomic DNA로부터의 PCR 증폭 (850 bp band) (B) 벡터에 클로닝된 CHI-A 유전자

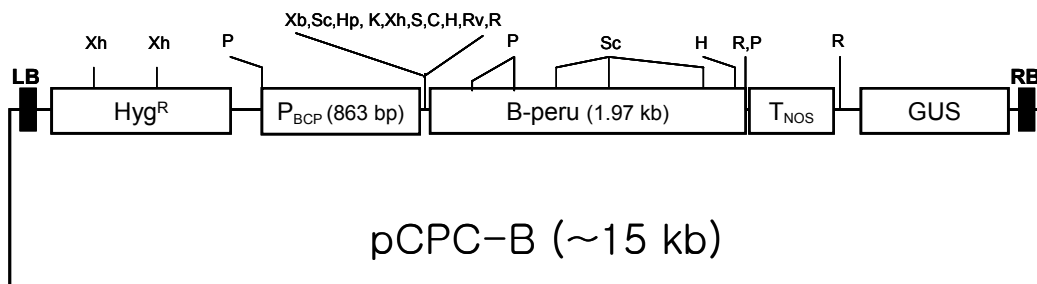


그림11 . B-peru 유전자를 삽입한 콩 형질전환용 벡터 pCPC-B.

# 세부과제명 : 검정콩 형질전환 기술개발

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 목적

형질전환에 순응적인 검정콩의 높은 빈도의 형질전환체계를 확립할 경우, 본 작물 유전체 기능 사업을 통하여 농업적, 산업적으로 유용한 유전자가 발굴되었을 때, 이들 유전자들을 형질전환하여 농업적, 산업적으로 유용한 고부가가치의 식물과 작물을 생산하여, 국내 콩과 관련된 농업계와 산업에 상당한 파급효과를 미칠 것으로 예상된다.

본 연구과제의 최종 개발목표는 현재 국내에서 사용하고 있는 콩 형질전환기술이 대부분이 외국에서 개발되어 특허기술로 보호되고 있다는 점을 고려해 새로운 콩 형질전환기술개발을 발굴하는데 있다. 향후 3년 간, 검정콩에 대한 형질전환체계를 확립하며, 기존의 방법과 다른 콩 형질전환 신기술개발을 모색하고자 한다.

### 제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

#### 1. 연구개발 필요성

- 지놈 프로젝트와 같은 유전체 연구의 활성화로 인해 많은 유전자의 염기서열이 밝혀지고 유전자 은행 등과 같은 데이터 베이스에 다량의 유전자가 빠른 속도로 축적되고 있다.

- 이들 유전자중에 특정작물에 도입될 경우, 중요한 농업 및 산업적 고부가 가치 형질을 추가시켜 품종의 가치를 크게 증가시킬 가능성을 가진 유전자들이 점점 많아지는 추세이다.

- 그러나, 국내 농업에 매우 중요한 위치를 차지하는 특정 작물 중에, 형질 전환의 효율이 매우 낮아, 형질전환을 통한 유전자의 도입이 매우 어려운 작물이 많은 것이 현실임. 벼, 고추, 콩 중에서도 벼를 제외하고는 형질전환이 잘 안되고 있는 실정이다.

- 특히 콩의 경우, 외국의 경우는 제초제 저항성과 내 바이러스, 내충성 유전자를 포함한 형질전환체가 생산되어 품종화 되었으나, 아직도 매우 낮은 형질전환효율 때문에 많은 유전자의 도입에 어려움을 겪고 있고, 최근에도 고효율의 형질전환기술을 개발하기 위한 연구가 미국과 캐나다등에서 계속 수행되고 논문이 보고되고 있다.(Plant Cell reports 2000, 19:485-490; Plant Cell reports 2000, 19:1090-1097; Plant Cell reports 2000, 19:478-484)

- 국내에서는 농촌진흥청 산하 농업과학기술원과 호남시험장, 그리고 동아대학교 본인의 실험실에서 각각 자엽과 캘러스를 이용한 형질전환을 수행하고 있으며, 서울대학교 최 양도 교수시험실에서 한방침을 이용한 독특한 형질전환기술을 개발한 바 있으나, 어느 연구팀에 의해서도 공식적인 논문이나 결과가 아직 발표되지는 않은 상태이다.

- 따라서 본 연구과제에서는 이미 지난 1년간 국내 콩 품종을 대상으로 형질전환실험을 수행한 결과를 기초로 연구내용을 확충 및 보강하여 현재 국내에서 사용하고 있는 콩 형질전환 기술이 대부분이 외국에서 개발되어 특허기술로 보호되고 있다는 점을 고려해 새로운 콩 형질전환기술개발을 모색하고자 수행되었다.



## 2. 연구개발 범위

본 연구의 성공적 연구결과의 확보를 위하여 수행된 연구개발의 범위는 아래의 표와 같다.

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	예상 결과물
1차년도 (2001)	▶ 새로운 고효율 콩 형질 전환 기초 기술 개발	- 새로운 콩 형질전환 기초기술 개발; 전처리기술을 이용한 효율 증대	- 고효율형질 전환기초기술
2차년도 (2002)	▶ 새로운 고효율 콩 형질 전환 기술 개발 ▶ 형질전환체 분석	- 새로운 고효율 콩 형질전환 기초 기술 개발; 전처리기술을 이용한 효율 증대 (5%이상) - 형질전환체 분석 및 후대 검정 - 형태적, 생리적, 생화학적 변이 관찰	- 고효율 형질 전환기술개발 (5%) - 형질전환체(50계통 이상) - 논문발표
3차년도 (2003)	▶ 새로운 고효율 콩 형질 전환 기술 개발 ▶ 형질전환효율 비교 분석	- 새로운 고효율 콩 형질전환 기초 기술 개발; 전처리기술을 이용한 효율 증대(5%이상) - 형질전환체 분석 및 후대 검정 - 형태적, 생리적, 생화학적 변이 관찰	- 고효율 형질 전환기술개발 (5%) - 논문발표 및 특허등록

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

콩 형질전환체 생산의 연구는 외국의 경우 연구가 매우 활성화되어 이미 유전자 조작

에 의해 생산된 형질전환 콩 품종이 시장에 나와 있는 실정이다. 일찍이 Monsanto에

의해 만들어진 제초제 저항성과 내 바이러스, 내충성 유전자를 포함한 형질전환체가

생산되어 품종화 되었고, Dupont사 에 의해서는 이소플라본이 증가된 콩이 생산되어

보고 되기도 하였다. 형질전환방법에 대한 연구도 많은 대학과 연구소에서 수행되어 새롭고 고효율의 형질전환방법의 확립이 모색되고 있다. 이미 생산된 형질전환 콩들의 경우 거의가 미성숙배를 이용하여 체세포배를 만든 후, 유전자총을 이용하여 형질전환을 하고 재분화하여 만든 것에 반하여 현재 많은 미국의 대학들은 아그로박테리움을 이용하여 성체종자의 cotyledonary node에 직접 형질전환하는 방법을 많이 사용하고 있다. 이와 같은 방법으로 직접 생산된 콩품종은 아직 보고 되지 않았으나, 이 방법의 효율성 때문에 많은 연구 논문이 발표되고 있다. 예를 들면 유전자총을 이용한 형질전환의 경우, 유전자의 multiple copy 도입에 의한 gene silencing 이 크게 문제되는데, 아그로박테리움을 이용하여 형질전환을 할 경우, 대부분 유전자가 1-2개만 세포 안으로 도입이 되기 때문에 이와 같은 문제를 쉽게 해결할 수 있다. 이러한 이유로 본 과제에서도 유전자의

안정적인 도입을 위하여 cotyledonary node에 직접 형질전환하는 방법을 선택하여 사용하였다. 현재 국내에서는 몇 개의 실험실에서 콩형질전환을 수행하고 있다. 농촌진흥청에서는 농업생명공학연구원과 작물시험장 생명공학과, 그리고 호남농업연구소에서 콩형질전환을 수행하였거나 현재 수행하고 있다. 대학에서는 본 연구과제가 수행되고 있는 동아대와 서울대에서 수행하고 있고 기업 중에서는 대전의 유진텍에서 콩형질전환 연구를 수행하고 있다. 그러나 현재 어느 연구진에서도 성공적이고 안정적인 형질전환 성공사례를 발표하지 못하였고 논문이 발표된 경우도 없는 실정이다. 본 연구에서는 지난 3년간 한국 콩 품종을 가지고 형질전환 순응형 스크린을 하였으며 그 결과 높은 재분화 효율과 아그로박테리움의 감염에 순응적인 품종을 찾아낼 수 있었다. 이들 품종을 재료로 하여 초기 형질전환의 효율을 높이기 위한 전처리 조건의 확립과 최적의 선발조건을 확립하였다. 이제까지의 연구결과 초기형질전환의 효율을 10% 후반대로 끌어올리는데 성공하였으며 연구결과 확보된 형질전환 shoot를 이용하여 현재 rooting과 종자확보를 위한 실험을 수행하고 있다. 현재의 실험목표는 올해 안에 형질전환체 들로부터 종자를 확보하고 유전자의 도입을 확인하는데 있다.

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 hygromycin농도가 형질전환체 선발 및 재분화에 미치는 영향

#### 1. 목적

새로운 고효율의 형질전환기술개발을 위한 다양한 처리조건 확립을 위하여 선발과정 중, 효율적인 선발과 높은 형질전환 빈도를 주는 hygromycin의 적정 농도를 규명하는데 실험목적이 있다.

#### 2. 재료

이 실험을 위하여 검정콩2호, 일품검정콩 떡잎을 재료로 형질전환을 수행하였다.

#### 3. 방법

##### 가) 파종

종자는 70% ethanol에 30초간 담귀 1차 표면살균을 하고 1% sodium hypochloride에 30분간 shaking 하면서 소독한 후, 10분 간격으로 멸균수로 3회 수세하였다. Petri-dish에 파종 후 24℃ 배양실에서 16시간 광조건과 8시간 암조건으로 5일간 발아시켰다.

##### 나) *Agrobacterium* preparation

콩의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 supervector pTOK233을 가지고 있는 LBA4404를 사용하였다. *Agrobacterium*은 형질전환 3일 전 hygromycin 50mg/ℓ 이 포함된 고체 YEP 배지(yeast 5g/ℓ, pepton 5g/ℓ, NaCl 2.5g/ℓ, pH 7.0)에 streaking 한 후, 28℃ incubator에서 3일간 배양하였다.

다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

공배양 배지로는 100 $\mu$ M의 acetosyringone이 포함된 AAM 배지{AAM salts and amino acids(Toriyama and Hinata, 1985), MS vitamins(Murashigs and Skoog, 1962), casamino acid 0.5g/ $\ell$ , sucrose 68.5g/ $\ell$ , glucose 36g/ $\ell$ , pH 5.2}를 사용하였다. 형질전환 당일 왕성히 자란 *Agrobacterium*을 50ml 코닝튜브에 AAM 액체배지를 30ml 채운 후 spetula를 이용하여 OD값 0.5정도의 혼탁액이 되도록 풀어 넣었다. 발아한 식물체의 hypocotyl을 떡잎 밑 약 1cm되는 곳에서 자른 후 양 떡잎 사이로 메스를 넣어 하배측까지 수직으로 자르고 새로 나온 본엽을 제거하였다. 떡잎 기부에서 위로 약 0.5cm와 아래 하배측쪽으로 약 0.1cm 이내의 부위를 scalpel을 이용하여 7-12회 반복하여 상처 내었다. *Agrobacterium*을 희석시킨 AAM 배지에 상처를 낸 떡잎을 20분간 접촉시킨 후 flat side를 배지쪽으로 치상하여 3일 간 24 $^{\circ}$ C에서 암배양시켰다.

라) Wash-out and shoot induction

3일간 공배양 후 *Agrobacterium*의 제균을 위하여 멸균수로 2회 세척한 후 500mg/ $\ell$ 의 cefotaxime과 0.05%의 Triton X-100이 포함된 멸균수로 5회 세척하였다. 30ml의 세척 용액을 넣은 50ml 코닝 튜브에 떡잎을 넣었으며, mini 3D-shaker를 이용하여 매회 20분간 상하로 shaking 하였다. 5회 세척된 떡잎은 SI(shoot induction; B5 salt 3.16g/ $\ell$ , BAP 1.67mg/ $\ell$ , sucrose 3%, Agar 0.6%)-①(cefotaxime 500mg/ $\ell$ , hygromycin 30mg/ $\ell$ ) 배지에 치상하여 24 $^{\circ}$ C 배양실에서 신초발생을 관찰하였다. 그후 2주 간격으로 SI-②(cefotaxime 200mg/ $\ell$ , hygromycin 10mg/ $\ell$ ), SI-③(cefotaxime 100mg/ $\ell$ , hygromycine 10mg/ $\ell$ )로 옮겨 치상하면서 관찰하였다.

마) GUS expression assay

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronide (X-Gluc)를 150 $\mu$ l dimethyl formamide에 녹인 후, 850 $\mu$ l의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. SI 배지 치상 후 0.5cm 크기로 자란 shoot 및 callus는 절단하여 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37 $^{\circ}$ C incubator에서 overnight 처리하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

#### 4. 결과

제균 항생제 Cefotaxime과 Timentin이 각각 첨가된 SI배지 비교 실험에서는 Timentin 첨가배지에서 백화현상을 보였으며, Cefotaxime이 첨가된 배지에서는 별다른 해가 나타나지 않았다. 이와 관련하여 Timentin이 첨가된 배지에서 Shoot 및 Callus 발생율(0~9%)이 현저히 낮았으며, Cefotaxime이 첨가된 배지에서의 Shoot 및 Callus 발생율(0~18%)이 높았다. Cefotaxime 첨가 SI 배지의 hygromycin 첨가 농도별 비교 실험에서 hygromycin 첨가 농도에 따른 Shoot 발생은 검정콩2호에서는 hygromycin 농도가 낮을수록 양호하였고 일품검정콩은 농도에 관계없이 shoot가 발생하였다. Callus 발생율은 hygromycin 10ppm의 저농도에서 10~18%로 높았다. 발생한 대부분의 Shoot 및 Callus에서 GUS positive를 관찰할 수 있었는데, 고농도의 하이그로마이신에서 비교적 높은 GUS positive를 나타내었다. Timentin을 이용한 실험은 제균 후에 극심한 백화현상을 보여 실험을 중간에 중단하였다.

표 1. 제균항생제 비교 및 적정 hygromycin 선발 농도의 비교

		Cefotaxime				Timentin			
		Shoot(%)		Callus(%)		Shoot(%)		Callus(%)	
		Shoot 발생율	GUS positive	Callus 발생율	GUS positive	Shoot 발생율	GUS positive	Callus 발생율	GUS positive
검 정 콩2 호	hygro. 30	0/146 (0%)	0/146 (0%)	1/146 (1%)	0/146 (0%)	0/33 (0%)	0/33 (0%)	2/33 (6%)	0/33 (0%)
	hygro. 15	1/137 (1%)	1/137 (1%)	9/137 (7%)	8/137 (6%)	1/33 (3%)	0/33 (0%)	0/33 (0%)	0/33 (0%)
	hygro. 10	3/124 (2%)	3/124 (2%)	16/124 (13%)	14/124 (11%)	3/32 (9%)	1/32 (3%)	1/32 (3%)	1/32 (3%)
일 품 검 정 콩	hygro. 30	3/58 (5%)	3/58 (5%)	1/58 (2%)	1/58 (2%)	0/29 (0%)	0/29 (0%)	1/29 (3%)	1/29 (3%)
	hygro. 15	4/68 (6%)	3/68 (4%)	0/68 (0%)	0/68 (0%)	0/29 (0%)	0/29 (0%)	0/29 (0%)	0/29 (0%)
	hygro. 10	3/71 (4%)	2/71 (3%)	13/71 (18%)	7/71 (10%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)	0/30 (0%)

(그림) 형질전환 후 shoot 발생



(그림) 제균항생제 비교 실험



<검정콩2호>



<일품검정콩>

각그림 좌: cefotaxime 포함배지, 우 timentin 포함배지

(그림) 형질전환 후 callus 발생( hygromycin 10mg/L 첨가 배지)



<일품검정콩>



<검정콩2호>



## 제 2 절 Agar 농도, 치상방향, 상처방법이 형질전환체 선발효율에 미치는 영향

### 1. 목적

새로운 고효율의 형질전환기술개발을 위한 다양한 처리조건 확립을 위하여 solidifying agent인 agar의 농도와 치상 방향, 상처방법이 선발효율과 형질전환 빈도에 미치는 영향을 규명하는데 실험의 목적이 있다.

### 2. 재료

본 실험을 위하여 검정콩2호, 일품검정콩을 형질전환재료로 사용하였다.

### 3. 방법

#### 가) 파종

종자는 70% ethanol에 30초간 담귀 1차 표면살균을 하고 1% sodium hypochloride에 30분간 shaking 하면서 소독한 후, 10분 간격으로 멸균수로 3회 수세하였다. Petri-dish에 파종 후 24℃ 배양실에서 16시간 광조건과 8시간 암조건으로 5일간 발아시켰다.

#### 나) *Agrobacterium* preparation

콩의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 supervector pTOK233을 가지고 있는 LBA4404를 사용하였다. *Agrobacterium*은 형질전환 3일 전 hygromycin 50mg/ℓ 이 포함된 고체 YEP 배지(yeast 5g/ℓ, pepton 5g/ℓ, NaCl 2.5g/ℓ, pH 7.0)에 streaking 한 후, 28℃ incubator에서 3일간 배양하였다.

#### 다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

공배양 배지로는 100μM의 acetosyringone이 포함된 AAM 배지(AAM salts and amino acids(Toriyama and Hinata, 1985), MS

vitamins(Murashigs and Skoog, 1962), casamino acid 0.5g/ℓ, sucrose 68.5g/ℓ, glucose 36g/ℓ, pH 5.2}를 사용하였다. 형질전환 당일 왕성히 자란 *Agrobacterium*을 50ml 코닝튜브에 AAM 액체배지를 30ml 채운 후 spatula를 이용하여 OD값 0.5정도의 혼탁액이 되도록 풀어 넣었다. 발아한 식물체의 hypocotyl을 떡잎 밑 약 1cm되는 곳에서 자른 후 양 떡잎 사이로 메스를 넣어 하배측까지 수직으로 자르고 새로 나온 본엽을 제거하였다. 떡잎 기부에서 위로 약 0.5cm와 아래 하배측쪽으로 약 0.1cm 이내의 부위를 scalpel과 needle을 이용하여 7-12회 반복하여 상처 내었다. *Agrobacterium*을 희석시킨 AAM 배지에 상처를 낸 떡잎을 20분간 접종시킨 후 flat side를 up 또는 down으로 치상하여 3일 간 24℃에서 암배양시켰다.

#### 라) Wash-out and shoot induction

3일간 공배양 후 *Agrobacterium*의 제거를 위하여 멸균수로 2회 세척한 후 500mg/ℓ의 cefotaxime과 0.05%의 Triton X-100이 포함된 멸균수로 5회 세척하였다. 30ml의 세척 용액을 넣은 50ml 코닝 튜브에 떡잎을 넣었으며, mini 3D-shaker를 이용하여 매회 20분간 상하로 shaking 하였다. 5회 세척된 떡잎은 SI(shoot induction; B5 salt 3.16g/ℓ, BAP 1.67mg/ℓ, sucrose 3%, Agar 0.4, 0.6, 0.8%)-①(cefotaxime 500mg/ℓ, hygromycin 30mg/ℓ) 배지에 치상하여 24℃ 배양실에서 신초발생을 관찰하였다. 그후 2주 간격으로 SI-②(cefotaxime 200mg/ℓ, hygromycin 10mg/ℓ), SI-③(cefotaxime 100mg/ℓ, hygromycine 10mg/ℓ)로 옮겨 치상하면서 관찰하였다.

#### 마) GUS expression assay

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronie (X-Gluc)

을 150 $\mu$ l dimethyl formamide에 녹인 후, 850 $\mu$ l의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. SI 배지 치상 후 0.5cm 크기로 자란 shoot 및 callus는 절단하여 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37 $^{\circ}$ C incubator에서 overnight 처리 하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5 ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

#### 4. 결과

각기 다른 세 농도의 agar 배지에 따른 shoot 및 callus 발생은 0.4% 보다는 0.6, 0.8% 농도의 agar 배지에서 높았다. Shoot와 callus의 발생은 두 품종 모두 0.8% 농도의 agar 배지가 가장 효율적이었다. flat side up과 flat side down으로 나누어 SI 배지에 치상한 경우 flat side가 배지에 묻히도록 치상한 경우(down) 떡잎이 위로 향하도록 치상한 경우(up)보다 효율적이었다. 형질전환 효율을 올리기 위해 scalpel과 침(needle)의 비교 실험에서는 shoot 발생을에서는 침을 사용한 경우가 좋았고, callus 발생을에서는 scalpel을 사용한 경우가 높았다. Shoot에서의 GUS유전자의 발현율은 일품검정콩을 재료로 침을 사용하여 flat side를 down으로 치상하였을 때가 가장 높게 나타났고, 그 다음이 검정콩2호 를 침을 가지고 flat side를 down하여 치상하였을 때였다. Callus에서의 GUS유전자의 발현율은 일품검정콩을 재료로 침을 사용하여 flat side를 down으로 치상하였을 때, 0.6% agar농도 조건에서 가장 높게 나왔으나, 침을 사용하였을 때에는 그의 조건에서는 전혀 반응을 볼 수 없었고, 품종 간에도 차이를 보여, 검정콩2호에서는 2-3개의 조건을 제외하고는 반응을 전혀 보이지 않았다, 전반적으로는 일품검정콩을 재료로 flat side를 down하여 저농도의 agar 농도에 치상하였을 때 높게 나타났다.

