



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월25일
(11) 등록번호 10-2160220
(24) 등록일자 2020년09월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) A01H 4/00 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01) C12N 5/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0025 (2013.01)
A01H 4/001 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0170916
(22) 출원일자 2018년12월27일
심사청구일자 2018년12월27일
(65) 공개번호 10-2020-0080927
(43) 공개일자 2020년07월07일
(56) 선행기술조사문헌
Hoori, F. et al., Pakistan Journal of
Biological Sciences (2007) 10(3):481-485*
Iantcheva, A. et al., In Vitro
Cell.Dev.Biol.-Plant (2014) 50:149-157*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
명지대학교 산학협력단
경기도 용인시 처인구 명지로 116 (남동, 명지대
학교)
(72) 발명자
문정환
경기도 수원시 장안구 화산로 85, 천천 푸르지오
130동 902호
김군보
경기도 수원시 영통구 매영로 366, 현대아파트
725동 1302호
(74) 대리인
임상엽, 권정기

전체 청구항 수 : 총 10 항

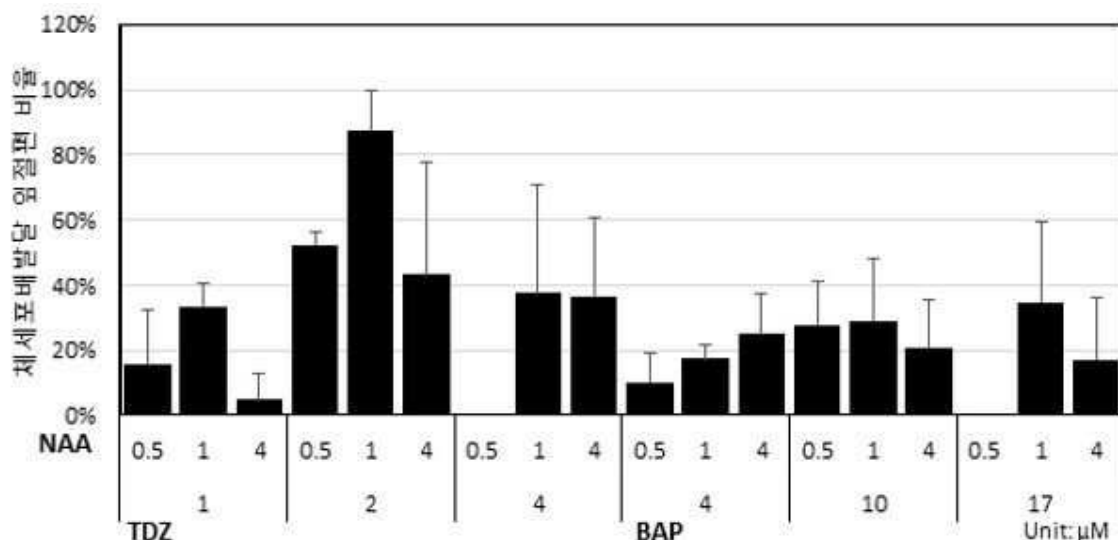
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 메디카고속 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 옥신(Auxin)으로 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA) 및 사이토키닌(Cytokinin)으로 티디아주론(Thidiazuron, TDZ)을 포함하는 메디카고속(Medicago) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 메디카고속 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물은 종래의 메디카고 트런카툴라 체세포배 발생용 배지와 비교할 때 새로운 호르몬의 조합을 포함하고, 그로 인해 약 10배 이상 향상된 체세포배 발생 효율을 가진다. 또한, 본 발명에 따른 메디카고속 식물의 형질전환 방법을 사용하면 종래의 방법으로는 형질전환이 매우 어려웠던 메디카고 트런카툴라 기준 유전형 A17을 안정적으로 형질전환시킬 수 있다. 따라서, 본 발명을 이용하면 메디카고 트런카툴라 기준 유전형 A17에 대한 유전체 기반의 유전자 기능 연구 및 유전자 조작이 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/8205 (2013.01)

C12N 15/8261 (2013.01)

C12N 15/8271 (2013.01)

C12N 5/04 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ01225101
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	신진연구자지원
연구과제명	유전체 및 유전자 교정 기술을 이용한 콩과 작물 생산성 향상 기술 개발
기여율	1/1
과제수행기관명	명지대학교
연구기간	2016.03.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

메디카고 트란카툴라(*Medicago truncatula*) 식물체의 외식편(Explant)을 형질전환 유전자가 도입된 아그로박테리움속 균과 공동배양하는 단계;