표 1. Agar 농도별 shoot 및 callus 발생수

	0.4%		0.6%		0.8%		Total	
	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus
검정콩2호	0/269 (0.0%)	0/269 (0.0%)	7/608 (1.1%)	2/608 (0.3%)	40/742 (5.4%)	5/742 (0.6%)	47/1619 (2.9%)	7/1619 (0.4%)
일품검정콩	0/229 (0.0%)	4/229 (1.7%)	11/577 (1.9%)	16/577 (2.7%)	20/537 (3.7%)	5/537 (0.9%)	31/1343 (2.3%)	25/1343 (1.9%)
Total	0/498 (0.0%)	4/498 (0.8%)	18/1185 (1.5%)	18/1185 (1.5%)	60/1279 (4.7%)	10/1279 (0.7%)	78/2962 (2.6%)	32/2962 (1.0%)

표 2. flat side 치상방향 별 shoot 및 callus 발생수

	검정콩2호				일품검정콩				Total			
	up		down		up		down		up		down	
	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus
0.4%	0/187 (0%)	0/187 (0%)	0/82 (0%)	0/82 (0%)	0/156 (0%)	2/156 (1.3%)	0/83 (0.0%)	2/83 (2.4%)	0/343 (0.0%)	2/343 (0.5%)	0/165 (0.0%)	2/165 (1.2%)
0.6%	0/356 (0%)	0/356 (0%)	7/252 (2.8%)	2/252 (0.7%)	0/331 (0%)	0/331 (0.0%)	11/246 (4.5%)	16/246 (6.5%)	0/687 (0.0%)	0/687 (0.0%)	18/498 (3.6%)	18/498 (3.6%)
0.8%	26/394 (6.6%)	0/394 (0%)	14/348 (4%)	5/348 (1.4%)	8/277 (2.9%)	0/277 (0.0%)	12/260 (4.6%)	5/260 (1.9%)	34/671 (5.1%)	0/671 (0.0%)	26/608 (4.3%)	10/608 (1.6%)
Total	26/937 (2.8%)	0/937 (0%)	21/682 (3.1%)	7/682 (1.0%)	8/764 (1.0%)	2/764 (0.3%)	23/589 (3.9%)	23/586 (3.9%)	34/1701 (2.0%)	2/1701 (0.1%)	44/1271 (3.5%)	30/1271 (2.4%)

표 3. 상처방법에 따른 shoot 및 callus 발생수

	검정콩2호				일품검정콩				Total			
	scalpel		needle		scalpel		needle		scalpel		needle	
	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus	shoot	callus
0.4%	0/215 (0.0%)	0/215 (0.0%)	0/54 (0.0%)	0/54 (0.0%)	0/177 (0.0%)	4/177 (2.3%)	0/52 (0.0%)	0/52 (0.0%)	0/392 (0.0%)	4/392 (1.0%)	0/106 (0.0%)	0/106 (0.0%)
0.6%	2/382 (0.5%)	2/382 (0.5%)	5/226 (2.2%)	0/226 (0.0%)	5/398 (1.3%)	9/398 (2.3%)	6/178 (3.4%)	7/178 (3.9%)	7/780 (0.9%)	11/780 (1.4%)	11/404 (2.7%)	7/404 (1.7%)
0.8%	19/420 (4.5%)	4/420 (0.9%)	21/322 (6.5%)	1/322 (0.3%)	5/348 (1.4%)	5/348 (1.4%)	15/205 (7.3%)	0/205 (0%)	24/768 (3.1%)	9/768 (1.1%)	36/527 (6.8%)	1/527 (0.2%)
Total	21/1017 (2.1%)	6/1017 (0.6%)	26/602 (4.3%)	1/602 (0.2%)	10/923 (1.1%)	18/923 (2.0%)	21/435 (4.8%)	7/435 (1.6%)	31/1940 (1.6%)	24/1940 (1.2%)	47/1037 (4.5%)	8/1037 (0.8%)

표4. Agar 농도, 치상방향, 상처방법이 shoot, callus, 형질전환효율에 미치는 영향

		scalpel								needle							
		up				down				up				down			
		shoot		callus		shoot		callus		shoot		callus		shoot		callus	
		shoot 발생율	GUS positive	callus 발생율	GUS positive	shoot 발생율	GUS positive	callus 발생율	GUS positive	shoot 발생율	GUS positive	callus 발생율	GUS positive	shoot 발생율	GUS positive	callus 발생율	GUS positive
검 정 콩 2 호	0.4%	0/170 (0%)	0/170 (0%)	0/170 (0%)	0/170 (0%)	0/55 (0%)	0/55 (0%)	0/55 (0%)	0/55 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	
	0.6%	0/243 (0%)	0/243 (0%)	0/243 (0%)	0/243 (0%)	2/139 (%)	2/139 (1%)	2/139 (1%)	2/139 (1%)	0/113 (0%)	0/113 (0%)	0/113 (0%)	0/113 (0%)	5/113 (4%)	5/113 (4%)	0/113 (0%)	
	0.8%	15/228 (6%)	1/228 (0%)	0/228 (0%)	0/228 (0%)	4/182 (2%)	2/182 (1%)	4/182 (2%)	2/182 (1%)	11/156 (7%)	3/156 (2%)	0/156 (0%)	0/156 (0%)	10/166 (6%)	1/166 (1%)	1/166 (1%)	
일 품 검 정 콩	0.4%	0/120 (0%)	0/120 (0%)	2/120 (2%)	2/120 (2%)	0/57 (0%)	0/57 (0%)	2/57 (4%)	2/57 (4%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)	
	0.6%	0/242 (0%)	0/242 (0%)	0/242 (0%)	0/242 (0%)	5/156 (3%)	5/156 (3%)	9/156 (6%)	7/156 (4%)	0/89 (0%)	0/89 (0%)	0/89 (0%)	0/89 (0%)	6/89 (7%)	6/89 (0%)	7/89 (8%)	
	0.8%	3/174 (2%)	3/174 (2%)	0/174 (0%)	0/174 (0%)	2/158 (1%)	2/158 (1%)	5/158 (3%)	0/158 (0%)	5/103 (5%)	3/103 (3%)	0/103 (0%)	0/103 (0%)	10/102 (10%)	10/102 (10%)	0/102 (0%)	

(그림) 치상방향에 따른 재분화 모습



<flat side down>



<flat side up>

(그림) flat side down 에서의 shoot 발생



## 제 3 절 유전자총을 이용한 콩 종자배축(embryonic axes) 형질전환

### 1. 목적

최근 외국에서 지속적인 기술개발로 고빈도의 형질전환효율을 주는 유전자총을 이용한 형질전환 기술개발이 이 실험의 주된 목표이다.

### 2. 재료

본 실험을 위하여 일품검정콩을 재료로 사용하였다.

### 3. 방법

#### 가) 파종 및 재료준비

종자살균은 앞 실험과 동일하게 준비되었다. 살균된 종자는 50ml falcon tube안에 sterile ddH<sub>2</sub>O에 soaking된 상태로 24시간 보관되었다. 24시간 soaking된 종자들은 clean bench에서 scalpel과 forcep을 사용하여 배축(embryonic axes; 0.5cm in length)이 절단되었고, 절단된 배축은 apical region이 위를 향하도록 MS고체배지에 치상되었다

#### 나) Bombardment preparation

두 개의 plasmid, pCAMBIA1301 과 sGFP DNA를 miniprep kit를 이용하여 추출하였다. 추출한 DNA는 5ug/5ul의 농도로 농축되어 gold particle을 coating하는데 사용되었다. 각각의 DNA를 50ul의 0.6um 크기의 gold particle이 들어있는 0.5ml microfuge tube에 넣은 후, 약 5분간 voltex를 하였다. 또 다른 microfuge tube에 50ul의 2.5M cacI<sub>2</sub> 와 20ul의 0.1M spermidine(base-free)을 넣어서 같은 시간동안 voltex를 하다가, 두



tube의 내용물을 mix하여 3-4분간 추가로 voltex를 하였다. 혼합된 시료는 10,000rpm에서 약 10초간 spin down한 후에 상등액을 제거하고, 250ul의 100% ethanol을 첨가하여 particle을 dissolve하였다. 다시 같은 조건으로 원심분리를 한 후에, 상등액을 제거하고, 100ul의 100% ethanol을 첨가하여 particle을 다시 dissolve하였다. 한번의 bombardment를 위하여 10ul의 coating된 particle용액을 macrocarrier에 drop하여 사용하였다.

#### 다) Microprojectile bombardment(PDS1000)

MS고체배지에 치상된 배축에 bombardment를 수행하였다. 준비된 10ul의 coating된 particle 용액을 macrocarrier에 drop하여 1회 bombardment에 사용하였다. Bombardment의 강도는 1350psi의 rupture disk를 이용하였고, 시료당 2회의 bombardment를 수행하였다. 배축은 chamber내 가장 위칸에 위치시켜 방사각의 최소화와 bombardment의 집중화를 유도하였다.

#### 라) Shoot induction

유전자총을 이용하여 bombardment된 배축들은 24시간동안 배양실에 방치한 후, 하이그로마리신 선발배지(MS배지, hyg 15ppm)에 치상하여 선발 및 재분화를 유도하였다.

#### 마) GUS 및 GFP expression assay

앞 실험과 동일하게 진행하였으며, bombardment 후, 72시간이 경과된 시료의 일부를 채취하여 도입유전자의 발현분석과 사진촬영을 하였다.

### 4. 결과

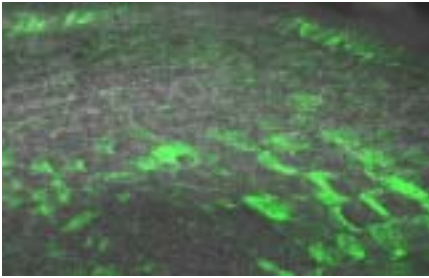
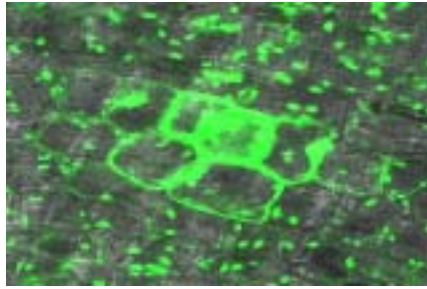
도입된 유전자의 발현관찰을 수행하였다. GUS 유전자 발현의 경우, staining 후에 실체현미경을 이용하여 관찰하였고, GFP유전자 발현 확인을

위하여서는 실체현미경과 confocal microscope를 이용하여 유전자의 도입과 형질전환빈도를 조사하였다(아래 그림 참조). 도입 유전자가 확인된 배축들은 재분화배지(MS배지, hyg 15ppm)에 치상하여 현재 식물 재분화를 유도하였으나 식물체를 얻지 못하였다.

(그림) 콩 배축 GUS 유전자 발현 확인



(그림) 콩 배축 GFP 유전자 발현 확인



(그림) 형질전환 후 재분화 배지 치상



## 제 4 절 호르몬 BA (*6-Benzylaminopurin*) 전처리가 형질전환 효율증대에 미치는 영향 (고체선택 배지사용)

### 1. 목적

본 실험에 앞서 진행된 실험의 콩 형질전환 최적 조건(선택 항생제 hygromycin 농도:10ppm, agar 농도: 0.4%, 침을 이용한 상처방법 등)을 바탕으로 하여 호르몬(BA)의 전처리가 형질전환 효율증대에 미치는 영향을 알아 보고자 실험이 진행되었다.

### 2. 재료

식물재료로는 일품검정콩을 사용하였고 아그로박테리움 pTOK233/LBA4404를 사용하였다.

### 3. 방법

#### 가) 파종

종자는 70% ethanol에 30초간 담궈 1차 표면살균을 하고 1% sodium hypochloride에 30분간 shaking 하면서 소독한 후, 10분 간격으로 멸균수로 3회 수세하였다. 멸균된 Petri-dish에 파종 후 24℃ 배양실에서 16시간 광조건과 8시간 암조건으로 5일간 발아시켰다.

#### 나) *Agrobacterium* preparation

콩의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 supervector pTOK233을 가지고 있는 LBA4404를 사용하였다. *Agrobacterium*은 형질전환 3일 전 hygromycin 50mg/ℓ 이 포함된 고체 YEP 배지(yeast 5g/ℓ, pepton 5g/ℓ, NaCl 2.5g/ℓ, pH 7.0)에 streaking 한 후, 28℃ incubator에서 3일간 배양하였다.

#### 다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

공배양 배지로는 100 $\mu$ M의 acetosyringone이 포함된 AAM 배지{AAM salts and amino acids(Toriyama and Hinata, 1985), MS vitamins(Murashigs and Skoog, 1962), casamino acid 0.5g/l, sucrose 68.5g/l, glucose 36g/l, pH 5.2}를 사용하였다. 전처리를 위한 호르몬은 준비된 AAM 배지에 BA 5, 10ppm, TDZ 2, 5ppm의 농도로 첨가되었다. 형질전환 당일 왕성히 자란 *Agrobacterium*을 50ml 코닝튜브에 호르몬이 든 AAM 액체배지를 30ml 채운 후 spetula를 이용하여 OD값 0.5정도의 혼탁액이 되도록 풀어 넣었다. *Agrobacterium*이 고르게 풀리면 멸균 petri-여노에 10ml의 양을 부어 petri-dish에 얇게 깔리도록 준비해 두었다. 발아한 식물체의 hypocotyl을 떡잎 밑 약 1cm되는 곳에서 자른 후 양 떡잎 사이로 메스를 넣어 하배측까지 수직으로 자르고 새로 나온 분엽을 제거하였다. 떡잎 기부에서 위로 약 0.5cm와 아래 하배측쪽으로 약 0.1cm 이내의 부위를 needle을 이용하여 7-12회 반복하여 상처 내었다. *Agrobacterium*을 희석시킨 AAM 배지에 상처를 낸 떡잎을 flat side를 배지쪽으로 치상하여 3일 간 24 $^{\circ}$ C에서 암배양시켰다.

#### 라) Wash-out and shoot induction

3일간 공배양 후 *Agrobacterium*의 제거를 위하여 멸균수로 2회 세척한 후 500mg/l의 Timentin과 0.05%의 Triton X-100이 포함된 멸균수로 5-6회 세척하였다. 30ml의 세척 용액을 넣은 50ml 코닝 튜브에 떡잎을 넣었으며, mini 3D-shaker를 이용하여 매회 20분간 상하로 shaking 하였다. 5회 세척된 떡잎은 SI(shoot induction; B5 salt 3.16g/l, BAP 1.67mg/l, sucrose 3%, Agar 0.6%)-①(cefotaxime 500mg/l, hygromycin 10mg/l) 배지에 치상하여 24 $^{\circ}$ C 배양실에서 신초발생을 관찰하였다. 그후 2주 간격으로 SI-②(cefotaxime 200mg/l, hygromycin 10mg/l), SI-③(cefotaxime 100mg/l, hygromycine 10mg/l)로 옮겨 치상하면서 관찰하였다.

#### 마) GUS expression assay

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronide (X-Gluc)을 150 $\mu$ l dimethyl formamide에 녹인 후, 850 $\mu$ l의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. SI 배지 치상 후 0.5cm 크기로 자란 shoot 및 callus는 절단하여 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37 $^{\circ}$ C incubator에서 overnight 처리 하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

#### 4. 결과

호르몬 전처리 후 shoot의 발생율은 BA 5, 10ppm의 농도 중 BA 10ppm의 농도에서 더 양호한 결과를 보였다. 이와 관련하여 GUS positive 역시 BA 10ppm의 호르몬 농도에서 9.9%로 BA 5ppm의 농도보다 양호하였다. 호르몬을 처리하지 않은 control구와 비교 결과에 있어서는 호르몬을 처리하지 않은 경우 shoot 발생 및 GUS positive 의 퍼센트가 높은 것을 알 수 있다. 그러나 GUS의 발현정도가 호르몬 처리에 비해 아주 약하게 나타났고 후에 shoot elongation 배지에서 모두 고사하는 경향을 보였다(아래 그림 참조).

표1. 고체배지선발배지에서의 호르몬(BA)처리가 신초형성 및 형질전환에 미치는 영향

Ilpumkumjung	BA 0	BA 5ppm	BA 10ppm
Shoot Formation	268/1472 (18.2%)	174/1505 (11.6)	211/1554 (13.6%)
GUS positive/Shoot	191/268 (71.3%)	127/174 (73.0%)	154/211 (73.0%)
GUS/Total	191/1472 (13%)	127/1505 (8.4%)	154/1554 (10%)



(1)

(2)

(3)

(4)

그림1. 무처리 및 호르몬 처리 후의 GUS 발현 비교;(1), (2) 무처리의 GUS 발현;(3) 호르몬 처리 후의 GUS 발현;(4) 무처리와 호르몬 처리의 비교

## 제 5 절 호르몬 BA (*6-Benzylaminopurin*) 전처리 후, hygromycin 농도가 형질전환 효율에 미치는 영향 (고체선택배지사용)

### 1. 목적

호르몬 전처리 후, SI 배지(고체배지)에 선발 항생제 hygromycin의 농도를 각기 달리하여 선발항생제 농도에 따른 형질전환 효율증대를 알아보고자 실험이 진행되었다.

### 2. 재료

식물재료로는 일품검정콩이 사용되었으며 아그로박테리움은 pTOK233/LBA4404가 사용되었다.

### 3. 방법

#### 가) 파종

앞 실험과 동일함

#### 나) *Agrobacterium* preparation

앞 실험과 동일함

#### 다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

앞 실험과 동일함

#### 라) Wash-out and shoot induction

세척의 방법은 앞 실험과 동일하며, SI 배지에 각각 hygromycin 농도 (5, 10, 20ppm)를 각각 달리 첨가하여 3종류의 SI 배지를 준비하였다. SI-① 배지에 치상한 후, 2주간격으로 hygromycin 농도를 5, 10, 20ppm으로 달리한 SI-②와 SI-③배지에 옮겨주어 호르몬 전처리 후 hygromycin의 최적농도를 규명하였다.

#### 마) GUS expression assay

앞 실험과 동일함



#### 4. 결과

##### 가) 형질전환 후 shoot 및 callus 발생

형질전환 후 hygromycin 농도에 따른 shoot 발생은 BA 전처리 후 hygromycin 5ppm 첨가 배지에서 양호하였다. BA 전처리와 무관하여 hygromycin 20ppm의 고농도에서의 shoot 발생율은 2.3-0.0%로 매우 낮았다. BA 10ppm 전처리의 경우 hygromycin 5, 10ppm 두 농도에 따른 shoot 발생율(10.4-20.0%)은 BA 5ppm 처리의 경우(10.6-16.3%)보다 확연한 차이를 보였는데, hygromycin 10ppm 첨가배지에서의 shoot발생이 2배로 매우 양호하였다. 형질전환 후 hygromycin 농도에 따른 callus 발생은 hygromycin 농도가 낮은 5ppm에서 가장 양호하였고, BA 전처리 후 hygromycin 20ppm의 농도에서는 callus가 전혀 발생치 않았다. Callus 발생의 경우 역시 shoot 발생과 관련하여 BA 10ppm 전처리의 경우가 양호하였다. BA 5ppm 전처리 후 callus 발생은 전처리 후 hygromycin 농도별 차이가 크지 않았으나 BA 10ppm 전처리 후 hygromycin 농도별 callus 발생은 확연한 차이가 있었다.

##### 나) BA 전처리 후 은하공의 형질전환 빈도 측정(GUS분석)

BA 전처리후 hygromycin 농도별 GUS 발현은 shoot 발생율과 관련하여 shoot 발생율이 양호한 hygromycin 5ppm 농도에서 높은 빈도의 GUS 발현을 보였다. BA 전처리 농도별 GUS 발현은 BA 10ppm 전처리의 경우 GUS 발현율이 높았다.

##### 다) 발생한 shoot 중 GUS 발현의 빈도

발생한 shoot 중 GUS 발현(GUS 발현/shoot 발생)의 빈도는 BA 5ppm의 경우가 가장 균등하게 나타남을 볼 수 있다. 가장 형질전환의 효율이 높은 처리구는 BA 10ppm 처리 후 hygromycin 10ppm의 배지에 치상한 경우가 77.3%로 나타났다. shoot 발생의 경우는 hygromycin 5ppm 농도의 배지에서 가장 효율이 높았으나 control구를 비롯하여 호르몬 처리구

모두에서 형질전환 효율은 선발항생제 적정농도인 hygromycin 10ppm의 농도임이 밝혀졌다. 호르몬 무처리구의 경우, 첫 번째 실험에서처럼 GUS발현정도가 매우 약하게 나타났고, 하이그로마이신 10ppm을 포함한 shoot elongation 배지에서 모두 고사하는 경향을 보였다.

표1. 고체선발배지에서 호르몬 BA (*6-Benzylaminopurin*) 전처리 후, hygromycin 농도가 형질전환 효율에 미치는 영향  
(단위:ppm)

	BA 0			BA 5			BA 10		
	hyg5	hyg10	hyg20	hyg5	hyg10	hyg20	hyg5	hyg10	hyg20
Shoot Formation	160/614 (26.0%)	108/628 (17.2%)	0/230 (0.0%)	106/653 (16.2%)	67/633 (10.6%)	1/219 (0.5%)	140/699 (20.0%)	66/637 (10.4%)	5/218 (2.3%)
GUS pos/Shoot	109/160 (68.1%)	82/108 (75.9%)	0/0 (0.0%)	78/106 (73.6%)	51/67 (76.1%)	1/1 (100%)	96/140 (69%)	53/66 (80%)	5/5 (100%)

## 제 6 절 호르몬 BA(*6-Benzylaminopurin*) 전처리 후 치상방향에 따른 형질전환 효율비교 (고체선태배지사용)

### 1. 목적

호르몬 전처리 후 SI 배지에 치상 할 경우 flat side를 up 또는 down으로 나누어 치상했을 경우 shoot의 발생 및 효율증대에 관하여 알아보하고자 수행하였다.

### 2. 재료

본 실험을 위하여 식물재료는 잎품검정콩을 사용하였고 아그로박테리움은 pTOK233/ LBA4404를 사용하였다.

### 3. 방법

#### 가) 파종

앞 실험과 동일함

#### 나) *Agrobacterium* preparation

앞 실험과 동일함

#### 다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

앞 실험과 동일함

#### 라) Wash-out and shoot induction

세척의 방법은 앞 실험과 동일하며, SI-① 배지에 flat side를 up과 down으로 나누어 치상한 후 2주간격으로 SI-②와 SI-③배지에 옮겨주어 호르몬 전처리 후 치상방향방향에 따른 생육정도를 비교하고자 하였다.

마) GUS expression assay

앞 실험과 동일함

4. 결과

BA 호르몬 전처리 후 치상 방향별 shoot의 발생율은 BA 10ppm 처리의 경우를 제외하고 flat side를 up으로 치상한 경우가 down으로 치상한 경우보다 양호하였다. BA 10ppm 처리 후의 shoot 발생은 다른 두 경우와 다른 양상을 보였는데 flat side를 down으로 치상한 경우 더 발생이 양호하였다. Shoot 발생과 관련하여 GUS 발현 역시 flat side를 up으로 치상한 경우 양호하였는데 BA 10ppm 처리의 경우만 반대의 양상을 보였다. 발생한 shoot 중 GUS 발현율을 비교해 보면 모든 처리구의 경우 flat side down으로 치상한 경우가 양호하여 flat side down의 치상방법이 호르몬 전처리 후에도 형질전환 효율증대에 효과가 있음을 보여주었다. GUS발현의 세기와 생존율에 있어서는 앞의 두 실험결과와 마찬가지로 무처리구에서는 약한 발현과 생존율 0을 나타내어 호르몬 처리가 형질전환의 장기적 선발에 큰 영향을 미침을 알 수 있었다.

표1. 호르몬 전처리후, 치상방향이 형질전환에 미치는 영향  
(단위:ppm)

	BA 0		BA 5		BA 10	
	flat side up	flat side down	flat side up	flat side down	flat side up	flat side down
shoot formation	130/503 (25.8%)	138/739 (18.7%)	102/536 (19.0%)	71/759 (9.4%)	88/635 (13.9%)	118/701 (16.8%)
GUS positive/Shoot	87/130 (66.9%)	104/138 (75.4%)	72/102 (70.6%)	54/71 (76.1%)	58/88 (65.9%)	91/118 (77.1%)

## 제 7 절 호르몬 전처리 후 액체배양의 선발효과

### 1. 목적

전처리 후 액체 진탕 배양이 형질전환체 선발에 보다 효과가 있을 것으로 판단하여 호르몬 전처리 후 액체 배양의 선발 효과를 알아보려고 실험이 진행되었다.

### 2. 재료

본 연구를 위하여 식물재료는 일품검정콩을 사용하였고 아그로박테리움은 pH11/EHA105를 사용하였다.

### 3. 방법

#### 가) 파종

앞 실험과 동일함

#### 나) *Agrobacterium* preparation

준비된 *Agrobacterium*을 형질전환 3일전 kanamycin75mg/L+rifampicin 25mg/L이 포함된 고체 YEP 배지에 streaking 한 후 28°C incubator에서 3일간 배양하였다.

#### 다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

공배양 배지는 100 $\mu$ M acetosyringone이 포함된 AAM배지, AAM+BA 5ppm, AAM+BA 10ppm, AAM+TDZ 2ppm, AAM+TDZ 5ppm의 배지를 준비하였다.

공배양 배지외의 실험방법은 앞 실험과 동일함

#### 라) Wash-out and shoot induction

멸균수로 2회 세척한 후 500ml/L의 Timentin과 0.05%의 Triton X-100

이 포함된 멸균수로 20분 간격으로 5회 세척하였다. Liquid 선발배지인 Shoot induction 배지는 SI-①(SI+cefotaxime 100ppm+timentin 100ppm+hygromycin 10ppm), SI-②(SI+cefotaxime 100ppm+timentin 50ppm+hygromycin 10ppm)의 두종류 배지를 사용하였는데, liquid SI 배지는 100ml 삼각플라스크에 20ml씩 나누어 분주하여 사용하였다. 수세한 떡잎은 SI-① liquid배지에 10개씩 나누어 치상한 후 24℃ 배양실에서 110rpm으로 18시간 광조건과 8시간 암조건으로 생육시켰다. 2주 후 SI-②배지로 이식하고 shoot는 SE배지로 이식하거나 GUS 분석하였다.

#### 마) GUS expression assay

앞 실험과 동일함

#### 4. 결과

BA, TDZ 전처리 후 shoot 및 callus 발생과 형질전환 빈도측정의 결과 BA, TDZ 전처리 후 shoot 발생은 BA 5ppm의 농도가 BA 10ppm의 농도보다 양호하였고 TDZ 역시 2ppm의 농도에서 TDZ 5ppm의 농도보다 shoot 발생이 양호하여 고농도의 호르몬 처리보다는 적정량의 호르몬 처리가 양호함을 보여주었다. BA, TDZ 전처리 후 callus 발생은 BA 5ppm의 농도에서는 비교적 양호하였으나 10ppm의 농도에서는 callus가 발생치 않았고, TDZ 처리에서는 두농도 모두에서 callus가 발생치 않아 BA 전처리의 결과와는 다소 차이를 보였다. BA와 TDZ 전처리 후 shoot 발생은 TDZ 2ppm의 농도에서 가장 양호하였고 callus는 BA 5ppm에서만 발생하였다. Shoot 발생은 호르몬을 처리하지 않은 경우 더 양호하였으나 callus의 발생은 호르몬 처리가 보다 양호하였고, 발생한 shoot의 size 및 상태가 호르몬의 처리에서 확연한 차이를 보이며 양호하였다. BA, TDZ 각 농도별 GUS 분석결과 shoot 발생과 연관하여 BA 5ppm, TDZ 2ppm 농도에서 GUS 발현이 양호하였고 BA 5ppm에서의 callus는 GUS 분석결과 발현빈도가 양호하였다. TDZ 2ppm의 농도에서 shoot 발생

율은 가장 양호하였으나 GUS 발현의 경우 호르몬 전처리 모든 구에서 크게 차이를 보이지 않고 호르몬 처리의 결과 발생한 대부분의 shoot에서 GUS 발현을 보여 호르몬 전처리가 효과가 있음을 보여주었다. 발생한 shoot중 GUS 발현은 호르몬 처리의 경우가 양호하였으며 호르몬 처리의 결과 강한 GUS 발현을 보여 액체배양이 초기 선발에 효과가 있음을 나타내었다. 이 실험의 결과 호르몬 전처리 후에, 액체선발배지에서 선발을 할 경우 형질전환과 생존율을 크게 증가시키는 것에 착안하여 이 과정에 관한 특허가 출원중이다.

표1. 전처리 후 액체배양이 형질전환체 선발에 미치는 영향

		Cont	BA		TDZ	
			5ppm	10ppm	2ppm	5ppm
Shoot	Formation	47/368 (12.8%)	20/350 (5.7%)	19/345 (5.5%)	23/384 (6.5%)	20/368 (5.4%)
	GUS positive	21/368 (5.0%)	16/350 (4.6%)	15/345 (4.3%)	18/348 (4.7%)	17/368 (4.6%)
GUS positive/Shoot		21/47 (44.0%)	16/20 (80%)	15/19 (78.0%)	18/23 (78.0%)	17/20 (85.0%)



그림. 형질전환효율증진을 위한 액체배지 선발

## 제 8 절 호르몬 전처리와 liquid배지 선발이 형질전환체의 생존율에 미치는 영향

### 1. 목적

호르몬 전처리와 liquid 배지에서의 선발이 형질전환체가 항생제배지에서 고사하지 않고 끝까지 생존하는데 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험을 수행하였다.

### 2. 재료

본 실험의 식물재료로는 일품검정콩을 사용하였으며 아그로박테리움은 pTOK233/ LBA4404를 사용하였다.

### 3. 방법

#### 가) 파종

앞 실험과 동일함

#### 나) *Agrobacterium* preparation

앞 실험과 동일함

#### 다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

앞 실험과 동일함

#### 라) Wash-out and shoot induction

앞 실험과 동일함.

#### 마) 생존율 분석

장기간 항생제 하이그로마이신 10ppm을 포함한 재분화배지에 형질전환 싌초들을 치상하여 생존여부를 조사하였다.

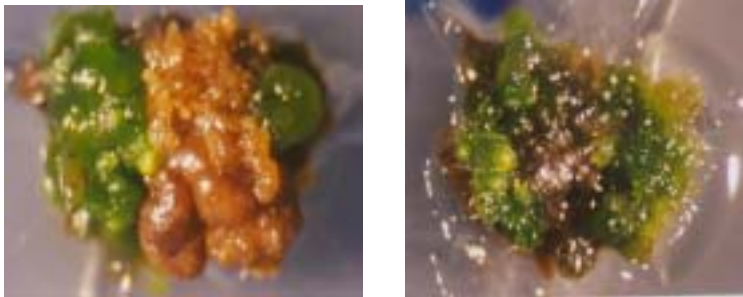


#### 4. 결과

이미 앞의 연속된 실험에서 설명한 바와 같이 식물체의 호르몬 처리는 선발초기에는 형질전환빈도에서 무처리와 별 차이가 없이 나타났으나 항생제 선발배지에서의 계속된 선발에는 무처리에 비해 월등히 높은 생존율을 나타내 보였다. 특히 호르몬 처리없이 액체선발배지를 이용하여 4주간 선발을 하였을 때는 모두 고사함을 관찰하였다.

표1. 무처리와 호르몬 처리가 형질전환체 생존율에 미치는 영향

Control		hormone treated	
Agar	Liquid	Agar	Liquid
3/30	-	15/46	41/130
(10%)	(0%)	(33%)	(32%)



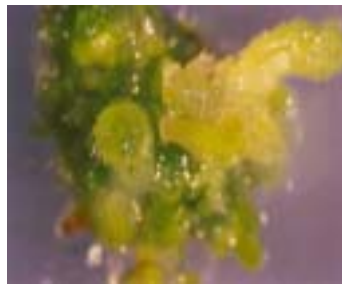
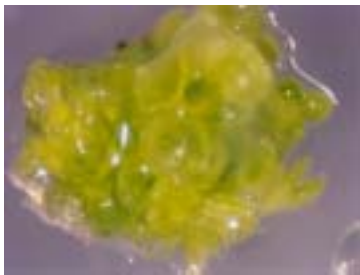
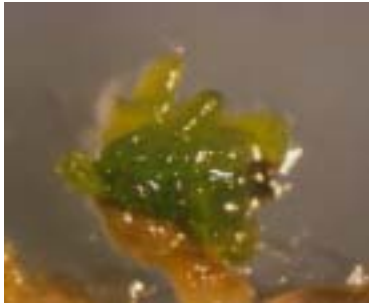


그림1. 호르몬처리와 액체항생제배지의 선발을 통해 살아남은 다양한 콩 형질 전환계통들의 모습

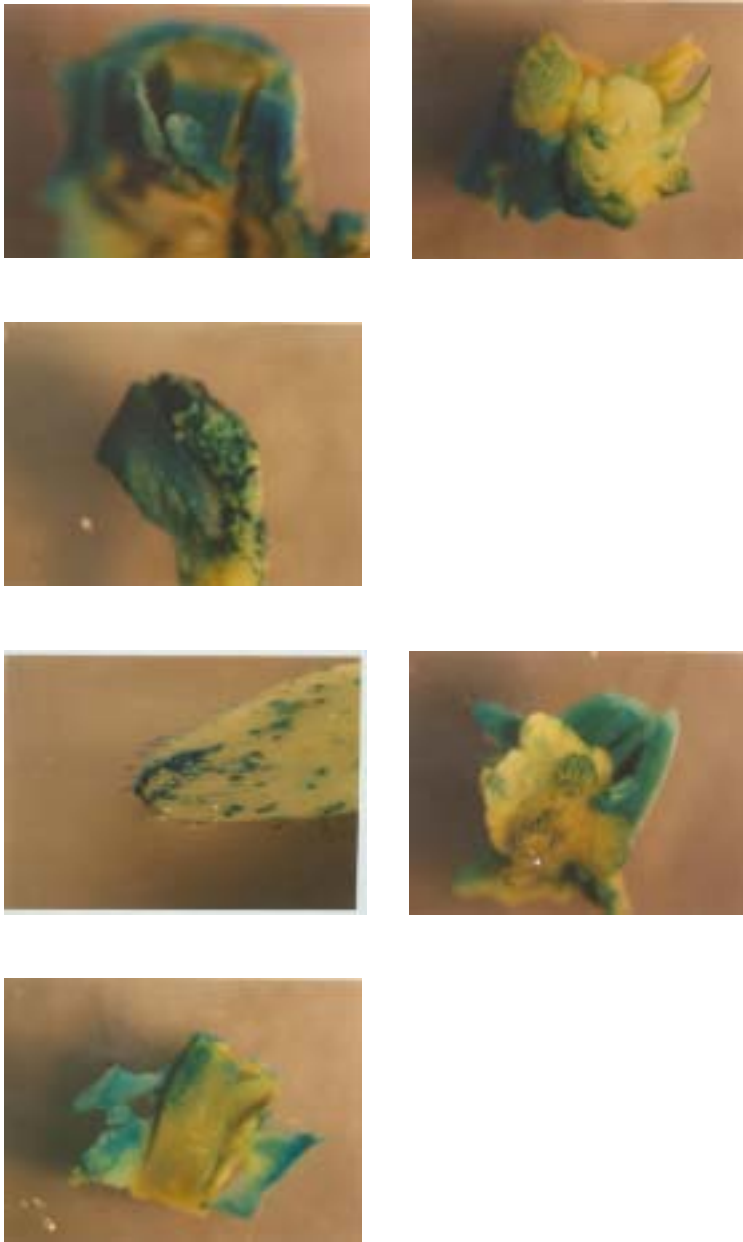


그림2. 호르몬처리 및 액체항생제배지 선발 후, 재분화체에 대한 GUS 분석

## 제 9 절 공배양시 황화합물 첨가가 콩 형질전환에 미치는 영향

### 1. 목적

최근에 보고 된 황화물의 첨가가 초기 콩 형질전환에 미치는 영향에 대해 알아보고, 현재까지 진행되어온 본 실험실의 콩 형질전환법과의 비교실험으로 보다 높은 고효율의 형질전환체 선발방법을 구명하고자 본 실험을 수행하였다.

### 2. 재료

본 연구를 위하여 식물재료로는 일품검정콩을 사용하였고 아그로박테리움은 pTOK233/LBA4404를 사용하였다.

### 3. 방법

#### 가) 파종

70% ethanol 표면살균 후 12N HCl 3.5ml과 5.25% sodium hypochlorite 100ml의 혼용액이 든 데시게이터에 24시간 소독한 후 멸균된 petri-dish에 파종 후 24℃ 배양실에서 16시간 광조건과 8시간 암조건으로 생육시켰다.

#### 나) *Agrobacterium* preparation

앞 실험과 동일함

#### 다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

형질전환 당일 왕성히 자란 *Agrobacterium*을 공배양 배지가 첨가된 50ml 코닝튜브에 OD값 0.5정도의 혼탁액이 되도록 풀어 준비한 뒤 위 실험과 동일한 방법으로 접종 한 뒤 *Agrobacterium*을 희석시킨 AAM

배지에 상처낸 떡잎을 넣고 3D-shaker를 이용하여 상하로 20분간 shaking 한 후 고체 CCM 배지에 flat side를 아래로 하여 3일간 24℃에서 암배양하였다(Co-cultivation medium: 배지조성표 참고).

#### 라) Wash-out and shoot induction

##### o 실험실방법

전 실험에서 언급된 것과 같이 수행되었다.

##### o 미네소타 대학 방법

수세한 떡잎은 hygromycin이 첨가되지 않은 SI-①배지에 10개씩 나누어 flat side up으로 치상한 후 24℃ 배양실에서 18시간 광조건과 8시간 암조건으로 14일간 생육시켰다. 2주 후 hygromycin 5ppm이 첨가된 SI-②배지로 hypocotyl을 제거하여 이식한 후 SI-①배지에서의 생육조건과 동일하게 14일간 생육시켰다. 치상 28일째 cotyledon과 callus를 제거한 후 hygromycin 10ppm이 포함된 SE 배지로 이식하여 shoot를 성장시켰다. 4cm 이상 shoot가 자라면 root medium으로 이식시킨 후 식물체 관찰하였다.

#### 마) 신초형성을 및 GUS expression assay

형질전환 효율 검정을 위해 신초형성을 조사하였고, 특히 후기에 재분화되어 나오는 신초들을 대상으로 GUS 발색 반응을 수행할 예정이다.

#### 바) Genomic DNA 추출

잠정적인 형질전환체들의 잎을 1g 정량한 후 액체질소로 얼리고 막자사발에 액체질소를 부어 사발을 차갑게 만든 후, 얼린 잎을 넣고 곱게 갈아 주었다. DNA extract Buffer [7M urea(210g/500ml), 0.3M NaCl(30ml/5M stock 500ml)] 를 6ml 첨가하여 잘 섞어 준 후, phenol/chloroform 6ml을 첨가하고 천천히 뒤집으면서 완전히 섞어 주었다. 12000rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상층액을 따서 새 tube에 옮겨주었다. 동일

volume의 chloroform첨가 후, 천천히 뒤집으며 섞고, 12000rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액을 따서 새 tube에 옮겨주었다. 1ml의 4.4M ammonium acetate(pH5.2)를 넣고, 2배 부피의 에탄올을 첨가한 후, 잘 교반하여, 냉동고에서 20분 이상 보관하였다. 12000rpm으로 15분간 원심분리하여 pellet을 모으고, 상층액을 버린 후, pellet을 10분간 말렸다. TE buffer 0.5ml에 녹이고, RNase 1 $\mu$ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에 1시간동안 처리하였다. 처리 후, phenol/chloroform 0.5ml을 넣고 천천히 섞어 주었다. 용액을 12000rpm으로 10분간 원심분리 하였고 상층액을 따서 새 tube에 옮긴 후, 동일 volume의 chloroform첨가하여 서서히 교반을 진행하였다. 다시 12000rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상층액에 1/10 volume의 sodium acetate와 1ml의 100% ethanol을 넣어 냉동고에 20분 이상 보관하였다. 12000rpm으로 15분간 원심분리하여 DNA를 pellet화한다음 TE buffer 50 $\mu$ l에 DNA를 녹였다. 최종적으로 흡광도를 측정하여 DNA의 양을 측정하여 southern을 실시하였다.

#### 사) PCR 및 Northern 분석

유전자의 도입여부를 알아보기 위하여 Hyg 유전자의 sequence를 이용하여 PCR primer를 합성하였다. 작성한 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 먼저 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 denature를 하고, 다시 denature를 위하여 94 $^{\circ}$ C에서 45초, annealing을 위하여 55 $^{\circ}$ C에서 45초, extension 72 $^{\circ}$ C 1분 30초 처리한 과정을 35회 반복한 후, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 처리하였다. 또한 도입유전자의 발현 여부를 알아보기 위하여 잠정적인 형질전환체로부터 RNA를 추출하였고 Northern blot을 하였다. ERNA 추출을 위하여 SOL D(4M guanidinium thiocyanate 23.63g, 25mM sodium citrate pH7.0 1.67ml of 0.75M, 0.5% sarcosyl 2.5 ml of 10%, DEPC-treated water up to make 50ml) 10ml/g와 2-Mercaptoethanol 75 $\mu$ l를 넣은 50ml짜리 tube에 시료 1g을 액체질소를 부어가며 곱게 갈아 넣어 vortex하여 실온에 10~15분 둔 후, 2M

Sodium acetate(pH 4.0)를 0.1 volume(1ml)을 넣었다. 그 후, phenol (water saturated)을 1 volume(10ml)을 넣고, chloroform/lisoamyl alcohol (49:1)을 0.2 volume(2ml)을 넣고, 1분동안 inversion하여 ice에 15분간 처리한 후, 4°C, 12000rpm으로 20분간 centrifuge하였다. centrifuge를 한 후 상층액을 따서 새 tube에 옮기고 chloroform/lisoamyl alcohol (49:1)을 상층액의 0.5~1 volume의 양만큼 넣고 1분동안 inversion하였다. 그 후 4°C, 12000rpm으로 20분간 한번 더 centrifuge하였다. Centrifuge를 한 후 상층액을 따서 새 tube에 옮기고, 1 volume의 isopropanol을 넣고 inversion하여 고루 섞어서 -20°C에서 1시간 처리하였다. 그 후, 4°C, 12000rpm으로 20분간 centrifuge하였다. centrifuge를 한 후 상층액을 버리고 RNA를 모아서 750 $\mu$ l의 solution D(or DEPC water)를 넣어 pellet을 녹였다. Isopropanol을 동일 volume으로 넣은뒤 4°C, 1200rpm에서 15분간 centrifuge하였다. 상층액을 버리고, 70% ethanol을 1ml넣고 4°C, 8000rpm에서 10분간 centrifuge하여, 70% ethanol을 버리고 깨끗이 말렸다. 그후, DEPC - treated water를 500 $\mu$ l 넣고 잘 녹인 뒤 정량한 뒤 membrane을 만들어 northern blot을 실시하였다. Nylon membrane을 만들었으며 그 방법은 다음과 같다.

전기영동한 젤을 필요한 만큼 잘라서 nylon membrane은 transfer 용액에 5분 담귀서 downward alkaline transfer방법으로 설치한 후 overnight동안 transfer하였다. 그 후, Neutralization용액에 10분간 처리한 후, 10분간 건조시켜 UV처리하였다.

Northern에 필요한 probe를 만들기 위해 Hyg유전자를 PCR하여 Accuprep<sup>®</sup> Gel Purification Kit(Bioneer)를 사용하여 elution하였다. PCR 조건은 denaturation 94°C 45초, annealing 55°C 45초, extention 72°C 1분 30초 처리한 과정을 35회 반복하였으며 1% agarose gel을 만들어 전기영동한 결과 적절한 사이즈의 밴드가 나타났다.

#### 4. 결과

미네소타 대학의 실험방법으로 실험한 결과 초기에 hygromycin에 의한 선발이 이루어지지 않아 실험실방법(아래 도표 참조)으로 실험한 결과보다 많은 수의 shoot가 발생하였는데 두 방법의 경우 모두 Shoot 발생 후 SE 배지로 이식한 후 shoot/callus pad가 다수 발생하였다. Hygromycin 선발이 이루어지는 SE 배지 이식 후 초반에 발생한 shoot는 대부분 죽어가고 새로운 shoot/callus pad가 왕성히 자라는 것이 현미경으로 관찰되었다. 현미경 관찰 결과 shoot의 발생 및 형질전환 여부를 관찰할 수 있었는데 형질전환 되지 않은 경우의 shoot는 hygromycin이 첨가된 배지에 바로 접촉하지 않은 채 성장하는 것을 볼 수 있었다. 현재 이들 후기에 발생하는 shoot 들에 대한 GUS 분석이 수행중이고, 두 가지 방법의 비교 실험이 계속 진행중이며 실험의 결과를 현미경을 통하여 매일관찰하고 있다. 아래는 현재 실험실에서 사용중인 황화합물을 첨가하는 방법으로 변형된 실험실 형질전환방법이다. 유전자의 도입 여부를 T0 세대에서 알아보기 위하여 genomic DNA를 추출하였다.