상기 공동배양한 외식편을 캘러스 형성용 배지 조성물에서 배양하여 캘러스를 형성하는 단계;

상기 캘러스를 체세포배 발생용 배지 조성물에서 배양하여 체세포배를 발생시키는 단계; 및

상기 체세포배를 식물체로 발달시키는 단계를 포함하는 방법으로서,

상기 캘러스 형성용 배지 조성물은 배지 조성물 총 부피를 기준으로 4~15 μM 농도의 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA) 및 2~8 μM 농도의 6-벤질아미노푸린(6-Benzylaminopurine, BAP)을 포함하는 배지 조성물이고,

상기 체세포배 발생용 배지 조성물은 배지 조성물 총 부피를 기준으로 0.8~2 μM 농도의 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA) 및 1.5~3 μM 농도의 티디아주론(Thidiazuron, TDZ)을 포함하는 배지 조성물인 것을 특징으로 하는 메디카고속 식물의 형질전환 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 외식편은 잎 절편인 것을 특징으로 하는 메디카고속 식물의 형질전환 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 형질전환 유전자는 항생제 저항성 유전자, 제초제 저항성 유전자, 병 저항성 유전자, 바이러스 저항성 유전자, 스트레스 저항성 유전자, 효소 생합성 유전자, 재조합 단백질 발현 유전자 또는 식물 생장 촉진 유전자에서 선택되는 1종 이상으로 구성되는 것을 특징으로 하는 메디카고속 식물의 형질전환 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 아그로박테리움속 균은 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)인 것을 특징으로 하는 메디카고속 식물의 형질전환 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 캘러스 형성용 배지는 배지 조성물 총 부피를 기준으로 4~15 μM 농도의 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA), 2~8 μM 농도의 6-벤질아미노푸린(6-Benzylaminopurine, BAP), 200~400 mg/l 농도의 (NH₄)H₂PO₄·H₂O, 2000~3000 mg/l 농도의 KNO₃, 75~275 mg/l 농도의 CaCl₂·2H₂O, 300~500 mg/l 농도의 MgSO₄·7H₂O, 10~50 mg/l 농도의 Fe-EDTA·3H₂O, 5~25 mg/l 농도의 MnSO₄·H₂O, 1~15 mg/l 농도의 H₃BO₃, 0.2~4 mg/l 농도의 KI, 0.2~4 mg/l 농도의 ZnSO₄·7H₂O, 0.05~1 mg/l 농도의 CuSO₄·5H₂O, 0.01~0.25 mg/l 농도의 Na₂MoO₄·2H₂O, 0.01~0.25 mg/l 농도의 CoCl₂·6H₂O, 10~250 mg/l 농도의 미오이노시톨(myo-inositol), 0.1~2.5 mg/l 농도의 니코틴산(Nicotinic acid), 0.1~2.5 mg/l 농도의 피리독신염산염(Pyridoxine HCl), 1~25 mg/l 농도의 티아민염산염(Thiamine HCl), 10~35 g/l 농도의 수크로스(Sucrose), 0.1~1.5 g/l 농도의 카제인 가수분해물(Casein hydrolysate), 0.1~1.5 g/l 농도의 MES[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid], 0.1~1.5 g/l 농도의 글루콘산칼슘(Calcium gluconate), 0.2~2.5 μM 농도의 AVG[L-α-(2-aminoethoxyvinyl)glycine], 400~800 mg/l 농도의 오그멘틴(Augmentin; Amoxicillin clavulanate) 및 1~5 g/l 농도의 젤란검(Gellan gum)을 포함하는 것을 특징으로 하는 메디카고속 식물의 형질전환 방법.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 체세포배 발생용 배지 조성물은 배지 조성물 총 부피를 기준으로 0.8~2 μM 농도의 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA), 1.5~3 μM 농도의 티디아주론, 200~400 mg/l 농도의 (NH₄)H₂PO₄·H₂O, 2000~3000 mg/l 농도의 KNO₃, 75~275 mg/l 농도의 CaCl₂·2H₂O, 300~500 mg/l 농도의 MgSO₄·7H₂O, 10~50 mg/l 농도의 Fe-EDTA·3H₂O, 5~25 mg/l 농도의 MnSO₄·H₂O, 1~15 mg/l 농도의 H₃BO₃, 0.2~4 mg/l 농도의 KI, 0.2~4 mg/l 농도의 ZnSO₄·7H₂O, 0.05~1 mg/l 농도의 CuSO₄·5H₂O, 0.01~0.25 mg/l 농도의 Na₂MoO₄·2H₂O, 0.01~0.25 mg/l 농도의 CoCl₂·6H₂O, 10~250 mg/l 농도의 미오이노시톨(myo-inositol), 0.1~2.5 mg/l 농도의 니코틴산(Nicotinic acid), 0.1~2.5 mg/l 농도의 피리독신염산염(Pyridoxine HCl), 1~25 mg/l 농도의 티아민염산염(Thiamine HCl), 10~35 g/l 농도의 수크로스(Sucrose), 0.1~1.5 g/l 농도의 카제인 가수분해물(Casein hydrolysate), 0.1~1.5 g/l 농도의 MES[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid], 0.1~1.5 g/l 농도의 글루콘산칼슘(Calcium gluconate), 0.2~2.5 μM 농도의 AVG[L-α-(2-aminoethoxyvinyl)glycine], 200~900 mg/l 농도의 오그멘틴(Augmentin; Amoxicillin clavulanate) 및 1~5 g/l 농도의 젤란검(Gellan gum)을 포함하는 것을 특징으로 하는 메디카고속 식물의 형질전환 방법.