## Soybean Transformation by modified lab protocol

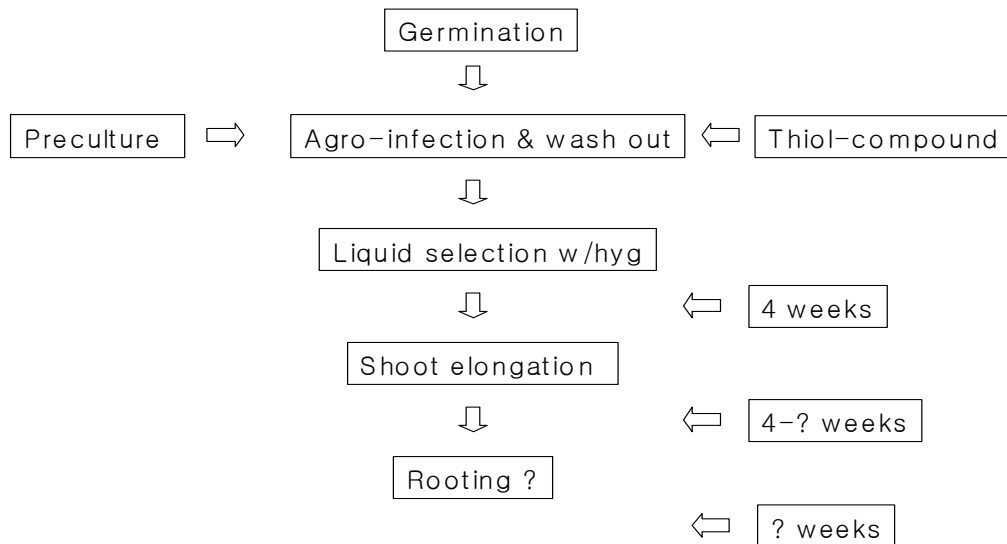


표1. 실험실 방법과 미네소타 방법으로 형질전환한 개체들의 신초형성을 비교

	Minnesota	Lab. Proto
Shoot formation	200/778 (25.7%)	87/590 (14.7%)

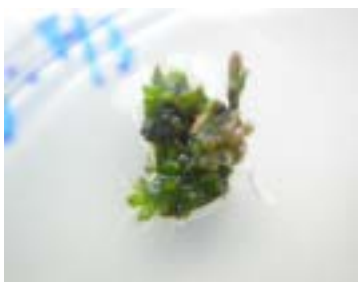




그림1. 황화물첨가방법에 의해 만들어진 잠정적인 형질전환체들의 모습

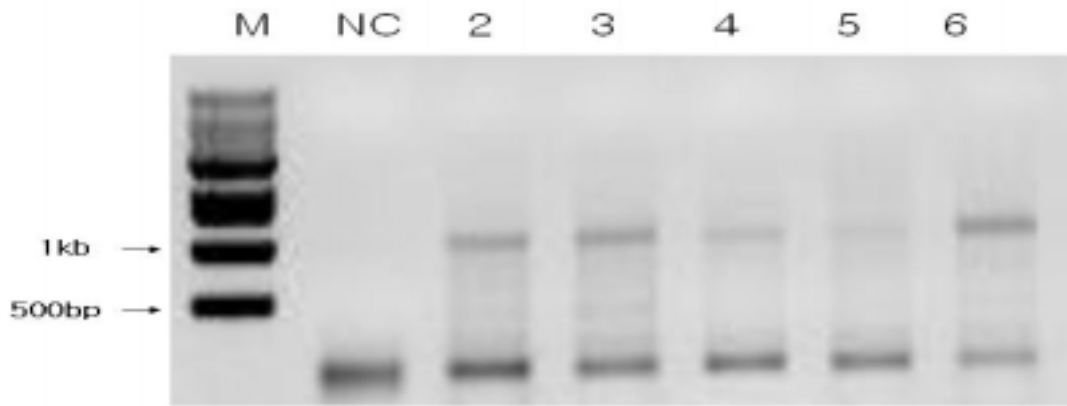


그림2. 잠정적인 형질전환체로부터 도입 유전자의 PCR 확인



그림3. 잠정적인 형질전환체들에 대한 GUS 유전자 발현 검정

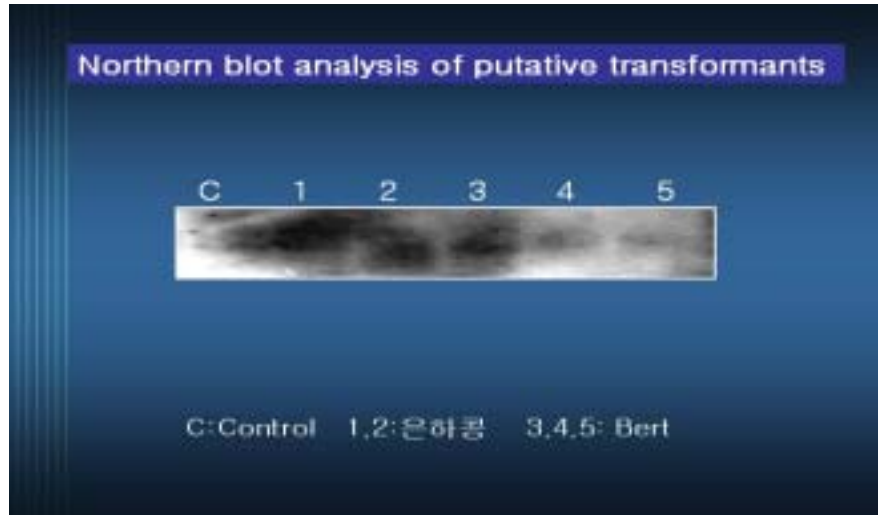


그림4. Northern 분석을 통한 잠정적인 형질전환체에 대한 도입 유전자 발현 검정

## 제 4 장 목표달성도 및 관련 분야에의 기여도

### 1. 연도별 연구목표

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	예상 결과물
1차년도 (2001)	▶ 새로운 고효율 공 형질전환 기초 기술 개발	- 새로운 공 형질전환 기초기술 개발; 전처리기술을 이용한 효율 증대	- 고효율형질전환 기초기술
2차년도 (2002)	▶ 새로운 고효율 공 형질전환 기술 개발 ▶ 형질전환체 분석	- 새로운 고효율 공 형질전환 기초 기술 개발; 전처리기술을 이용한 효율 증대 (5%이상) - 형질전환체 분석 및 후대 검정 - 형태적, 생리적, 생화학적 변이 관찰	- 고효율 형질전환 기술개발(5%) - 형질전환체(50계통 이상) - 논문발표
3차년도 (2003)	▶ 새로운 고효율 공 형질전환 기술 개발 ▶ 형질전환효율 비교 분석	- 새로운 고효율 공 형질전환 기초 기술 개발; 전처리기술을 이용한 효율 증대(5%이상) - 형질전환체 분석 및 후대 검정 - 형태적, 생리적, 생화학적 변이 관찰	- 고효율 형질전환 기술개발(5%) - 논문발표 및 특허등록

### 2. 연구추진 실적

구 분	연구개발 세부목표	추진 실적	달성도 (%)
2001	▶ 새로운 고효율 콩 형질전환 기초 기술 개발	▶ 제균제(Cefotaxime), 하이그로마이신 농도, 적정 agar 농도, 치상방향, 상처방법 조건 확립	100
2002	▶ 새로운 고효율 콩 형질전환 기술 개발 ▶ 형질전환체 분석	- 고효율의 형질전환 조건 확립을 위한 전처리 기술 개발 - 고효율 형질전환 조건 확립을 위한 액체배지 선발 조건 확립	100
2003	▶ 새로운 고효율 콩 형질전환 기술 개발 ▶ 형질전환효율 비교 분석	▶ 콩 형질전환효율 증대	90

본 연구를 수행하며 얻은 성과는 아래와 같이 요약할 수 있다.

- 1) 고효율 형질전환기술개발을 위한 조건 확립: 고효율의 신 형질전환 조건 확립을 위한 실험수행결과, 호르몬 전처리 조건 확립, 황화물 첨가, 적정 제균제 선발, 적정 선발 조건 확립(하이그로마이신농도, 상처방법, 치상방향, agar 농도조건)등을 하였다.
- 2) 전처리 기술 특허출원: 호르몬 전처리 결과 형질전환의 효율증대를 확인하였으며, GUS분석 결과 도입 유전자의 향상된 발현을 확인할 수 있었다.
- 3) 고효율의 형질전환을 위한 기초자료 활용: 본 실험에서 선발된 genotype들은 유전자 도입을 위한 형질전환실험의 재료로 사용될 수 있으며, 규명된 많은 형질전환 조건들은 고효율의 형질전환을 위한 기초자료로 활용될 수 있다.
- 4) 신형질전환기술개발의 활용: 호르몬 전처리 기술과 액체선발배지를 이용한 선발기술개발은 다른 형질전환이 어려운 작물들의 형질전환효율증진을 위하여 사용될 수 있는 매우 중요한 기초기술개발이다.
- 5) 유용한 형질전환체 생산 및 분자육종기여: 본 실험을 통한 콩 형질전환 기

술개발은 프론티어 사업의 유전자 탐색분야의 연구결과, 다양하고 농업적, 산업적으로 유용한 유전자가 많이 확보되었을 때, 본 실험조건을 통하여 형질 전환을 함으로써 유용한 형질전환체 및 분자육종에 큰 기여를 할 것으로 생각 된다.

6) 고효율 형질전환 기초기술의 활용: 호르몬 전처리 기술과 액체선발배지를 이용한 고효율의 형질전환기술은 앞으로 다양하고 많은 고부가가치의 유용유전자를 콩에 도입하여, 고부가가치의 형질전환 콩을 생산하고, 콩 유전체 기능 연구 등에 매우 중요한 기초기술로 활용가능하다.

7) 고효율의 형질전환기술개발을 위하여 지난 3년간 전문적인 3명의 조직배양 전문연구원과 1명의 대학원생이 투입되었으며, 현재까지 조건 확립을 위하여 형질전환시킨 떡잎의 수가 약 60,000여개에 이르고 조건확립을 위하여 GUS분석을 한 싹(shoot)의 숫자가 약 4000개에 이르고 있다. 현재도 매주 약 1000개의 떡잎에 형질전환 실험이 수행하여 왔다.

8) 본 과제를 수행하면서 아래와 같은 성과물을 얻을 수 있었다.

- 한국육종학회 poster 3회 발표: 2001년 추계, 2002년 춘계, 2003년 춘계
- 고효율 형질전환기술 1건에 특허출원
- 일본 후쿠야마 연구소 콩 형질전환 연구팀 상호 방문 및 상호 lab seminar 토의
- 미국 미네소타 대학 Dr. Somers lab 과 연구협의 및 방문

## 제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

### 1. 추가연구의 필요성

콩 형질전환 및 콩 GMO 품종생산은 최근에 활발히 진행 중인 유전체 연구와 맞물려 각 나라마다 다양한 고부가가치의 품종을 생산하기 위하여 진행하고 있는 선두 연구 분야이다. 많은 논문결과들이 콩 형질전환의 어려움을 나타내고 있고, 유전자층으로 유전자의 도입을 한 경우, 후대에서의 gene silencing이 문제가 되는 등 적지 않은 어려움이 보고 되고 있다. 미국의 다국적 대형 회사들을 제외하고 많은 연구기관들이 Agrobacterium을 매개로한 형질전환을 하고 있으며, 보다 고효율의 안정적인 형질전환기술개발을 위하여 노력을 하고 있다. 본 연구에서는 우리나라 콩 품종을 재료로 고효율의 형질전환기술을 개발하기 위하여 지난 3년간 연구를 수행하였고 나름대로 가시적 성과를 이루었다. 그러나 콩 형질전환의 실험적 특성과 제한된 여건상 3명의 전문연구원을 투입하였음에도 불구하고 형질전환의 결과를 후대에서 확인하는 데까지는 하지 못하였다. 이 부분에 대해서는 올 가을까지는 종자를 확보하고 후대에서의 다양한 유전자 발현 검정을 하려고 한다. 본 연구를 통하여 현재까지 고효율의 형질전환을 위한 다양한 실험조건이 확립되었으며, 이들 조건의 최적화에 힘입어 최근에 다수의 하이그로마이신 저항성 개체들이 얻어지고 생육이 전개되고 있는 것은 매우 고무적인 일이라 하겠다. 이와 같은 조건을 토대로 2단계 프론티어 사업에서 기회가 주어진다면 농업적 유용유전자의 도입을 곧 수행하려고 한다.

### 2. 앞으로의 전망

농산물 시장 개방에 따른 외국 농산물의 수입이 앞으로 크게 증가하여 국내 농업시장의 기반을 상당부분 위협할 것으로 전망된다. 여러 가지 농업 여건이 불리한 우리나라는 보다 더 기술 집약적인 농업을 지향해야 하며, 생명공학각



은 고부가가치의 기술이 농업에 접목되어야 한다. 농산물 시장 개방과 더불어  
외국의 다양한 종류의 GMO가 국내로 유입될 것으로 본다. 처음에는 일반의  
거부감도 있을 수 있으나 여러 가지 GMO가 가지는 장점이 부각되고 기능성  
이 인정되면 빠른 속도로 국내시장을 잠식할 것이다. 현재 선진외국들이 농업  
생명공학 분야에 많은 연구비를 투입하고 개발을 서두르는 이유가 여기에 있  
다. 따라서 국내에서도 이에 대응할 수 있는 연구의 수준을 끌어 올리고 생산  
기반을 갖추어 놓아 대비하여야 할 것이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

1단계에서는 일본 후쿠야마연구소의 방문을 통하여 일본의 콩 형질전환연구의 현황을 알 수 있었다. 일련의 경우, 당시에 후쿠야마 연구소가 콩 형질전환을 성공적으로 수행하고 있는 유일한 연구팀이었으나, 형질전환방법이 유전자총을 이용한 방법에만 치우쳐 있었고 결국 후대에 유전자의 silencing 현상으로 인해 많은 문제점을 갖게 되었다. 그와 같은 현상을 미루어 볼 때, 콩 형질전환방법은 아그로박테리움을 이용한 방법이 반드시 개발되어야 할 것으로 생각된다. 1단계 연구과제 수행 중, 현재 아그로박테리움을 이용한 형질전환방법으로 가장 연구가 앞서있는 미네소타대학을 방문하려했으나, 현지의 사정으로 방문을 할 수 없었다. 그러나 오는 9월 미네소타대학을 현지 방문하여 연구현황을 돌아보고 연구협의를 할 예정이다. 이 방문을 통하여 미국내의 콩 형질전환에 대한 많은 정보를 얻게 될 수 있을 것으로 생각한다.

# 협동과제명: 검정콩 안토시아닌분석 및 관련 marker 개발

## I. 연구목적

검정콩은 과거로부터 약콩이라 하여 한방약으로도 이용하였고, 최근 종피에 다량의 안토시아닌이 함유되어 있다는 사실이 밝혀져 다양한 생리활성을 기대할 수 있으므로 식품첨가제 및 산업적 원료로도 이용가치가 높다. 따라서 본 협동과제는 검정콩 종피에 함유된 안토시아닌의 정량·정성 분석 기술을 검토하며, 검정콩 유전자원의 함량적 특성을 분석하여 고 안토시아닌 함유 검정콩 유전자원을 선발하고자한다. 또한 안토시아닌 함량을 지배하는 유전자와 연관된 마커 탐색용 F2 유전집단의 개발 및 모본간 다형성을 보이는 SSR 마커를 선발하고, 선발된 마커를 이용하여 F2 집단에서의 유전분리 양상을 조사하며, F2 개체별 종실 안토시아닌 함량 분석을 수행하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 고 안토시아닌 함유 콩 유전자원 선발

#### 가. 유전자원 수집 및 재배

고 안토시아닌 함량 유전자원을 선발하기 위해 검정콩 유전자원을 국가별로 수집하였다. 일본 64개, 미국24개, 국내 33개로 총 111개의 검정콩 유전자원을 수집하여 포장에 파종한 후 수확된 종자를 이용하였다.

#### 나. 안토시아닌 함량 분석

수확된 111개의 유전자원을 이용하여 종피에서의 안토시아닌 함량 분석을 하였다. 종피를 벗긴 후 종피 0.1g을 정확히 평량하고 1%염산-20%메탄올 용액 30ml를 첨가한 후 상온에서 48 시간추출 하였고, 추출된 종피색소 용액은 Toyo 5B 및 0.45 $\mu$ m membrane filter로 여과한 후 역상 HPLC 조건에서 (530nm, ODS-120T, 75 : 20 : 5 = H<sub>2</sub>O : MeOH : Formic acid) 안토시아닌의 함량 및 조성을 분석하였다.

## 2. 안토시아닌 함량 연관마커 탐색

### 가. 모본의 선발

안토시아닌 함량을 결정하는 유전자와 연관된 마커를 탐색하기 위하여 안토시아닌이 함유되어 있지 않는 노란 종피색 모본 IT182305(농촌진흥청 유전자원과로부터 분양)와 검정 종피색을 가진 재래종인 곡뜯을 이용하였다. IT182305는 화색이 백색이며 100립중은 4.7g으로 야생형과 재배종의 중간 형태를 보이며, 곡뜯은 화색이 자색이며 대립종이고 성숙 자엽이 녹색이다.

### 나. 교배 및 유전 집단

2001년 4월에 두 모본을 온실에 파종하여 5월에 교배해서 7월에 F<sub>1</sub> seed를 수확하였다. 수확한 F<sub>1</sub> seed를 온실에 파종하여 F<sub>1</sub> plant의 질적 형질을 조사하여 잡종성을 검증하였다. 잡종성이 검증된 개체는 자가수정하여 2001년 11월에 F<sub>2</sub> seed를 획득하였다. 수확된 F<sub>2</sub> seed는 모본과 함께 2002년 5월 24일 포장에 파종하여 F<sub>2</sub>집단을 전개하였다. 전체 270개체의 F<sub>2</sub> 중에서 임의로 119개체를 선발하여 연관마커 탐색에 이용하였다.

### 다. Genomic DNA 추출

Genomic DNA의 추출은 2002년 실험포장에서 모본 및 F<sub>2</sub> 집단에서 선발한 119개체에서 어린잎을 채취하여 CTAB 방법으로 추출하였다. 채취한 어린잎 2~3장을 막자사발에 넣고 -270℃의 액화질소를 적당히 부어 급속 냉동시킨 다음 미세한 가루로 만들어 15ml Polypropylene tube에 200~250mg을 넣고 5ml의 CTAB extraction buffer [ 1M Tris · HCl(pH8.5), 1% Alkyltrimethyl ammonium (CTAB), 5M NaCl, 0.5M EDTA, 1% β-mercaptoethanol ]를 넣어준 후 60℃로 유지되는 항온수조에 1시간 정도 담귀서 shaking 시켰다. 항온수조에서 꺼낸 뒤 상온에서 30분정도 식힌 후 5ml의 Chloroform : Octanol(24:1)을 넣어 20분 정도 상온에서 shaking 해준다. 원심분리기에 넣어 3200rpm으로 25분 동안 원심분리 시켰다. 세 층으로 분리된 액의 상층액을 피펫으로 조심스럽게 새로운 5ml Polypropylene tube에 깨끗이 옮겨담고 차가운 Isopropyl alcohol을 0.8~1.0 volume 정도를 넣어 DNA의 침전을 확인하였다. 피펫을 이용해서 침전된 DNA를 새로운 Micro tube에 옮겨 담는다. 1ml의 76% ETOH · 0.2M NaOAc 에 20분 동안, 76% ETOH · 10mM NH<sub>4</sub>OAc 에 1분 동안 세척시켰다. 마지막으로 70% ETOH로 1분 동안 세척하고 원심분리기를 이용해서 pellet상태로 침전시켜서 상층액을 버리고 상온에서 건조시켰다. 완전히 건조시킨 DNA에 TE[10mM

Tris-HCl(pH7.5) · 1mM EDTA]를 적당량 넣어서 처리한 후 4℃에 Stock DNA를 보관하였다.

Genomic DNA의 유무를 확인하기 위해서 Agarose gel에 정량을 하였다. 먼저 새로운 tube에 증류수 6 $\mu$ l와 각 sample에서 Stock DNA 1 $\mu$ l를 뽑아서 담고 Sample buffer [ 0.25% (W/V) Bromo phenol blue, 0.25% (W/V) Xylene cyanol FF, 15% (W/V) Ficoll ] 3 $\mu$ l를 혼합하였다. 0.5X TBE buffer에 만든 1.0% Agarose gel에 그 혼합액을 분주해서 100V에 30분정도 전기영동 시킨 후 EtBr(Ethidium Bromide, 70 $\mu$ l/l)에 20분정도 염색시키고 증류수에 세척해서 Image Analyzer System을 이용해 Genomic DNA유무를 판별하였다. 실험에 들어가기 전에 Stock DNA를 적정한 양으로 희석시키기 위해서 UV-vis Spectrophotometer를 이용하여 Stock DNA의 농도를 측정해서 25ng/ $\mu$ l으로 TE용액을 넣어서 희석시켰다.

#### 라. SSR 마커 선발

콩에서 핑크 화색을 지배하는 *wp* 유전자는 안토시아닌 합성경로에 영향을 미치는 것으로 알려져 있어(Hegstad et al., 2000) 안토시아닌 함량을 결정하는 유전자와 연관된 마커를 탐색하기 위하여 일차적으로 *wp* 유전자와 연관된 것으로 알려진 SSR 마커를 선발하였다. *wp* 유전자는 현재 Soybean의 연관지도 D1b+W에 위치해 있어 이 연관군에 위치해 있는 SSR 마커 27개를 선발하였다. 선발된 27개의 SSR 마커에 대한 마커명, 연관군, 염기서열은 Table 1과 같다.

#### 마. PCR

PCR 총 반응액 10 $\mu$ l는 Genomic template DNA 2 $\mu$ l(25ng/ $\mu$ l), Primer 2 $\mu$ l(2uM/ $\mu$ l), 5 unit Taq polymerase(Fisher Biotechnology), dNTP[ 25mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM Tris(pH8.5), 2.5mM dATP, 2.5mM dTTP, 2.5mM dCTP, 2.5mM dGTP ], 5X reaction buffer [250mM Tris(pH 8.5), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 2.5mg/ml BSA, 12.5% Ficoll 400, 1%(W/V) Xylene cyanol ]를 혼합하였다. 10 $\mu$ l의 반응액을 PCR tube (96wells MJ Research, INC)에 분주하고 수분 증발을 방지하기 위해 10 $\mu$ l의 Mineral oil (Sigma)을 분주하였다. PCR 반응은 thermo-cycler (MJ Research PCT-200)을 사용하였다. 이중 가닥의 DNA가 한 가닥의 DNA로 되는 Denaturation 단계에서 94℃ 45sec, 한 가닥의 DNA에 primer가 결합하는 annealing단계는 47℃ 45 sec, 상보가닥이 합성되는 extention단계에서 68℃ 45sec를 한 cycle로 해서 2<sup>39</sup> cycle을 증폭하였다. 증폭된 용액은 4℃ 상태로 보관 후 6% acrylamide gel에 전기영동해서 silver staining을 실시하였다.

#### 바. Gel Electrophoresis and Silver staining

DNA sequencing plate set(35cm×45cm, Owl separation Sequencing system)의 inner plate와 out plate를 먼저 깨끗하게 세척해서 상온에 말렸다. 70% ethanol에 3~4회 정도 kimwipes tissue로 깨끗하게 inner plate와 out plate를 처리하였다. 처리된 inner plate에는 binding solution [ 1ml 100% ethanol absolute, 10 $\mu$ l bind silane, 5 $\mu$ l acetic acid ]을 이용해서 표면에 처리하고 충분히 말린 후 다시 표면에 70% ethanol을 처리해 주었다. out plate는 Repel-silane Es 1ml을 pre-warming하여 표면에 처리하고 마지막으로 ddH<sub>2</sub>O를 이용해서 처리하였다. 상온에서 plate set를 충분히 말린 후 4mm spacer를 plate 사이에 넣고 sealing tape를 이용해서 tapping 처리를 하였다. 6% acrylamide gel solution [ 18ml 40% acrylamide, 12ml 10x TBE buffer, 50.4g Urea, 48ml ddH<sub>2</sub>O, 25 $\mu$ l TEMED, 0.025g ammonium persulfate ]을 gel plate에 부어서 상온에서 2시간 가량 geld을 굳혔다. 완전히 굳혀진 gel은 1800 Voltage, 30mA에 30분정도 Pre-warming시켰다. SSR PCR products 6 $\mu$ l를 3X loading dye [ 10mM NaOH 4.9%, Formamide 95%, Bromophenol 0.05%, Xylene cyanol FF 0.05% ] 3 $\mu$ l와 혼합한 후 100°C에 5분 정도 끓인 후 ice에 급속히 냉각시켰다. Pre-warming된 gel의 tooth comb에 proucts의 6 $\mu$ l를 분주하여 전기영동을 실시하였다. loading condition은 1X TBE buffer에 1800 Voltage, 30mA, 2시간 동안 loading처리를 하였다. loading된 DNA sequencing gel로부터 out plate를 분리한 후 Binding된 inner plate의 gel을 fix/stop solution(10% Acetic acid)에 20분간 fix 처리시켰다. fix 처리된 gel을 ddH<sub>2</sub>O에 2분씩 3회 세척하였다. 그리고 Silver staining solution [ 2 l ddH<sub>2</sub>O, 3g silver nitrate, 3ml 37% formaldehyde]에 30분 동안 염색을 처리한 후 ddH<sub>2</sub>O에 대략 10초 정도 세척시켰다. 세척된 gel을 Developer solution [ 2 l ddH<sub>2</sub>O, 60g sodium carbonate, 3ml 37% formaldehyde, 400 $\mu$ l thiosulfate ]에 넣어서 band가 선명하게 보일 때까지 Developer시켰다. Developer가 끝난 후 즉시 fix/stop solution(10% Acetic acid)에 넣어서 5분정도 fix시킨다. 마지막으로 ddH<sub>2</sub>O에 3분정도 세척시킨후 상온에서 gel을 충분히 말려주었다. 건조된 inner plate는 암실 조건의 형광판 위에 놓고 APC(Automatic Processor Compatible) film을 gel위에 놓고 gel 상태에 따라서 대략 40~50초 정도로 형광불빛을 처리하였다. 처리한 APC film을 Developer solution (Kodak developer)에 담귀서 band가 선명하게 나타날 때까지 현상한 후에 ddH<sub>2</sub>O에 세척시켰다. Kodak rapid fixer solution에 5분간 고정 시킨후 마지막으로 ddH<sub>2</sub>O에 세척하였다. 세척이 끝난 필름은 상온에서 완전하게 말려서 band를 확인해서 data로 사용하였다.

#### 사. Linkage Map Construction

선발한 SSR 마커를 이용하여 먼저 양 모본간 polymorphism을 탐색하였고 양 모본에서 다형성을 보이는 마커는 F<sub>2</sub> 세대에서 마커 분리비가 탐색되었다. Interval mapping을 위하여 얻어진 data는 MAPMAKER /EXP v. 3.0b를 사용하여 유전자 지도를 작성하였다. LOD (logarithm of odds ratio) 4.0, maximum recombination distance 50 cM으로 grouping 하였고 'Compare' command를 사용하여 group내에서 마커들의 순서가 결정되어졌다. 유전적 거리는 mapping function을 사용하여 centimorgans (cM)로 지도 간격을 표시하였으며 'Ripple' command로 순서를 검증하였다.

#### 아. 연관 마커 탐색

임의로 선발된 119개의 F<sub>2</sub>개체를 수확한 후 검정 종피색을 가진 63개의 개체로부터 화색 및 개체별 안토시아닌 함량, 마커의 분리비 data를 이용하여 안토시아닌 함량과 연관된 마커를 탐색하였다. Single Factor analysis은 SAS program(proc glm)을 이용하였고 Interval mapping은 MAPMAKER/QTL을 이용하였다.

Table 1. Name, linkage group, and sequence of SSR markers selected to detect parental polymorphism

Marker	Group		Sequence
Sat_069	D1b+W	Forward	CGACCAGCTGAAGAAA
		Reverse	CTGAATACCCATCATTACTTAA
Sat_089	D1b+W	Forward	AATTTTTTCTGTTGTCAGTGT
		Reverse	TGGAAATGTTAAATGTATGG
Sat_135	D1b+W	Forward	GCGCCTCGCCTATATTAATTACAAAA
		Reverse	GCCTCCGCCTCCGAAATACACTTA
Satt005	D1b+W	Forward	TATCCTAGAGAAGAACTAAAAAA
		Reverse	GTCGATTAGGCTTGAAATA
Satt041	D1b+W	Forward	TGTTGTGTGGCTTTATTATT
		Reverse	TTAAGGTGGGATATGGTC
Satt141	D1b+W	Forward	CGGTGGTGGTGTGCATAATAA
		Reverse	CCGTCATAAAAAGTCCCTCAGAAT
Satt157	D1b+W	Forward	GGGCTCACTCTCGATAGTAGGTATAAAG
		Reverse	GGGATACCAAAAAGGAATAATTGTCTT
Satt172	D1b+W	Forward	AGCCTCCGGTATCACAG
		Reverse	CCTCCTTTCTCCCATTTT
Satt189	D1b+W	Forward	CCATACGCAGCATTAGAG
		Reverse	GCTATTTGCATGTTGAGAA
Satt216	D1b+W	Forward	TACCCTTAATCACCGGACAA
		Reverse	AGGGAACAAACACATTTAATCATCA
Satt266	D1b+W	Forward	GCGAAACTCTACGGGTCAGTAGTTAT
		Reverse	GCGTAAGATGGCCTAGAAAAGAGGATG
Satt271	D1b+W	Forward	GTTGCAGTTGTGCGTGGGAGAGAG
		Reverse	GCGACATAGCTAATTAAGTAAGTT
Satt282	D1b+W	Forward	TGCGGGACAATTTTAGATTTAT
		Reverse	AGATGGATGAAAGTTGGAGAAAAG
Satt290	D1b+W	Forward	GCGGATTTATAAAAACATTA AAAATCA
		Reverse	GCGCGCACGGCTGAAACACTCTCTCA
Satt296	D1b+W	Forward	GCCCCACAACCAGAAACAC
		Reverse	GAAATTTGGCGACTAAAAACTGC
Satt350	D1b+W	Forward	GCGGGAGTTTTAAAATATGCTTTTG
		Reverse	GGCTTAGGCTTTGTGTCTGGAAGT



Marker	Group		Sequence
Satt412	D1b+W	Forward	CGACCAGCTGAAGAAA
		Reverse	TTCCTTTTAATTCTAACATTGAG
Satt428	D1b+W	Forward	AATTTTTTCTGTTGTCAGTGT
		Reverse	GCGGACCAGCTAGTTTTTAATGTG
Satt459	D1b+W	Reverse	AACTGCATACCCTTTGTTTGAA
		Reverse	GCCTCCGCCTCCGAAATACACTTA
Satt506	D1b+W	Forward	GCGAATTGGCATAACATAGTACC
		Reverse	GCGTGAATTGCGCTAAGTTTAT
Satt537	D1b+W	Forward	GCGTGTACATCAAAATGGTGTATTC
		Reverse	GCGGGAGGAACCTTTGTCTCAGTAA
Satt542	D1b+W	Forward	CACCAGCACAGAACAATCATTT
		Reverse	CACGGTCTAACCTTTCTCTTA
Satt546	D1b+W	Forward	TGAGCGATCAAGAAGCACTTA
		Reverse	TTTGGATCGCATAAACACTTTA
Satt558	D1b+W	Forward	CTCACACCCTTTCATTATCTA
		Reverse	AAATCGCGCATCTAAATTTAC
Satt579	D1b+W	Forward	GCGATTGGTTATTCTGATTAAAT
		Reverse	GCGGTTACGAAAATCGTAAATTGATG
Satt600	D1b+W	Forward	GCGCAGGAAAAAAAAACGCTTTTATT
		Reverse	GCGCAATCCACTAGGTGTTAAT
Satt604	D1b+W	Forward	GTGGCTCACAATCAACGTGAGCATCAGA
		Reverse	CTGTGCCACTTATGATTTGGTAA

### III. 연구 수행내용

#### (시험 1) 검정콩 증식 유전자원의 안토시아닌 분석

1. 시험재료 : 검정콩 육성품종 및 유전자원

2. 시험방법

##### 가. 최적 분석조건 확립시험

1) 추출용매의 특성 비교 :

추출 용 매					
1%염산- 물	1%염산- 20%메탄올	1%염산- 40%메탄올	1%염산- 60%메탄올	1%염산- 80%메탄올	1%염산- 메탄올

2) 추출방법의 비교 :

추출 방법				
상온추출 (25℃, 72h),	저온추출 (4℃, 72h)	가온추출 (60℃, 72h)	환류추출 (80℃, 3h),	초음파추출 (25℃, 3h)

3) 최적 추출용매를 이용한 상온 추출시 추출시간별 용출 특성 비교 :

- 추출시간 : 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96시간

4) HPLC 이동상 및 컬럼의 분리도 비교 :

이동상의 구성 H <sub>2</sub> O : MeOH : Formic acid	컬럼 종류 (cm)
80 : 15 : 5	μ-Bondapak C18
	Nova-pak C18(15)
75 : 20 : 5	μ-Bondapak C18
	Nova-pak C18(15)
	ODS-120T(30)
	ODS-120T(15)
70 : 25 : 5	ODS-120T(30)
	ODS-120T(15)
65 : 30 : 5	ODS-120T(15)

5) 조사항목 : 색도, 흡광도, 안토시아닌 함량, 이론단수 및 Retention time

#### 나. 검정콩 유전자원의 안토시아닌 함량 분석

- 1) 추출 : 1%염산-20%메탄올 용액, 상온 48 시간추출
- 2) 여과 : Toyo 5B 및 0.45 $\mu$ m membrane filter
- 3) 색도 분석 : hunter L. a. b. 분석
- 4) 색소함량 : 역상 HPLC분석 (530nm, ODS-120T)
- 5) 조사항목 : 안토시아닌 함량 및 색도

### 3. 시험결과

#### 가. 최적 분석조건 확립시험

표 1. 추출용매별 검정콩 종피 함유 안토시아닌의 함량 및 흡광 특성 비교

품종	추출용매	흡광도 (@ 530nm)	Hunter value (D65/2°)			안토시아닌 (mg/g)
			L	a	b	
검정콩 1호	1% HCl-H <sub>2</sub> O	0.119	83.56	11.30	2.91	3.99 a†
	1% HCl-20%MeOH	0.151	82.19	14.23	2.58	4.25 a
	1% HCl-40%MeOH	0.159	81.34	14.82	1.96	3.82 a
	1% HCl-60%MeOH	0.190	80.01	17.61	1.16	4.01 a
	1% HCl-80%MeOH	0.168	83.00	15.97	0.22	3.38 ab
	1% HCl-MeOH	0.229	78.67	21.78	-2.33	2.44 b
일품검정콩	1% HCl-H <sub>2</sub> O	0.230	80.21	20.80	3.57	7.33 a
	1% HCl-20%MeOH	0.292	76.39	25.67	2.29	7.61 a
	1% HCl-40%MeOH	0.315	76.45	28.09	0.13	7.55 a
	1% HCl-60%MeOH	0.370	70.43	32.14	-1.76	7.72 a
	1% HCl-80%MeOH	0.343	73.17	31.39	-4.20	6.76 a
	1% HCl-MeOH	0.443	69.09	38.42	-6.06	4.80 b

† Means followed by different letters are significantly different at 5% level of probability by DMRT.

표 2. 추출방법별 검정콩 종피 함유 안토시아닌의 함량 및 흡광 특성 비교

품종	추출방법	흡광도 (@ 530nm)	Hunter value (D65/2°)			안토시아닌 (mg/g)
			L	a	b	
검정콩 1호	상온(25℃, 72hrs.)	0.143	82.19	14.23	2.58	4.25 a†
	저온(4℃, 72hrs.)	0.133	82.53	13.63	1.81	4.08 a
	가온(60℃, 72hrs.)	0.058	83.93	2.69	7.91	0.76 d
	환류(80℃, 3hrs.)	0.125	83.40	10.79	4.27	2.40 c
	초음파(25℃, 3hrs.)	0.126	84.85	12.60	2.27	3.38 b
일품검정콩	상온(25℃, 72hrs.)	0.292	76.42	25.67	2.29	7.61 a
	저온(4℃, 72hrs.)	0.237	77.51	21.66	1.46	6.82 b
	가온(60℃, 72hrs.)	0.082	83.46	3.93	9.46	0.65 d
	환류(80℃, 3hrs.)	0.245	78.23	20.36	4.22	3.70 c
	초음파(25℃, 3hrs.)	0.336	75.56	29.10	2.65	6.15 b

† Means followed by different letters are significantly different at 5% level of probability by DMRT.

표 3. 1% 염산-20%메탄올 이용 상온추출 시간별 안토시아닌 함량 및 흡광특성

품종	추출시간	흡광도 (@ 530nm)	Hunter value (D65/2°)			안토시아닌 (mg/g)
			L	a	b	
검정콩 1호	3 hr	0.105	82.28	10.34	1.53	3.40 b†
	6 hr	0.130	83.95	12.62	2.00	3.98 a
	12 hr	0.150	85.35	14.23	2.58	4.08 a
	24 hr	0.144	82.51	13.65	2.45	4.04 a
	48 hr	0.158	80.70	14.91	2.54	4.11 a
	72 hr	0.152	84.89	14.42	2.51	4.10 a
	96 hr	0.144	83.23	13.69	2.22	4.07 a
일품검정콩	3 hr	0.227	76.40	20.79	1.63	6.38 d
	6 hr	0.283	74.74	25.11	1.97	7.85 a
	12 hr	0.301	72.69	26.20	2.25	8.06 a
	24 hr	0.298	71.17	26.11	2.16	7.80 ab
	48 hr	0.293	74.67	25.96	2.28	7.79 ab
	72 hr	0.266	73.69	24.81	2.22	7.45 bc
	96 hr	0.264	71.37	24.53	2.11	7.11 c

† Means followed by different letters are significantly different at 5% level of probability by DMRT.

표 4. HPLC 이동상 및 컬럼의 종류별 안토시아닌의 분리양상 비교

1) H<sub>2</sub>O : MeOH : Formic acid

2) +++++: excellent, +++: good, +: bad

이동상 <sup>1)</sup>	컬럼(cm)	Peak Rt.(0.7ml/min.)			분리 특성	적합도 <sup>2)</sup>
		D3G	C3G	Pt3G		
80 : 15 : 5	μ-Bondapak C18	11.68	13.84	18.22	Rt 지연, 분리불량	+++
	Nova-pak C18(15)	7.82	11.54	16.56	이론단수 불량	+++
75 : 20 : 5	μ-Bondapak C18	8.84	10.10	12.19	분리 불량	+++
	Nova-pak C18(15)	4.44	6.04	7.46	분리 양호	++++
	ODS-120T(30)	12.00	16.52	20.38	Rt.지연	+++
	<b>ODS-120T(15)</b>	<b>6.79</b>	<b>9.58</b>	<b>12.29</b>	<b>분리 양호</b>	<b>+++++</b>
70 : 25 : 5	ODS-120T(30)	8.76	11.22	12.65	분리 양호	++++
	ODS-120T(15)	6.12	7.95	9.21	분리 양호	++++
65 : 30 : 5	ODS-120T(15)	4.34	5.13	6.88	분리 불량	+++

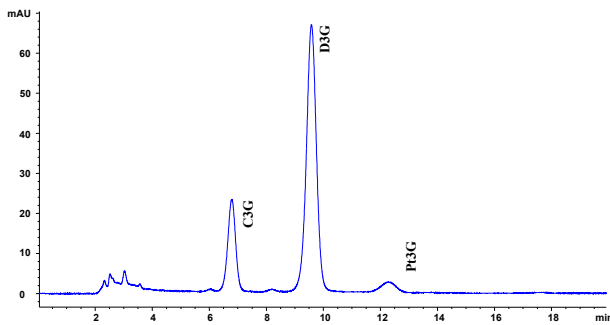


그림 1. HPLC 최적 분석조건(컬럼 - ODS-120T(15), 이동상 - 75 : 20 : 5 = H<sub>2</sub>O : MeOH : Formic acid) 에서의 안토시아닌 분리 chromatogram

#### 나. 검정콩 유전자원의 안토시아닌 함량 분석

표 5. 안토시아닌 함량, 흡광도 및 색도의 상관 분석

	흡광도	밝기(L)	적색도(a)	황색도(b)	안토시아닌 함량
흡광도	1.00	-0.917**	0.993**	0.929**	0.994**
밝 기		1.00	-0.918**	-0.828**	-0.909**
적색도			1.00	0.895**	0.983**
황색도				1.00	0.946**
안토시아닌 함량					1.00

(n= 198, α=0.05 r=0.13662, α=0.01 r=0.17919)

표 6. 김정콩 유전자원 중 고 안토시아닌 및 특이 조성 계통

구 분	계통수	Source (IT No.)
종피 1g당 안토시아닌 15mg이상	19	186084, 178374, 178739, KLG10686, KLG10681 178751, KLG10680, KLG10702, 177417, 186058 KLG10701, 177360, KLG10727, 180852, 180856 177295, 177321, 180141, 180220
C3G 단독 함유	8	171140, 175950, 183899, 183908, 183928, 177283 177379, 177383

표 7. 검정콩 유전자원 200계통의 안토시아닌 함량 및 색도 분석

No.	Source	OD @ 530nm	Hunter's value			Anthocyanin(mg/1g, seed coat)			
			L	a	b	D3G	C3G	Pt3G	Total
1	170989	0.33	77.03	28.39	3.09	2.50	8.09	0.34	10.93
2	170991	0.03	91.66	2.88	1.23	0.56	0.56	0.00	1.12
3	171016	0.38	72.95	31.97	3.36	2.62	8.51	0.88	12.01
4	171044	0.01	88.01	0.78	0.37	0.46	0.23	0.00	0.68
5	171044-1	0.04	89.36	4.11	1.36	0.46	0.95	0.00	1.40
6	171117	0.01	88.63	0.95	0.64	0.44	0.27	0.00	0.71
7	171138	0.01	91.81	0.63	0.38	0.48	0.24	0.00	0.72
8	171139	0.06	87.08	5.89	1.48	0.80	1.05	0.16	2.01
9	171140	0.01	93.40	0.64	0.39	0.00	0.27	0.00	0.27
10	175855	0.37	74.71	31.14	3.81	2.08	10.32	0.51	12.91
11	175950	0.18	85.19	16.70	2.62	0.00	6.28	0.00	6.28
12	175950-1	0.15	84.43	14.41	1.14	1.75	2.63	0.40	4.78
13	175993	0.11	88.05	10.86	1.03	1.53	1.75	0.06	3.35
14	176012-1	0.05	90.59	5.05	0.57	0.71	1.45	0.00	2.16
15	178368	0.28	79.98	25.53	2.40	2.11	6.99	0.60	9.70
16	178374	0.44	73.79	35.39	4.57	2.71	11.67	0.78	15.17
17	178375	0.11	87.83	10.82	0.69	1.32	1.88	0.36	3.55
18	178376	0.41	74.19	33.61	4.36	2.17	11.63	0.64	14.44
19	178513	0.22	82.68	21.10	1.87	1.23	6.04	0.23	7.50
20	178609	0.24	81.70	22.31	2.32	1.54	6.37	0.45	8.36
21	178695	0.28	78.60	25.44	2.40	2.21	7.03	0.35	9.59
22	178701	0.22	81.60	21.15	1.63	1.87	5.23	0.29	7.39
23	178703	0.23	81.40	21.60	1.65	2.01	5.34	0.64	7.99
24	178705	0.36	76.93	30.95	2.91	3.00	7.96	0.95	11.90
25	178707	0.18	83.70	17.60	1.40	2.22	3.26	0.48	5.95
26	178708	0.23	83.25	21.73	1.73	2.08	5.46	0.30	7.85
27	178710	0.33	76.39	28.63	3.33	1.79	9.29	0.57	11.65
28	178711	0.35	74.78	29.79	3.48	2.74	8.81	0.26	11.81
29	178712	0.21	82.12	19.67	1.53	1.62	5.12	0.32	7.06
30	178716	0.17	82.17	16.54	1.14	1.73	3.27	0.52	5.52
31	178739	0.44	74.51	35.32	4.78	2.25	12.29	0.63	15.17
32	178740	0.21	80.90	19.59	1.53	2.46	3.66	0.46	6.57
33	178751	0.44	72.44	35.50	4.79	2.44	12.16	0.84	15.43
34	179942	0.18	82.81	17.32	1.64	1.21	4.08	0.50	5.79
35	180080	0.32	77.56	27.69	3.04	1.88	8.18	0.29	10.35
36	180082	0.25	82.69	22.71	2.22	1.73	6.22	0.24	8.20
37	180084	0.45	73.01	35.56	4.85	2.89	11.07	0.29	14.25
38	180086	0.28	79.76	25.20	2.88	1.69	7.61	0.14	9.44
39	180102	0.28	81.40	25.18	2.59	2.50	6.06	0.14	8.71
40	180108	0.24	81.10	22.40	1.78	1.57	5.62	0.63	7.82
41	180141	0.62	68.10	44.63	6.14	5.94	11.84	0.63	18.41
42	180205	0.44	72.98	35.60	3.73	3.94	8.93	1.00	13.87
43	180220	0.57	70.66	49.14	6.79	3.71	14.80	0.30	18.81
44	180253	0.30	80.42	26.29	2.66	2.18	7.11	0.10	9.39



#### 4. 결과 요약

가. 추출 용매별 검정콩 종피 안토시아닌의 함량을 비교한 결과 1%염산 함유물 ~ 1%염산 함유 80%메탄올은 추출용매간에 통계적 차이가 인정되지 않았고, 단지 1%염산 함유 메탄올만이 차이가 인정되어 가장 낮은 함량을 나타내었으며, 1%염산 함유 20%메탄올이 검정콩 안토시아닌의 추출의 최적 용매로 평가되었다.

나. 1%염산 함유 20%메탄올을 추출용매로 하고 상온, 저온, 가온, 환류 및 초음파 추출로 추출방법을 달리하였을 때 검정콩 종피 안토시아닌의 함량을 비교한 결과 상온 추출이 가장 높은 안토시아닌의 함량을 나타내었고, 가온조건이 가장 낮은 함량을 나타내었다.

다. 1%염산 함유 20%메탄올을 추출용매로 하여 상온에서 추출하였을 때 최적의 추출시간을 검토한 결과 6시간 이후부터 48시간까지는 추출되는 안토시아닌의 함량이 통계적 차이를 나타내지 않았지만 12시간 추출이 가장 합당한 것으로 평가되었다.

라. 검정콩 종피 함유 안토시아닌의 정성·정량적 분석을 위한 HPLC 분석조건을 검토한 결과 이동상 용매 중 증류수의 비율이 높을수록 retention time이 지연되거나 분리도가 떨어지고, 메탄올의 비율이 높아지면 이론단수가 낮아져 분리가 불량해지는 양상을 나타내었으며, 컬럼의 길이는 30cm 보다 짧은 길이인 15cm의 컬럼이 분석에 소요되는 시간을 줄여주는 양상을 나타내었다. 결국 검정콩 종피 함유 안토시아닌의 정성·정량적 분석을 위한 최적 HPLC 분석조건은 ODS- 120T(15cm)컬럼을 이용하고 이동상은 H<sub>2</sub>O : MeOH : Formic acid를 75 : 20 : 5의 부피비로 혼합한 조건이 가장 우수한 분리양상을 나타내었다.

마. 검정콩 유전자원 200계통의 안토시아닌 함량을 검토한 결과 0.27~18.81mg/g의 함량 범위를 나타내었고, 평균적으로 8.13±4.41mg의 함량적 특성을 나타내었다. 한편 안토시아닌의 함량, 흡광도 및 색도간의 상관을 검토한 결과 모든 특성들이 서로간에 고도의 유의상관을 나타내는 것으로

조사되었다.

바. 검정콩 유전자원 중 고 안토시아닌 및 특이조성 계통을 검토한 결과 IT186084 등 19계통이 종피 1g당 15mg이상의 안토시아닌을 함유하였고, IT171140 등 8계통은 함유 안토시아닌 중 C3G만을 함유하는 특이적 조성을 나타내었다.

## (시험 2) 콩 종실 안토시아닌 함량 결정 유전자 연관 마커 탐색

### I. 서 언

콩 (*Glycine max* L. Merr)의 원산지는 우리나라를 포함한 중국 일대로 알려져 있으며, 인류에 의해 재배되어져 온 가장 오래된 식량작물중의 하나이다. 콩에는 약 40%의 단백질과 20%의 지방이 함유되어져 있을 뿐 아니라, 각종 비타민, 무기질, 기능성 영양 물질등을 풍부하게 함유하고 있다. 현재까지 우리나라의 콩 육종의 목표는 안전 다수확과 고품질의 콩 생산을 위한 내병충성 육종에 중점을 두었다. 그러나 콩 자체의 기능성 성분인 필수지방산, 칼륨, 섬유질, 레시틴, 아이소플라본, 사포닌, 안토시아닌 등이 타 작물에 비해 많이 함유되어있고, 생리활성 효과가 알려짐으로서 기능성 성분의 함량이 높은 품종 육성이 요구되고 있다.

최근 가장 두각되고 있는 검정콩의 생리활성물질인 안토시아닌은 항산화 효과가 크다는 연구결과(Kwon et al., 1998)가 있었고 시력개선의 효과와 노화 억제, 항균 등의 효과가 있다는 연구결과도 보고되어지고 있다. 유전·육종에서의 안토시아닌의 연구는 미비한 실정이지만 국내·외에서 보고되어지는 연구결과로는 몇 가지 유전자원의 탐색을 통한 안토시아닌 함량을 분석한 연구결과가 있다(Yoshida et al., 1996).

본 연구는 검정콩에 함유되어 있는 안토시아닌의 함량이 높은 품종을 육성하기 위한 검정콩 유전자원을 선발하고 안토시아닌 pathway 연구에 연관된 분자 마커로 알려진 *wp* 유전자(Hegstad et al., 2000)가 포함된 콩 분자 유전자에 D1b+W(Cregan et al., 1999)의 분자 마커를 이용하여 안토시아닌 함량 결정 유전자와 연관된 마커를 탐색하고자 수행되었다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 고 안토시아닌 함유 콩 유전자원 선발

#### 가. 유전자원 수집 및 재배

고 안토시아닌 함유 유전자원을 선발하기 위해 검정콩 유전자원을 국가별로 수집하였다. 일본 64개, 미국 24개, 국내 33개로 총 111개의 검정콩 유전자원을 수집하여 포장에 파종한 후 수확된 종자를 이용하였다.

#### 나. 안토시아닌 함량 분석

수확된 111개의 유전자원을 이용하여 종피에서의 안토시아닌 함량 분석을 하였다. 종피를 벗긴 후 종피 0.1g을 정확히 평량하고 1%염산-20%메탄올 용액 30ml를 첨가한 후 상온에서 48 시간추출 하였고, 추출된 종피색소 용액은 Toyo 5B 및 0.45 $\mu$ m membrane filter로 여과한 후 역상 HPLC 조건에서 (530nm, ODS-120T, 75 : 20 : 5 = H<sub>2</sub>O : MeOH : Formic acid) 안토시아닌의 함량 및 조성을 분석하였다.

### 2. 안토시아닌 함량 연관마커 탐색

#### 가. 모본의 선발

안토시아닌 함량을 결정하는 유전자와 연관된 마커를 탐색하기 위하여 안토시아닌이 함유되어 있지 않는 노란 종피색 모본 IT182305(농촌진흥청 유전자원과로부터 분양)와 검정 종피색을 가진 재래종인 곡특을 이용하였다. IT182305는 화색이 백색이며 100립중은 4.7g으로 야생형과 재배종의 중간 형태를 보이며, 곡특은 화색이 자색이며 대립종이고 성숙 자엽이 녹색이다.

#### 나. 교배 및 유전 집단

2001년 4월에 두 모본을 온실에 파종하여 5월에 교배해서 7월에 F<sub>1</sub> seed를 수확하였다. 수확한 F<sub>1</sub> seed를 온실에 파종하여 F<sub>1</sub> plant의 질적 형질을 조사하여 잡종성을 검증하였다. 잡종성이 검증된 개체는 자가수정하여 2001년 11월에 F<sub>2</sub> seed를 획

득하였다. 수확된 F<sub>2</sub> seed는 모본과 함께 2002년 5월 24일 포장에 파종하여 F<sub>2</sub>집단을 전개하였다. 전체 270개체의 F<sub>2</sub> 중에서 임의로 119개체를 선발하여 연관마커 탐색에 이용하였다.

#### 다. Genomic DNA 추출

Genomic DNA의 추출은 2002년 실험포장에서 모본 및 F<sub>2</sub> 집단에서 선발한 119개체에서 어린잎을 채취하여 CTAB 방법으로 추출하였다. 채취한 어린잎 2~3장을 막자사발에 넣고 -270℃의 액화질소를 적당히 부어 급속 냉동시킨 다음 미세한 가루로 만들어 15ml Polypropylene tube에 200~250mg을 넣고 5ml의 CTAB extraction buffer [ 1M Tris·HCl(pH8.5), 1% Alkyltrimethyl ammonium (CTAB), 5M NaCl, 0.5M EDTA, 1% β-mercaptoethanol ]를 넣어준 후 60℃로 유지되는 항온수조에 1시간 정도 담궈서 shaking 시켰다. 항온수조에서 꺼낸 뒤 상온에서 30분정도 식힌 후 5ml의 Chloroform : Octanol(24:1)을 넣어 20분 정도 상온에서 shaking 해준다. 원심분리기에 넣어 3200rpm으로 25분 동안 원심분리 시켰다. 세 층으로 분리된 액의 상층액을 피펫으로 조심스럽게 새로운 5ml Polypropylene tube에 깨끗이 옮겨담고 차가운 Isopropyl alcohol을 0.8~1.0 volume 정도를 넣어 DNA의 침전을 확인하였다. 피펫을 이용해서 침전된 DNA를 새로운 Micro tube에 옮겨 담는다. 1ml의 76% ETOH·0.2M NaOAc 에 20분 동안, 76% ETOH·10mM NH<sub>4</sub>OAc 에 1분 동안 세척시켰다. 마지막으로 70% ETOH로 1분 동안 세척하고 원심분리기를 이용해서 pellet상태로 침전시켜서 상층액을 버리고 상온에서 건조시켰다. 완전히 건조시킨 DNA에 TE[10mM Tris-HCl(pH7.5)·1mM EDTA]를 적당량 넣어서 처리한 후 4℃에 Stock DNA를 보관하였다.

Genomic DNA의 유무를 확인하기 위해서 Agarose gel에 정량을 하였다. 먼저 새로운 tube에 증류수 6μl와 각 sample에서 Stock DNA 1μl를 뽑아서 담고 Sample buffer [ 0.25% (W/V) Bromo phenol blue, 0.25% (W/V) Xylene cyanol FF, 15% (W/V) Ficoll ] 3μl를 혼합하였다. 0.5X TBE buffer에 만든 1.0% Agarose gel에 그 혼합액을 분주해서 100V에 30분정도 전기영동 시킨 후 EtBr(Ethidium Bromide, 70μg/l)에 20분정도 염색시키고 증류수에 세척해서 Image Analyzer System을 이용해 Genomic DNA유무를 판별하였다. 실험에 들어가기 전에 Stock DNA를 적정한 양으로 희석시키기 위해서 UV-vis Spectrophotometer를 이용하여 Stock DNA의 농도를 측정해서 25ng/μl으로 TE용액을 넣어서 희석시켰다.

#### 라. SSR 마커 선발

콩에서 핑크 화색을 지배하는 *wp* 유전자는 안토시아닌 합성경로에 영향을 미치는 것으로 알려져 있어(Hegstad et al., 2000) 안토시아닌 함량을 결정하는 유전자와 연관된 마커를 탐색하기 위하여 일차적으로 *wp* 유전자와 연관된 것으로 알려진 SSR 마커를 선발하였다. *wp* 유전자는 현재 Soybean의 연관지도 D1b+W에 위치해 있어 이 연관군에 위치해 있는 SSR 마커 27개를 선발하였다. 선발된 27개의 SSR 마커에 대한 마커명, 연관군, 염기서열은 Table 1과 같다.

#### 마. PCR

PCR 총 반응액 10 $\mu$ l는 Genomic template DNA 2 $\mu$ l(25ng/ $\mu$ l), Primer 2 $\mu$ l(2uM/ $\mu$ l), 5 unit Taq polymerase(Fisher Biotechnology), dNTP[ 25mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM Tris(pH8.5), 2.5mM dATP, 2.5mM dTTP, 2.5mM dCTP, 2.5mM dGTP ], 5X reaction buffer [250mM Tris(pH 8.5), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 2.5mg/ml BSA, 12.5% Ficoll 400, 1%(W/V) Xylene cyanol ]를 혼합하였다. 10 $\mu$ l의 반응액을 PCR tube (96wells MJ Research, INC)에 분주하고 수분 증발을 방지하기 위해 10 $\mu$ l의 Mineral oil (Sigma)을 분주하였다. PCR 반응은 thermo-cycler (MJ Research PCT-200)을 사용하였다. 이중 가닥의 DNA가 한 가닥의 DNA로 되는 Denaturation 단계에서 94 $^{\circ}$ C 45sec, 한 가닥의 DNA에 primer가 결합하는 annealing단계는 47 $^{\circ}$ C 45 sec, 상보가닥이 합성되는 extention단계에서 68 $^{\circ}$ C 45sec를 한 cycle로 해서 2<sup>39</sup> cycle을 증폭하였다. 증폭된 용액은 4 $^{\circ}$ C 상태로 보관 후 6% acrylamide gel에 전기영동해서 silver staining을 실시하였다.

#### 바. Gel Electrophoresis and Silver staining

DNA sequencing plate set(35cm $\times$ 45cm, Owl separation Sequencing system)의 inner plate와 out plate를 먼저 깨끗하게 세척해서 상온에 말렸다. 70% ethanol에 3~4회 정도 kimwipes tissue로 깨끗하게 inner plate와 out plate를 처리하였다. 처리된 inner plate에는 binding solution [ 1ml 100% ethanol absolute, 10 $\mu$ l bind silane, 5 $\mu$ l acetic acid ]을 이용해서 표면에 처리하고 충분히 말린 후 다시 표면에 70% ethanol을 처리해 주었다. out plate는 Repel-silane Es 1ml을 pre-warming하여 표면에 처리하고 마지막으로 ddH<sub>2</sub>O를 이용해서 처리하였다. 상온에서 plate set를 충분히 말린 후 4mm spacer를 plate 사이에 넣고 sealing tape를 이용해서 tapping 처리를 하였다. 6% acrylamide gel solution [ 18ml 40% acrylamide, 12ml 10x TBE buffer, 50.4g Urea, 48ml ddH<sub>2</sub>O, 25 $\mu$ l TEMED, 0.025g ammonium persulfate ]을 gel plate에 부어서 상온에서 2시간 가량 geld을 굳혔다. 완전히 굳혀진 gel은 1800 Voltage, 30mA에

30분정도 Pre-warming시켰다. SSR PCR products 6 $\mu$ l를 3X loading dye [ 10mM NaOH 4.9%, Formamide 95%, Bromophenol 0.05%, Xylene cyanol FF 0.05% ] 3 $\mu$ l와 혼합한 후 100 $^{\circ}$ C에 5분 정도 끓인 후 ice에 급속히 냉각시켰다. Pre-warming된 gel의 tooth comb에 products의 6 $\mu$ l를 분주하여 전기영동을 실시하였다. loading condition은 1X TBE buffer에 1800 Voltage, 30mA, 2시간 동안 loading처리를 하였다. loading된 DNA sequencing gel로부터 out plate를 분리한 후 Binding된 inner plate의 gel을 fix/stop solution(10% Acetic acid)에 20분간 fix 처리시켰다. fix 처리된 gel을 ddH<sub>2</sub>O에 2분씩 3회 세척하였다. 그리고 Silver staining solution [ 2 $l$  ddH<sub>2</sub>O, 3g silver nitrate, 3ml 37% formaldehyde]에 30분 동안 염색을 처리한 후 ddH<sub>2</sub>O에 대략 10초 정도 세척시켰다. 세척된 gel을 Developer solution [ 2 $l$  ddH<sub>2</sub>O, 60g sodium carbonate, 3ml 37% formaldehyde, 400 $\mu$ l thiosulfate ]에 넣어서 band가 선명하게 보일 때까지 Developer시켰다. Developer가 끝난 후 즉시 fix/stop solution(10% Acetic acid)에 넣어서 5분정도 fix시킨다. 마지막으로 ddH<sub>2</sub>O에 3분정도 세척시킨후 상온에서 gel을 충분히 말려주었다. 건조된 inner plate는 암실 조건의 형광판 위에 놓고 APC(Automatic Processor Compatible) film을 gel위에 놓고 gel 상태에 따라서 대략 40~50초 정도로 형광불빛을 처리하였다. 처리한 APC film을 Developer solution (Kodak developer)에 담귀서 band가 선명하게 나타날 때까지 현상한 후에 ddH<sub>2</sub>O에 세척시켰다. Kodak rapid fixer solution에 5분간 고정 시킨후 마지막으로 ddH<sub>2</sub>O에 세척하였다. 세척이 끝난 필름은 상온에서 완전하게 말려서 band를 확인해서 data로 사용하였다.

#### 사. Linkage Map Construction

선발한 SSR 마커를 이용하여 먼저 양 모본간 polymorphism을 탐색하였고 양 모본에서 다형성을 보이는 마커는 F<sub>2</sub> 세대에서 마커 분리비가 탐색되었다. Interval mapping을 위하여 얻어진 data는 MAPMAKER /EXP v. 3.0b를 사용하여 유전자 지도를 작성하였다. LOD (logarithm of odds ratio) 4.0, maximum recombination distance 50 cM으로 grouping 하였고 'Compare' command를 사용하여 group내에서 마커들의 순서가 결정되어졌다. 유전적 거리는 mapping function을 사용하여 centimorgans (cM)로 지도 간격을 표시하였으며 'Ripple' command로 순서를 검증하였다.

#### 아. 연관 마커 탐색

임의로 선발된 119개의 F<sub>2</sub>개체를 수확한 후 검정 종피색을 가진 63개의 개체로부터 화색 및 개체별 안토시아닌 함량, 마커의 분리비 data를 이용하여 안토시아닌 함

량과 연관된 마커를 탐색하였다. Single Factor analysis은 SAS program(proc glm)을 이용하였고 Interval mapping은 MAPMAKER/QTL을 이용하였다.



Table 1. Name, linkage group, and sequence of SSR markers selected to detect parental polymorphism

Marker	Group		Sequence
Sat_069	D1b+W	Forward	CGACCAGCTGAAGAAA
		Reverse	CTGAATACCCATCATTACTTAA
Sat_089	D1b+W	Forward	AATTTTTCTGTGTGTCAGTGT
		Reverse	TGGAAATGTTAAATGTATGG
Sat_135	D1b+W	Forward	GCGCCTCGCCTATATTAAATTACAAAA
		Reverse	GCCTCCGCCTCCGAAATACACTTA
Satt005	D1b+W	Forward	TATCCTAGAGAAGAACTAAAAAA
		Reverse	GTCGATTAGGCTTGAAATA
Satt041	D1b+W	Forward	TGTTGTGTGGCTTTATTATT
		Reverse	TTAAGGTGGGATATGGTC
Satt141	D1b+W	Forward	CGGTGGTGGTGTGCATAATAA
		Reverse	CCGTCATAAAAAGTCCCTCAGAAT
Satt157	D1b+W	Forward	GGGCTCACTCTCGATAGTAGGTATAAAG
		Reverse	GGGATACCAAAAAGGAATAATTGTCTT
Satt172	D1b+W	Forward	AGCCTCCGGTATCACAG
		Reverse	CCTCCTTCTCCCATTTT
Satt189	D1b+W	Forward	CCATACGCAGCATTAGAG
		Reverse	GCTATTTGCATGTTGAGAA
Satt216	D1b+W	Forward	TACCCTTAATCACCGGACAA
		Reverse	AGGGAACAAACACATTTAATCATCA
Satt266	D1b+W	Forward	GCGAAACTCTACGGGTCAGTAGTTAT
		Reverse	GCGTAAGATGGCCTAGAAAAGAGGATG
Satt271	D1b+W	Forward	GTTGCAGTTGTGCGTGGGAGAGAG
		Reverse	GCGACATAGCTAATTAAGTAAGTT
Satt282	D1b+W	Forward	TGCGGGACAATTTTAGATTTAT
		Reverse	AGATGGATGAAAGTTGGAGAAAAG
Satt290	D1b+W	Forward	GCGGATTTATAAAAACATTA AAAATCA
		Reverse	GCGCGCACGGCTGAAACACTCTCTCA
Satt296	D1b+W	Forward	GCCCCACAACCAGAAACAC
		Reverse	GAAATTTGGCGACTAAAAACTGC
Satt350	D1b+W	Forward	GCGGGAGTTTTAAAATATGCTTTTG
		Reverse	GGCTTAGGCTTTGTGTCTGGAAGT

Marker	Group		Sequence
Satt412	D1b+W	Forward	CGACCAGCTGAAGAAA
		Reverse	TTCCTTTTAATTCTAACATTGAG
Satt428	D1b+W	Forward	AATTTTTTCTGTTGTCAGTGT
		Reverse	GCGGACCAGCTAGTTTTTAATGTG
Satt459	D1b+W	Reverse	AACTGCATACCCTTTGTTTGAA
		Reverse	GCCTCCGCCTCCGAAATACACTTA
Satt506	D1b+W	Forward	GCGAATTGGCATAACATAGTACC
		Reverse	GCGTGAATTGCGCTAAGTTTAT
Satt537	D1b+W	Forward	GCGTGTACATCAAAATGGTGTATTC
		Reverse	GCGGGAGGAACCTTTGTCTCAGTAA
Satt542	D1b+W	Forward	CACCAGCACAGAACAATCATTTT
		Reverse	CACGGTCTAACCTTTCTTCTA
Satt546	D1b+W	Forward	TGAGCGATCAAGAAGCACTTA
		Reverse	TTTGGATCGCATAAACACTTTA
Satt558	D1b+W	Forward	CTCACACCCTTTCATTATCTA
		Reverse	AAATCGCGCATCTAAATTTAC
Satt579	D1b+W	Forward	GCGATTGGTTATTCTGATTAAAT
		Reverse	GCGGTTACGAAAATCGTAAATTGATG
Satt600	D1b+W	Forward	GCGCAGGAAAAAAAAACGCTTTTATT
		Reverse	GCGCAATCCACTAGGTGTTAAT
Satt604	D1b+W	Forward	GTGGCTCACAATCAACGTGAGCATCAGA
		Reverse	CTGTGCCACTTATGATTTGGTAA

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 고 안토시아닌 함유 대두 유전자원 선발

고 안토시아닌 유전자원을 선발하기 위해 111개의 검정콩 유전자원을 대상으로 안토시아닌 함량을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 유전자원에 따라 안토시아닌의 성분 중 D3G, C3G, Pt3G의 세 가지를 함유분석한 것부터 C3G

성분만 함유한 자원으로 분류되었다. 전체 함량은 0.58 mg/g 범위에서 16.65 mg/g의 범위로 다양하였다. 유전자원의 수집 지역별 Japan 유전자원의 평균은 6.88 mg/g이며, 미국과 국내는 각각 평균이 6.10 mg/g, 6.46 mg/g이었다. 수집지역별 안토시아닌 함량의 변이는 비슷하였다.

현재 국내에서 약리적인 효능으로 인해 가장 많이 이용되고 있는 약콩의 안토시아닌 함량이 5.23 mg/g이었다.. 이 약콩을 기준으로 안토시아닌 함량이 10 mg/g이상인 것을 고 안토시아닌 함량 유전자원으로 선발하였다. 10 mg/g 이상인 Japan980외 17개 유전자원을 선발하였고, 15 mg/g이상인 GS04외 3개의 유전자원을 선발하였다. 전체 20개의 유전자원을 고 안토시아닌 함유 유전자원으로 선발하였다. 선발된 유전자원 및 안토시아닌 함량은 Table 2과 같다.

Table 2. Anthocyanin content in seed coat of 111 black soybean germplasms used in this study

Genotype	D3G <sup>a)</sup>	C3G	Pt3G	Total(mg/1g)
Japan 766	0.73	6.25	0.20	7.17
Japan 777	0.97	12.67	0.18	13.81
Japan 795	0.00	11.59	0.00	11.59
Japan 809	1.47	4.08	0.60	6.15
Japan 814	0.58	1.30	0.16	2.04
Japan 816	1.05	1.46	0.19	2.70
Japan 840	1.06	2.75	0.40	4.21
Japan 849	0.75	2.00	0.34	3.09
Japan 852	1.02	1.42	0.00	2.44
Japan 853	0.59	0.91	0.00	1.50
Japan 869	1.26	4.51	0.50	6.26
Japan 879	0.88	2.37	0.11	3.37
Japan 886	0.74	1.92	0.16	2.82
Japan 902	0.89	1.45	0.34	2.68
Japan 912	0.58	1.20	0.23	2.01
Japan 933	1.03	2.61	1.32	4.96
Japan 964	1.59	13.12	0.41	15.13
Japan 970	1.29	4.49	0.32	6.11
Japan 972	2.49	13.42	0.42	16.33
Japan 973	1.94	7.85	0.96	10.74
Japan 980	2.01	11.55	0.82	14.38
Japan 997	2.52	4.95	0.64	8.11
Japan 1006	0.86	6.97	0.57	8.39
Japan 1011	1.79	11.27	0.72	13.79
Japan 1012	2.31	6.60	0.79	9.70
Japan 1014	1.23	3.56	0.22	5.01
Japan 1021	0.67	3.52	1.14	5.33
Japan 1031	1.54	4.57	0.38	6.48
Japan 1036	1.55	4.15	0.64	6.34
Japan 1055	1.42	3.66	0.26	5.34
PI 232991	0.67	1.36	0.14	2.17
PI 437662	0.19	2.76	0.54	3.48
PI 438073	0.28	1.97	0.36	2.61
PI 438312	0.47	2.34	0.56	3.38

a) D3G : delphinidin-3-glucoside, C3G : cyanidin-3-glucoside  
Pt3G : petunidin-3-glucoside

Genotype	D3G <sup>a)</sup>	C3G	Pt3G	Total(mg/1g)
Japan 063	2.21	5.73	0.41	8.35
Japan 080	1.59	7.70	0.97	10.26
Japan 117	0.00	1.99	0.00	1.99
Japan 210	0.00	1.72	0.00	1.72
Japan 221	0.86	1.46	0.14	2.45
Japan 258	0.78	1.57	0.29	2.63
Japan 263	0.28	1.49	0.19	1.96
Japan 295	1.30	2.18	0.30	3.79
Japan 340	0.80	6.32	0.26	7.38
Japan 351	0.47	4.00	0.82	5.28
Japan 374	1.92	6.38	0.98	9.28
Japan 416	2.52	9.82	0.40	12.74
Japan 417	2.67	10.21	0.37	13.24
Japan 442	0.69	1.59	0.26	2.55
Japan 498	0.00	6.32	0.00	6.32
Japan 499	0.00	11.83	0.00	11.83
Japan 502	0.00	10.78	0.00	10.78
Japan 523	0.30	7.84	0.49	8.63
Japan 559	1.33	4.54	0.57	6.44
Japan 569	0.22	6.86	0.34	7.43
Japan 588	1.29	1.70	0.55	3.54
Japan 609	0.76	4.84	0.19	5.79
Japan 610	0.14	0.44	0.00	0.58
Japan 611	0.00	4.36	0.00	4.36
Japan 629	0.71	7.29	0.35	8.36
Japan 645	1.73	10.34	0.83	12.91
Japan 646	1.80	8.61	0.84	11.24
Japan 701	0.74	3.37	0.32	4.42
Japan 702	0.64	9.14	0.15	9.93
Japan 726	0.00	12.01	0.00	12.01
Japan 729	0.37	5.52	0.20	6.09
Japan 732	0.76	7.29	0.25	8.30
Japan 745	0.82	5.59	0.21	6.62
Japan 747	0.64	2.08	0.25	2.97

- a) D3G : delphinidin-3-glucoside  
C3G : cyanidin-3-glucoside  
Pt3G : petunidin-3-glucoside

Tabel 2. Continued

Genotype	D3G <sup>a)</sup>	C3G	Pt3G	Total(mg/1g)
PI 506800B	2.08	9.42	0.41	11.90
PI 79648	0.99	1.49	0.33	2.82
PI 84751	0.00	9.77	0.00	9.77
W46	0.00	2.94	0.00	2.94
W47	0.00	6.39	0.00	6.39
W48	0.00	5.17	0.00	5.17
W66	0.00	3.26	0.00	3.26
C153	1.62	6.06	0.88	8.56
C155	1.66	6.00	0.82	8.47
C156	2.08	6.58	1.09	9.75
C205	0.00	8.44	0.00	8.44
C221	1.44	4.07	0.74	6.26
C259	1.42	4.91	0.74	7.06
C292	1.60	5.86	0.73	8.19
T16	0.00	2.81	0.00	2.81
T102	0.84	7.03	1.52	9.39
T152	0.00	5.84	0.00	5.84
T221	0.00	7.84	0.00	7.84
T272H	1.70	3.52	0.59	5.81
T309	1.42	2.48	0.20	4.10
99M06	1.60	13.92	0.65	16.17
99M15	1.24	9.08	0.40	10.72
99M28	0.80	1.86	0.19	2.85
99M33	0.37	3.24	0.26	3.87
99M35	0.55	1.17	0.14	1.86
99M40	1.21	10.46	0.39	12.06
99M73	0.78	2.46	0.22	3.46
99M74	1.16	2.33	0.32	3.81
99M110	1.22	7.93	0.32	9.47
99M116	0.86	8.01	0.31	9.18
20M128	1.63	3.26	0.36	5.26
20M129	1.55	2.83	0.31	4.68
GS04	2.08	14.08	0.50	16.65
GS05	0.81	6.87	0.24	7.92

<sup>a)</sup> D3G: delphinidin-3-glucoside,  
C3G: cyanidin-3-glucoside  
Pt3G : petunidin-3-glucoside

Tabel 2. Continued

Genotype	D3G <sup>a)</sup>	C3G	Pt3G	Total(mg/1g)
GS06	0.00	4.92	0.00	4.92
GS10	1.17	2.61	0.35	4.13
GS11	0.54	1.90	0.20	2.64
GS13	1.14	7.47	0.37	8.97
GS15	0.86	8.28	0.33	9.47
GS129	0.00	4.34	0.00	4.34
곡특	1.20	4.02	0.25	5.47
심흑피	0.60	2.47	1.33	4.40
약콩	1.06	2.76	1.41	5.23

<sup>a)</sup> D3G : delphinidin-3-glucoside

C3G : cyanidin-3-glucoside

Pt3G : petunidin-3-glucoside



Table 3. Selection of high anthocyanin content genotype from 111 lack soybean genotypes used

<b>Genotype</b>	<b>D3G<sup>a)</sup></b>	<b>C3G</b>	<b>Pt3G</b>	<b>Total(mg/1g)</b>
Japan 080	1.59	7.70	0.97	10.26
Japan 416	2.52	9.82	0.40	12.74
Japan 417	2.67	10.21	0.37	13.24
Japan 499	0.00	11.83	0.00	11.83
Japan 502	0.00	10.78	0.00	10.78
Japan 645	1.73	10.34	0.83	12.91
Japan 646	1.80	8.61	0.84	11.24
Japan 726	0.00	12.01	0.00	12.01
Japan 777	0.97	12.67	0.18	13.81
Japan 795	0.00	11.59	0.00	11.59
Japan 964	1.59	13.12	0.41	15.13
Japan 972	2.49	13.42	0.42	16.33
Japan 973	1.94	7.85	0.96	10.74
Japan 980	2.01	11.55	0.82	14.38
Japan 1011	1.79	11.27	0.72	13.79
99M06	1.60	13.92	0.65	16.17
99M15	1.24	9.08	0.40	10.72
99M40	1.21	10.46	0.39	12.06
PI 506800B	2.08	9.42	0.41	11.90
GS04	2.08	14.08	0.50	16.65

<sup>a)</sup> D3G : delphinidin-3-glucoside

C3G : cyanidin-3-glucoside

Pt3G : petunidin-3-glucoside

Yoshida et al.(1996)의 26개의 두류 유전자원을 이용한 안토시아닌 함량을 조사결과 *Glycine soja*는 안토시아닌 함량이 대부분이 15.3-20.4 mg/g이었고 *Glycine max*는 4.1 mg/g으로 함량차이가 큰 연구결과가 있다. Chung et al.(2001)은 검정올콩, IT 180220 등 전체 10개의 검은콩 유전자원을 이용한 안토시아닌 함량 조사결과 1.58-20.18 mg/g 범위에 속하고 평균 9.217 mg/g이라는 결과를 보고하였다. 본 실험의 결과와 비교했을 때 Chung의 실험결과는 평균 6.48 mg/g인 본 실험결과 보다 높은 평균결과를 나타내었고 Yoshida (1996)의 실험결과는 본 실험보다 낮은 결과를 보였다.

본 실험에서 선발된 고 안토시아닌 유전자원은 농업적 형질평가와 더불어 교배 모본, 안토시아닌 함량 연구 또는 직접적인 고 안토시아닌 품종으로 이용될 예정이다.

## 2. 안토시아닌 함량 연관마커 탐색

### 가. F<sub>2</sub> 유전집단의 전개

콩 종실 안토시아닌 함량을 결정하는 유전자와 연관된 마커를 탐색하기 위하여 IT182305 (P<sub>1</sub>)와 곡특 (P<sub>2</sub>)의 교배로부터 전개된 270개체의 F<sub>2</sub> 집단을 포장에 전개하였다. 양모본 및 F<sub>1</sub> plant로부터 수확된 F<sub>2</sub> seed에 대한 종피색은 Figure 1과 같다. F<sub>2</sub> 개체간 많은 양적 형질에서 차이를 보였고 화색과 수확 후 안토시아닌 함량을 조사하였다. 조사된 모본 및 F<sub>2</sub> 집단에서의 화색은 Table 4와 같다.

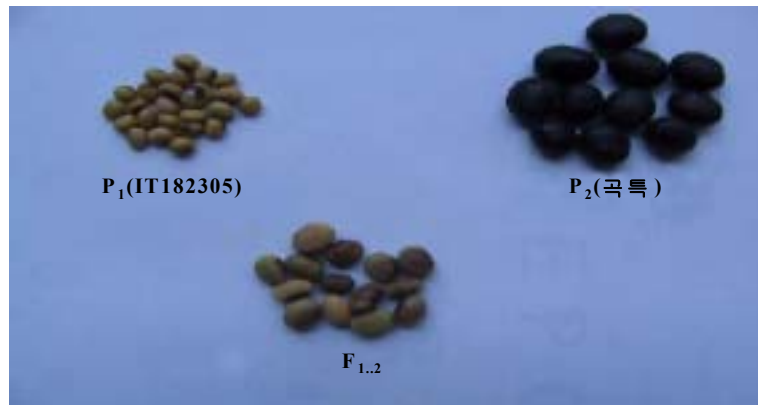


Fig. 1. Seed coat color of parents and F<sub>1.2</sub> seeds

Table 4. Segregation of flower color in IT 182305 (P<sub>1</sub>), Korean native cultivar Gokteuk (P<sub>2</sub>), and 119 F<sub>2</sub> individuals

Line	Flower color	Line	Flower color	Line	Flower color
P <sub>1</sub>	W	34	P	69	W
P <sub>2</sub>	P	35	P	70	P
F <sub>2</sub> - 1	P	36	P	71	W
2	P	37	W	72	W
3	P	38	P	73	W
4	P	39	P	74	P
5	W	40	P	75	P
6	P	41	P	76	P
7	P	42	P	77	W
8	P	43	P	78	W
9	W	44	P	79	P
10	W	45	W	80	W
11	W	46	W	81	P
12	W	47	W	82	P
13	P	48	P	83	P
14	P	49	P	84	P
15	P	50	P	85	W
16	P	51	P	86	P
17	P	52	P	87	P
18	P	53	P	88	P
19	P	54	P	89	W
20	W	55	W	90	P
21	P	56	P	91	P
22	P	57	P	92	W
23	P	58	P	93	P
24	P	59	P	94	P
25	P	60	P	95	P
26	P	61	P	96	P
27	P	62	W	97	W
28	P	63	P	98	W
29	W	64	P	99	W
30	P	65	P	100	P
31	P	66	P	101	P
32	P	67	P	102	P
33	P	68	P	103	P

W : white, P : purple

Table 4. Continued

Line	Flower color	Line	Flower color	Line	Flower color
104	P	110	W	116	P
105	P	111	W	117	P
106	P	112	W	118	W
107	P	113	P	119	P
108	P	114	W		
109	P	115	P		

W : white, P : purple

콩에서 화색을 결정짓는 loci는 *W1*, *W3*, *W4*, *Wm*, *Wp* 등 5가지로 상호작용하여 나타낸다고 알려져있다. 콩에서의 화색은 대부분이 purple(*W1*) 또는 white(*w1*)이다. 화색이 pink인 것은 dominant *W1*이 발현된 homozygous *wp* allele에 의한 결과이다. Clark isolines parents를 이용한 실험 중에서 화색이 pink인 LN89-5322-2 (*tW1w3W4Wmwp*)와 화색이 purple인 Clark 63 (*TW1w3W4WmWp*)를 교배해서 얻은 결과를 보면 F<sub>1</sub>에서는 모든 plant가 purple을 나타내었다. F<sub>2</sub> plant에서 pink 화색을 좌우하는 recessive allele에 의해서 purple과 pink가 3:1의 비율로 나타난 결과를 통해 화색이 분리되는 원인이 다른 화색 유전자와 연관된 것이 아니고 세포질에 의한 영향도 아닌 것을 확인하였다. 본 실험에서의 화색은 멘델의 유전법칙에 따라서 자색과 흰색으로 3:1로 분리되는 결과를 나타내었다.

콩에서 *wp* locus는 안토시아닌 pathway에 표현되어지고 단백질 함량과 상관관계가 있다고 밝혀져 있다(Stephens et al., 1993). *wp* allele과 관련된 분자 마커는 USDA MLG D1b+W(Cregan et al., 1999)에 위치해있다. 잠재적으로 안토시아닌 pathway 연구에 연관된 분자 마커로 알려진 *wp* 유전자가 도움이 될 것이라고 보고되어진다(Hegstad et al., 2000).

#### 나. 모본간 다형성을 보이는 SSR 마커 선발 및 F<sub>2</sub> 집단에서의 분리비 조사

콩의 화색에서 pink 색깔을 나타내는 *wp* allele은 안토시아닌 합성과 관련이 있는 것으로 알려져 *wp* 유전자가 위치해 있는 D1b+W 연관군에 있는

SSR 마커 27개를 선발하여(Table 1), 양 모본간 다형성을 탐색한 결과 10개의 SSR 마커에서 다형성이 탐색되었다. 탐색된 10개의 마커에 대한 Sequence는 Table 5와 같다.

Table 5. SSR markers with polymorphism between IT 182305 and Korean native cultivar Gokteuk parents from D1b+W linkage group

SSR markers		Sequence
Satt172	Forward	AGCCTCCGGTATCACAG
	Reverse	CCTCCTTTCTCCCATTTT
Satt189	Forward	CCATACGCAGCATTAGAG
	Reverse	GCTATTTGCATGTTGAGAA
Satt266	Forward	GCGAAACTCTACGGGTCAGTAGTTAT
	Reverse	GCGTAAGATGGCCTAGAAAGAGGATG
Satt290	Forward	GCGGATTTATAAAACATTA AAAATCA
	Reverse	GCGCGCACGGCTGAAACACTCTCTCA
Satt350	Forward	GCGGGAGTTTAAAATATGCTTTTG
	Reverse	GGCTTAGGCTTTGTGTCTGGAAGT
Satt459	Forward	TCGTGTTAGATTTTTACTGTCACATT
	Reverse	AACTGCATACCCTTTGTTTGAA
Satt506	Forward	GCGAATTGGCATACATAGTACC
	Reverse	GCGTGAATTCGCCTAAGTTTAT
Satt546	Forward	TGAGCGATCAAGAAGCACTTA
	Reverse	TTTGGATCGCATAAACACTTTA
Satt600	Forward	GCGCAGGAAAAAAAAACGCTTTTATT
	Reverse	GCGCAATCCACTAGGTGTTAAT
Satt604	Forward	GTGGCTCACAATCAACGTGAGCATCAGA
	Reverse	CTGTGCCACTTATGATTTGGTAA

Hegstad et al.(2002)는 콩의 핑크 화색을 지배하는 *wp* 유전자의 Soybean Genome Map에서의 위치에 대한 연구결과를 발표하였다. 본 실험의 결과와 비교를 하면 선발된 10개의 마커 중 6개의 마커가 일치하였다.

양 모본에서 다형성을 보이는 10개의 SSR 마커를 이용하여 F<sub>2</sub> 집단에서 개체별로 마커의 분리비를 조사하였다. Figure 2는 Satt 189, 266, 506 마커의 F<sub>2</sub> 집단에서의 분리양상을 나타낸 그림이며, 119개의 F<sub>2</sub> 개체별 10개의 SSR 마커 분리 data은 Table 6과 같다.

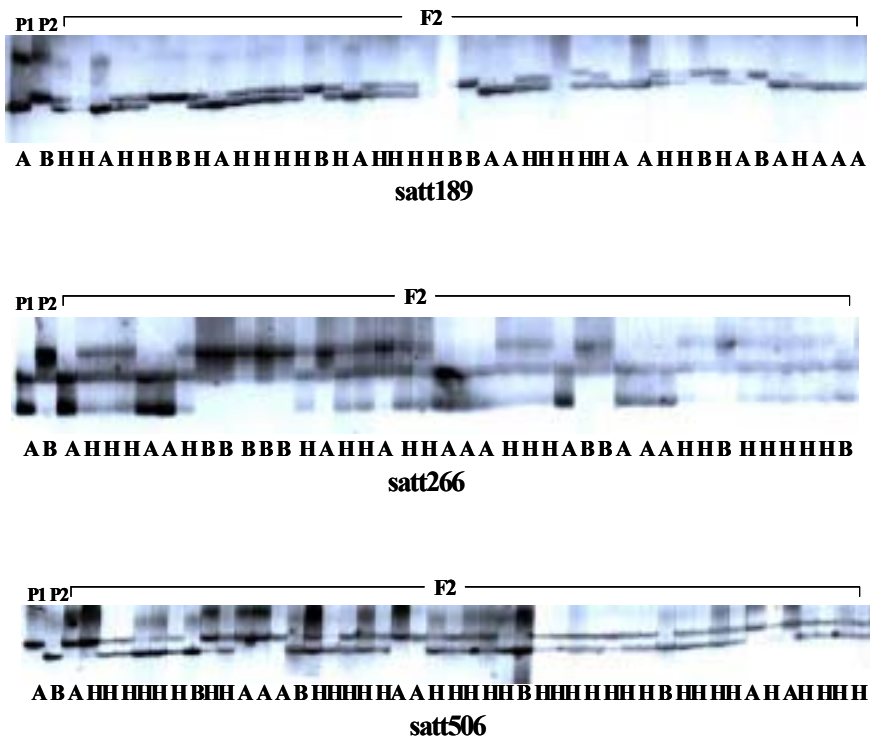


Figure. 2. Patterns of segregating DNA fragment for Satt189, 266 and 506 markers in F<sub>2</sub> population. P<sub>1</sub> is IT182305 and P<sub>2</sub> is Korean native cultivar Gokteuk. A is P<sub>1</sub> allele and B is P<sub>2</sub> allele. H is heterozygous.



Table 6. SSR marker data segregated in 119 F<sub>2</sub> progenies derived from the mating of IT182305 (P<sub>1</sub>) and Korean native cultivar Gokteuk (P<sub>2</sub>) parents

Marker	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	119 F <sub>2</sub> individuals
*Satt172	A	B	HHAАНВВААВАННВННННННВВНААННАВАННННВВНАНАА АННААААААННННААВННААНВНВВННААННВААННВНВНН ННААННААНАНААНВННННННННАААНННВНННВНААА
*Satt189	A	B	ННААНВВНННННННВНННННННВААННААННААННВННВНААА АВНВАНАААНННННВННННННННВННННААННННННААННАА АНННААНАААААВННННННННННВВВНАААНААВВНВВАВ
*Satt266	A	B	АНАНВНВВНАНАНАНВНННАНАВААВНВАННААНННННВВНАА АВНВНВНАНВННННВННННННВАННННВВНАААААНАННАН НВВВННННВААВВВНААНННННВННАВНАНННННВНВНАН
*Satt290	A	B	НННННВВННННННВНААННННВААВННННААННВННВААНА АВНВНННААНВНННВВННННННВНВННННАВАННААННААННАА ННВНААННААААВАААВННННВВВВАНАААНАНВВННВВАВ
*Satt350	A	B	ННААНВВНННННННВНААНННВВААНННННААВВВНННАНАА АВНВНННААВНННВВННННВАННВННННВНААННННААННАА АННВААНАААААВААННННННВВВНАААААНААВННВНАН
*Satt428	A	B	ННААНВВНННННННВНННННННВААВНВННААНВВННВННАА АНВВНННАВВННННВНННННАВННННННВНААННННААНННН ННВВААННАААНВНААННННВВННААННААННННВННАВАВ
*Satt459	A	B	НААААНННААННННМВНАВВНННАААНВААНВНВВВННАА АННААННААНННАНАВНАНАВАНААВВВААННВНННААНВ ВАНААВАВННААННААНННААННННННААННАААННВНВВВ
*Satt506	A	B	НННННВВНННННННВНННННННВААНННННААННВВНВАНАА АВНВНННААННННВВНННННННВННННААНННННААННАА АНВВААНАААААНННННВНННВВВНААНННААНННВВАВ
*Satt546	A	B	ВНААНВВАННННННВНННННННВНАМАНННААНВВВВННААА ННВВААААННННННННННААААВНННВНААНННААААВАВ НВННААННАНААНННВВННННННННАНААННННННННННН
*Satt604	A	B	НННННВВНННННННВНННННННВААНННННННННННННННА АВНВНННААНННННВВННННААННВНННННННННННННАА АНВВААННННААНВННННВНННННННВННННННННВННННАВ

Table 7. Segregation of SSR marker data in the F<sub>2</sub> progenies

Marker	MLG	Hypothesis	Expected	Observed	$\chi^2$	P <sup>a)</sup>
Satt172	D1b+W	1 : 2 : 1	29.75 : 59.50 : 29.75	41 : 59 : 19	8.134	0.017
Satt189	D1b+W	1 : 2 : 1	29.75 : 59.50 : 29.75	33 : 67 : 19	5.179	0.075
Satt266	D1b+W	1 : 2 : 1	29.75 : 59.50 : 29.75	28 : 61 : 30	0.141	0.931
Satt290	D1b+W	1 : 2 : 1	29.75 : 59.50 : 29.75	31 : 62 : 26	0.629	0.729
Satt350	D1b+W	1 : 2 : 1	29.75 : 59.50 : 29.75	34 : 62 : 23	2.243	0.325
Satt428	D1b+W	1 : 2 : 1	29.75 : 59.50 : 29.75	23 : 72 : 24	5.268	0.072
Satt459	D1b+W	1 : 2 : 1	29.50 : 59.00 : 29.50	41 : 55 : 22	6.660	0.037
Satt506	D1b+W	1 : 2 : 1	29.75 : 59.50 : 29.75	27 : 71 : 21	5.049	0.080
Satt546	D1b+W	1 : 2 : 1	29.50 : 59.00 : 29.50	33 : 67 : 18	5.982	0.051
Satt604	D1b+W	1 : 2 : 1	29.75 : 59.50 : 29.75	12 : 91 : 16	33.61	<0.01

a) P (Chi-square <9.21, df=2) > 0.01

SSR 마커 분리 band는 codominant marker로서 A:H:B의 분리비가 1:2:1로 예상되었다. F<sub>2</sub> 집단에서 관측치는 Table 7과 같다. F<sub>2</sub> 집단에서 관측치는 Satt 604를 제외한 나머지 9개의 마커는 99% 유의수준에서 1:2:1의 비율을 따른다는 것을 알 수 있었다. 분리된 marker data는 연관군 작성과 안토시아닌 함량 유전자와 연관된 마커 탐색에 이용하였다.

#### 다. F<sub>2</sub> 개체별 종실 안토시아닌 함량 분석

SSR 마커 탐색에 이용된 모본 및 119 F<sub>2</sub> 개체별 안토시아닌 함량을 분석한 결과는 Table 8과 같다. 119개의 개체중 검정 종피색을 가진 개체는 63개였고, 안토시아닌 함량에서 양친의 범위를 벗어나는 transgressive segregation이 나타나는 것으로 관찰되었다.

콩의 linoleinic acid 함량에 대한 연구에서도 F<sub>2</sub> 개체 중에서 양모본의 linoleinic acid 함량의 범위를 벗어나는 transgressive segregation이 일어나는 연구결과가 있다.

Table 8. Anthocyanin content of IT 182305 (P<sub>1</sub>), Korean native cultivar Gokteuk(P<sub>2</sub>), and 119 F<sub>2</sub> individual seeds

Genotype	D3G <sup>a)</sup>	C3G	Pt3G	Total(mg/1g)
P <sub>1</sub>	0.00	0.00	0.00	0.00
P <sub>2</sub>	1.98	4.39	0.32	6.69
F <sub>2</sub> progeny 1	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.00	1.72	0.00	1.72
5	0.00	0.28	0.00	0.28
6	0.11	2.25	0.00	2.36
7	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.02	0.35	0.00	0.37
9	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00
11	0.02	6.15	0.00	6.17
12	0.02	9.11	0.00	9.12
13	0.02	0.19	0.00	0.21
14	0.23	8.90	0.11	9.23
15	0.00	0.27	0.00	0.27
16	0.00	0.00	0.00	0.00
17	0.00	0.00	0.00	0.00
18	0.36	13.03	0.27	13.67
19	0.00	0.44	0.00	0.44
20	0.00	8.17	0.00	8.17
21	0.40	11.25	0.23	11.88
22	0.00	0.00	0.00	0.00
23	0.00	9.02	0.00	9.02
24	0.00	0.00	0.00	0.00
25	0.00	0.27	0.00	0.27
26	0.00	0.00	0.00	0.00
27	0.00	0.00	0.00	0.00
28	0.00	0.21	0.00	0.21
29	0.00	0.00	0.00	0.00
30	0.00	0.00	0.00	0.00
31	0.00	0.00	0.00	0.00

Table 8. Continued

Genotype	D3G <sup>a)</sup>	C3G	Pt3G	Total(mg/1g)
32	0.00	0.00	0.00	0.00
33	0.00	0.58	0.00	0.58
34	0.00	0.00	0.00	0.00
35	0.00	1.29	0.00	1.29
36	0.00	0.69	0.00	0.69
37	0.00	0.00	0.00	0.00
38	0.00	0.00	0.00	0.00
39	0.00	0.00	0.00	0.00
40	0.00	0.00	0.00	0.00
41	0.00	0.00	0.00	0.00
42	0.00	0.00	0.00	0.00
43	1.01	4.55	0.32	5.88
44	0.00	0.00	0.00	0.00
45	0.00	6.79	0.00	6.79
46	0.00	0.00	0.00	0.00
47	0.00	0.37	0.00	0.37
48	0.00	11.13	0.00	11.13
49	0.00	0.20	0.00	0.20
50	0.00	0.71	0.00	0.71
51	0.00	0.00	0.00	0.00
52	0.08	0.73	0.00	0.81
53	0.00	0.00	0.00	0.00
54	0.00	0.64	0.00	0.64
55	0.00	0.00	0.00	0.00
56	0.66	8.24	0.42	9.32
57	0.00	1.17	0.00	1.17
58	0.00	0.00	0.00	0.00
59	0.00	0.00	0.00	0.00
60	0.00	0.00	0.00	0.00
61	0.65	5.39	0.39	6.43
62	0.00	0.20	0.00	0.20
63	0.38	8.41	0.19	8.98
64	0.00	0.00	0.00	0.00
65	0.00	0.32	0.00	0.32

Table 8. Continued

<b>Genotype</b>	<b>D3G<sup>a)</sup></b>	<b>C3G</b>	<b>Pt3G</b>	<b>Total(mg/1g)</b>
66	0.00	0.00	0.00	0.00
67	0.00	0.59	0.00	0.59
68	0.00	0.00	0.00	0.00
69	0.00	0.27	0.00	0.27
70	0.00	0.00	0.00	0.00
71	0.00	9.32	0.00	9.32
72	0.00	0.66	0.00	0.66
73	0.00	0.00	0.00	0.00
74	0.15	2.32	0.00	2.47
75	0.62	3.69	0.32	4.63
76	0.00	0.40	0.00	0.40
77	0.00	0.31	0.00	0.31
78	0.36	6.32	0.29	6.97
79	0.00	0.49	0.00	0.49
80	0.00	0.00	0.00	0.00
81	0.00	0.00	0.00	0.00
82	0.00	0.39	0.00	0.39
83	0.00	0.00	0.00	0.00
84	0.24	7.29	0.13	7.66
85	0.00	3.38	0.00	3.38
86	0.00	0.66	0.00	0.66
87	0.33	7.27	0.24	7.84
88	0.00	0.00	0.00	0.00
89	0.00	7.42	0.00	7.42
90	0.98	5.02	0.54	6.54
91	0.00	0.00	0.00	0.00
92	0.00	0.29	0.00	0.29
93	0.00	0.00	0.00	0.00
94	0.00	0.00	0.00	0.00
95	0.00	0.00	0.00	0.00
96	0.00	1.27	0.00	1.27
97	0.00	0.00	0.00	0.00
98	0.00	2.72	0.00	2.72
99	0.00	12.50	0.00	12.50

Table 8. Continued

Genotype	D3G <sup>a)</sup>	C3G	Pt3G	Total(mg/1g)
100	0.14	2.64	0.00	2.78
101	0.31	3.43	0.11	3.86
102	0.45	4.89	0.18	5.51
103	0.00	0.00	0.00	0.00
104	0.00	0.00	0.00	0.00
105	0.00	0.00	0.00	0.00
106	0.00	0.52	0.00	0.52
107	0.00	0.00	0.00	0.00
108	0.00	0.00	0.00	0.00
109	0.00	0.13	0.00	0.13
110	0.00	11.46	0.00	11.46
111	0.00	0.98	0.00	0.98
112	0.00	0.00	0.00	0.00
113	0.29	9.67	0.18	10.13
114	0.00	0.00	0.00	0.00
115	0.00	0.00	0.00	0.00
116	0.00	0.00	0.00	0.00
117	0.35	7.26	0.14	7.75
118	0.00	0.00	0.00	0.00
119	0.00	0.00	0.00	0.00

a) D3G : delphinidin-3-glucoside

C3G : cyanidin-3-glucoside

Pt3G : petunidin-3-glucoside

F<sub>2</sub> 집단의 안토시아닌 함량 빈도 분석결과는 Fig 3과 같다. 대부분의 개체가 0.00~0.20 mg/g 사이에 분포되어 있었고, 정규 분포(normal distribution)를 따르지 않았는데 이는 119개의 개체 중 안토시아닌이 있는 검정 종피색을 가진 개체는 63개였기 때문인 것으로 사료되었다. 따라서, 이러한 결과는 안토시아닌 함량 연구 및 연관마커 탐색에서 분리되는 개체 중 검정 종피색을 가진 다량의 개체를 먼저 선발해야 할 것으로 암시하였다.

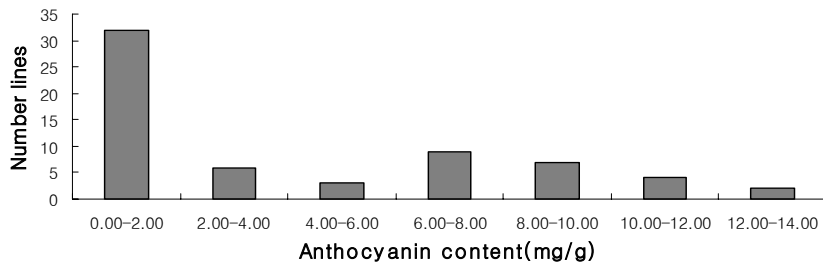


Fig. 3. Frequency distribution of the phenotypes for anthocyanin content in F<sub>2</sub> population

#### 라. 안토시아닌 함량 연관마커 탐색

얻어진 SSR 마커와 안토시아닌 함량과의 관계를 분석한 결과 (Single factor analysis)는 Table 9와 같다. Satt172 마커가 안토시아닌 함량을 결정하는 유전자와 연관된 것으로 탐색되었다.

Table 9. Single factor analysis between the marker locus and anthocyanin content

Marker	Linkage group	R <sup>2</sup>	F value	Pr>F
<b>Satt172</b>	<b>D1b+W</b>	<b>0.057551</b>	<b>3.54</b>	<b>0.0321</b>
Satt189	D1b+W	0.014902	0.88	0.4186
Satt266	D1b+W	0.0163	0.96	0.3855
Satt290	D1b+W	0.017773	1.05	0.3534
Satt350	D1b+W	0.031833	1.91	0.1527
Satt428	D1b+W	0.019222	1.14	0.3244
Satt459	D1b+W	0.059438	2.42	0.0695
Satt506	D1b+W	0.013252	0.78	0.4613
Satt546	D1b+W	0.010888	0.42	0.7376
Satt604	D1b+W	0.018081	1.07	0.3471

안토시아닌 함량에 대한 Interval mapping을 위하여, 10개의 SSR 마커를 이용하여 유전자지도를 작성한 결과는 그림 4와 같다. Integrated linkage map(Cregan et al., 1999)은 3개의 독립된 그룹(USDA/Iowa St.Univ, Univ. of Utah, Univ. of Nebraska)으로부터 데이터를 정리해서 만든 map이다. 3개의 그룹 모두에서 똑같은 마커를 포함하지는 않았고 그룹 사이의 마커간의 거리도 똑같지 않다.

*wp* gene이 위치한 Integrated linkage map(Cregan et al., 1999)의 D1b+W 과 본 실험에서 작성한 8개의 마커가 포함된 유전자지도를 비교하면 마커의 위치가 비슷한 순서로 존재하였고, 마커간 거리도 차이나는 것을 확인할 수 있었다.



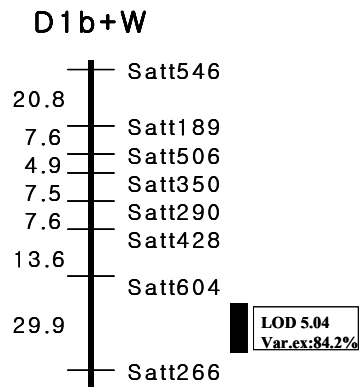


Fig. 4. Map location of the QTLs detected for anthocyanin content using Mapmaker-QTL

Mapmaker/QTL을 이용한 Interval mapping을 한 결과 Satt604와 Satt266 사이에서 안토시아닌 함량과 연관된 하나의 QTL을 탐색하였다. LOD 값이 5.04이고 Variance-explained는 84.2%로 탐색되었는데 Satt604와 Satt266마커는 Single factor analysis에서 안토시아닌 함량과 연관되지 않는 것으로 탐색되어, 현재 밝혀진 QTL에 대한 정확한 검정이 필요할 것으로 사료되었다.

#### IV. 적 요

검정콩의 종피에 있는 안토시아닌의 기능성 및 항산화 작용에 대한 효과가 입증되면서 안토시아닌의 함량이 증가된 기능성 검정콩의 육종이 요구되고 있다. 고 안토시아닌을 함유한 대두 유전자원을 선발하고 안토시아닌 함량과 연관된 마커를 탐색하기 위한 실험에서 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 전체 111개의 유전자원을 이용한 안토시아닌 함량 분석결과 10 mg/g 이상인 고 안토시아닌 함유 대두 유전자원 20개를 선발하였다.

2. 얻어진 10개 SSR마커를 이용한 안토시아닌 함량마커 탐색 결과 MLG D1b+W 에 위치한 Satt172 마커 하나를 선발하였다.

3. 안토시아닌 함량과 선발된 10개의 마커를 이용해서 QTL탐색결과 Satt604와 Satt266 마커 사이에서 하나의 QTL을 탐색할 수 있었다. LOD 값이 5.04이고 variance - explained는 84.2% 이다.

본 실험에서 선발된 고 안토시아닌 유전자원은 농업적 형질평가와 더불어 교배 모본, 안토시아닌 함량 연구 또는 직접적인 고 안토시아닌 품종으로 이용될 예정이고, 선발된 마커는 타 집단에 이용해서 마커를 검증하여 MAS(Marker-Assisted Selection)에 이용될 수 있을 것으로 보인다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### I. 목표 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	달성도 (%)
1차년도(2001)	○충분한 수의 유전자원계통 확보(100계통)	100
	○안토시아닌 분석	150
	○형질전환 예비 실험	100
	○안토시아닌 관련 유전자 library 확보 및 database 구축	150
2차년도(2002)	○ F1, F2 유전집단 확립	100
	○ 안토시아닌 분석	100
	○ 유전자 기능 확인	130
	○ RACE 기법을 이용한 full sequence 확보.	120
	○형질전환을 위한 vector 제작 및 형질전환.	120
3차년도(2003)	○유전 집단확보	100
	○형질전환 식물체 확보 및 분석	100
	○다양한 Northern 분석을 이용한 유전자 기능 확인	150
	○형질전환체 안토시아닌 분석	100
최종평가	○콩 형질전환 체계확립 및 형질전환 식물체 확보	100
	○신품종 육성을 위한 유전집단 개발	100
	○안토시아닌 관련 유전자의 data base 확립	100

## II. 관련분야에의 기여도

1. 콩 유전자원의 정밀한 분석과 분류로 육종에 필요한 기초자료제공
2. 건강 기능 성분에 대한 정보제공으로 항암 성분이 고농도로 포함된 건강 기능성 신 품종육종
3. 건강 기능성이 추가된 신품종의 재배 및 생산 확대
4. 영양 및 약용 기능을 가미한 식품 개발
5. 개발된 고효율의 형질전환 기술은 콩 뿐만 아니라, 형질전환이 어려운 유용 과채류 등 농작물과 산업적으로 가치가 높은 작물의 형질전환에 그 기술이 활용될 것이다.
6. 기능성 물질을 추출하여 상품화 할 경우, 전량을 수입에 의존하고 있는 현지점에서 고 부가가치 산업으로서의 전망을 가지고 있다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### I. 기술적 측면

1. 본 연구의 결과로 확보하게 될 콩 유전자원에 대한 체계적인 분류와 정보 및 유전자 database는 건강 기능성을 가진 콩 신품종을 육성하는데 매우 유용하게 쓰일 것이다.
2. 본 연구의 결과로 다양하고 종합적인 연구에 의한 콩의 유전자 클로닝 및 형질 전환 체계가 확립됨으로써, 기능성유전자에 대한 분자유전학, 생리생화학 및 생리유전학 등 생물 기초 연구분야 및 본 연구를 통하여 분자유전학과 유전학 혹은 유전학과 생리학 사이의 학문적 Gap을 제거 할 수 있는 교량역할을 함으로써, 기초 학문분야와 응용학문분야의 활성화에도 파급효과가 있을 것이다.
3. 콩에 대한 형질전환 체계가 확립됨으로써, 생명공학 기술을 도입한 콩 육성에 획기적인 기여를 하게 될 것이다.

### II. 경제 · 산업적 측면

1. 유용 유전자원의 확보로 국가 미래 농업의 안정적 위치 확보 및 국가 농업기반의 국제경쟁력 강화
2. 작물에 건강 기능성 개념 도입으로 국내농업의 국제적 차별화 유도
3. 기능성이 담긴 신품종개발로 농가소득향상 및 국민 건강 증진
4. 콩에서 농업적으로 유용한 유전자의 정밀한 분석과 분류로 육종에 필요한 기초자료 제공
5. 본 연구는 분자유전학, 생리유전학, 유전학, 식품영양학 및 형질전환에 대한 연구로써, 다양한 각 분야의 전문인력을 양성할 수 있는 효과가 있다.

### III. 활용방안

1. 콩 유전자원의 정밀한 분석과 분류로 육종에 필요한 기초자료제공
2. 건강 기능 성분에 대한 정보제공으로 항암 성분이 고농도로 포함된 건강 기능성 신 품종육종
3. 건강 기능성이 추가된 신품종의 재배 및 생산 확대
4. 영양 및 약용 기능을 가미한 식품 개발
5. 개발된 고효율의 형질전환 기술은 콩 뿐만 아니라, 형질전환이 어려운 유용 과채류 등 농작물과 산업적으로 가치가 높은 작물의 형질전환에 그 기술이 활용될 것이다.
6. 기능성 물질을 추출하여 상품화 할 경우, 전량을 수입에 의존하고 있는 현지점에서 고 부가가치 산업으로서의 전망을 가지고 있다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### I. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

1. 국내·외에서 기능성물질 관련 유전자의 기작에 대한 연구는 활발히 진행되고 있지만, 검정콩에서 기능성 물질인 안토시아닌 증가를 위한 연구는 시도되어진 바가 없다.

2. 검정콩의 안토시아닌은 포도나 다른 과일의 것보다 양적 질적인 면에서 극히 우수하나, 국제적으로 검정콩 안토시아닌에 대한 연구는 극히 미약하므로, 국내에서 안토시아닌에 대한 연구가 선행된다면, 국제적 경쟁력을 선 점할 수 있다.

3. 검정콩에서 형질전환을 이용하여 고 함량의 기능성 물질을 지닌 품종의 개발은 이루어진 적이 없다.

4. 현재 국내에서 콩 형질전환에 대한 연구는 전혀 이루어지고 있지 않음.

5. 형질전환체계의 확립을 위하여 품종들에 대한 조직배양적응성과 *Agrobacterium*의 감염여부에 대한 기초 스크린이 있어야 하는데 이와 같은 기초연구가 전무한 실정임

6. 미국에서는 이미 제초제 저항성 콩과 해충저항성 콩을 생산하여 품종화 하였으며, 최근에는 듀폰사에서 콩에 항암·항산화 성분이 보강된 건강 기능성 콩 품종을 육성하여 곧 시판할 예정임.

### II. 앞으로의 전망

본 연구는 콩에서 스트레스를 주었을 때 특이적으로 발현되는 유전자를 선

발하는 기초연구 뿐 아니라, 콩의 원산지인 만주 및 한반도 일대에 산재해 있는 수많은 야생종 및 재배종의 안토시아닌 함량 및 특성을 측정하여 isoflavonoid pathway를 지배하는 유전자의 유전학적 연구를 기반으로 실제 육종 프로그램에 응용 가능한 토대를 마련하며, 클로닝된 농업적으로 유용한 유전자를 형질전환 하고, 안토시아닌의 기능성 연구, 품종 및 가공에 따른 함량변화와 특성을 규명하는데 목적이 있기 때문에, 식물분자유전학 전공자, 작물육종학 전공자, 식품화학 전공자가 밀접하게 협력하는 연구 체제가 필요하다.

안토시아닌의 함량변이와 특성을 규명하여, 보다 체계적이며 전문적인 연구를 실시함으로써 장기적으로 콩의 건강기능성 및 내재해성 육종 모본을 만드는 토대를 마련할 수 있으며, 앞으로 선진국의 바이오텍 기술은 계속 향상될 것으로 예상되므로, 신기술의 개발과 더불어 바이오텍을 이용한 신품종 육성이 가속화 될 것으로 보이며, 신품종 육성의 방향도 고부가가치를 창출하기 위하여 기능성이 첨가된 품종 육성쪽으로 많은 연구가 집중될 것으로 전망된다.



## 제 7 장 참고문헌

Chung, M.G., Han, W.Y., Kang, S.T., Baek, I.Y., Shin, D.C., Kim, S.D., Kim, S.C., Moon, H.P., Kang, K.H. 2001. Isolation and Determination of Anthocyanins in Seed Coats of Black Soybean(*Glycine max*(L.) Merr.). J. Agri. Food Chem, 49: 5848~5851

Chung, M.G., Han, W.Y., Kang, S.T., Baek, I.Y., Shin, D.C., Kim, S.D., Kim, S.C., Moon, H.P., Kang, K.H. 2002. Structural Analysis of Anthocyanins in Black Soybean. Korea Soybean Digest, 19, 2: 68~77

Cregan, P.B., Jarvic, T., Bush, A.L., Shoemaker, R.C., Lark, K.G., Kahler, A.L., Kaya, N., Vantoai, T.T., Lohnes, D.G.M., Chung, J. and Specht, J.E. 1999a. An integrated genetic linkage map of the soybean genome. Crop Sci. 39: 1464~1490

Hegstad, J.M., Tarter, J.A., Vodkin, L.O., Nikell, C.D. 2000. Positioning the *wp* Flower Color Locus on the Soybean Genome Map. Crop Sci. 40: 534~537

Hegstad, J.M., Vodkin, L.O., Nikell, C.D. 2000. Genetic and Agronomic Evaluation of *wp-m* in Soybean. Crop Sci. 40: 346~351

Kwon, T.W., Song, Y.S., Kim, J.S., Moon, G.S., Kim, J.I., Hong, J.H. 1998. Current Research on the Bioactive Functions of Soyfoods in Korea. Korea Soybean Digest, 15, 2: 147~160

Stephens, P.A., Nikell, C.D. 1992. Inheritance of Pink Flower in Soybean. Crop Sci. 32: 1131~1132

Stephens, P.A., Vodkin, L.O., Nikell, C.D. 1993. Pink Flower Color Associated with Increased Protein and Seed Size in Soybean. Crop Sci. 33: 1135~1137

Yoshida, K., Sato, Y., Okuno, R., Kameda, K., Isobe, M., Kondo, T. 1996. Structural analysis and measurement of anthocyanin from colored seed coats of *Vigna*, *Phaseous*, and *Glycine* legumes. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60: 589~593

Dixon RA and Steele CL (1999) Flavonoids and isoflavonoids- a gold mine for metabolic engineering. Trends in Plant Sci. 4:394-400.

Kim SR and Kim SD (1996) Studies on soybean isoflavones. RDA J. Agri. Sci. 38:155-165.

Kim YH, Kim SD, Hong EH, and Ahn WS (1996) Physiological function of isoflavones and their genetic and environmental variations in soybean. Korean J. Crop Sci. 41(S) 25-45.

Herrmann A, Shulz W, Hahlbrock K (1998) Two alleles of the single-copy chalcone synthase gene in parsley differ by a transposon-like element. Mol. Gen. Genet. 212:95-98.

Feinbaum RL, Ausubel FM (1998) Transcriptional regulation of the Arabidopsis thaliana chalcone synthase gene. Mol. Cell Biol. 8:1985-1992.

Colliver SP, Morris P, and Robbins MP (1997) Differential modification of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis with an antisense chalcone synthase construct in transgenic Lotus corniculatus. Plant Mol. Biol. 35:509-522.

Oommen A, Dixon RA, and Paiva NL (1994) The elicitor-inducible alfalfa isoflavone reductase promoter confers different patterns of developmental expression in homologous and heterologous transgenic plants. Plant Cell 6:1789-1803.

B. Yan, M. S. Srinivasa Reddy, G. B. Collins, R. D. Dinkins. 2000. *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of soybean [*Glycine max*(L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants. Plant Cell Rep 19: 1090-1097

C. A. Meurer, R. D. Dinkins, G. B. Collins. 1998. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation. Plant Cell Rep 18: 180-186

E. R. Santarem, H. N. Trick, J. S. Essig, J. J. Finer. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. Plant Cell Rep 17: 752-759

Paula M. Olhoft, Lex E. Flagel, Christopher M. Donovan and David A. Somers.

2003. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta* 216: 723-735

P. M. Olhoft, K. Lin, J. Falbraith, N. C. Nielsen. 2001. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep* 20: 731-737

P. M. Olhoft, D. A. Somers. 2001. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep* 20: 706-711

Tae-Seok Ko, Sangman Lee, Sergei Krasnyanski, Schuyler S. Korban. 2003. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars : *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explant. *Theor Appl Genet* 107: 439-447

Tae-Seok Ko, Sangman Lee, Stephen K. Farrand, Schuyler S. Korban. 2004. A partially disarmed *vir* helper plasmid, pKYRT1, in conjunction with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid promotes emergence of regenerable transgenic somatic embryos from immature cotyledons of soybean. *Planta* 218: 536-541

Zhanyuan Zhang, Aiqiu Xing, Paul Staswick, Thomas E. Clemente. 1999. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 37-46

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.