청구항 13

메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) 식물체의 외식편(Explant)을 캘러스 형성용 배지 조성물에서 배양하여 캘러스를 형성하는 단계;

상기 캘러스를 형질전환 유전자가 도입된 아그로박테리움속 균과 공동배양하는 단계;

상기 공동배양한 캘러스를 체세포배 발생용 배지 조성물에서 배양하여 체세포배를 발생시키는 단계; 및

상기 체세포배를 식물체로 발달시키는 단계를 포함하는 방법으로서,

상기 캘러스 형성용 배지 조성물은 배지 조성물 총 부피를 기준으로 4~15 μM 농도의 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA) 및 2~8 μM 농도의 6-벤질아미노푸린(6-Benzylaminopurine, BAP)을 포함하는 배

지 조성물이고,

상기 체세포배 발생용 배지 조성물은 배지 조성물 총 부피를 기준으로 0.8~2 μM 농도의 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA) 및 1.5~3 μM 농도의 티디아주론(Thidiazuron, TDZ)을 포함하는 배지 조성물인 것을 특징으로 하는 메디카고속 식물의 형질전환 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 아그로박테리움속 균은 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)인 것을 특징으로 하는 메디카고속 식물의 형질전환 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 캘러스 형성용 배지는 배지 조성물 총 부피를 기준으로 4~15 μM 농도의 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA), 2~8 μM 농도의 6-벤질아미노푸린(6-Benzylaminopurine, BAP), 200~400 mg/l 농도의 (NH₄)H₂PO₄·H₂O, 2000~3000 mg/l 농도의 KNO₃, 75~275 mg/l 농도의 CaCl₂·2H₂O, 300~500 mg/l 농도의 MgSO₄·7H₂O, 10~50 mg/l 농도의 Fe-EDTA·3H₂O, 5~25 mg/l 농도의 MnSO₄·H₂O, 1~15 mg/l 농도의 H₃BO₃, 0.2~4 mg/l 농도의 KI, 0.2~4 mg/l 농도의 ZnSO₄·7H₂O, 0.05~1 mg/l 농도의 CuSO₄·5H₂O, 0.01~0.25 mg/l 농도의 Na₂MoO₄·2H₂O, 0.01~0.25 mg/l 농도의 CoCl₂·6H₂O, 10~250 mg/l 농도의 미오이노시톨(myo-inositol), 0.1~2.5 mg/l 농도의 니코틴산(Nicotinic acid), 0.1~2.5 mg/l 농도의 피리독신염산염(Pyridoxine HCl), 1~25 mg/l 농도의 티아민염산염(Thiamine HCl), 10~35 g/l 농도의 수크로스(Sucrose), 0.1~1.5 g/l 농도의 카제인 가수분해물(Casein hydrolysate), 0.1~1.5 g/l 농도의 MES[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid], 0.1~1.5 g/l 농도의 글루콘산칼슘(Calcium gluconate), 0.2~2.5 μM 농도의 AVG[L-α-(2-aminoethoxyvinyl)glycine], 400~800 mg/l 농도의 오그멘틴(Augmentin; Amoxicillin clavulanate) 및 1~5 g/l 농도의 젤란검(Gellan gum)을 포함하는 것을 특징으로 하는 메디카고속 식물의 형질전환 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 체세포배 발생용 배지 조성물은 배지 조성물 총 부피를 기준으로 0.8~2 μM 농도의 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA), 1.5~3 μM 농도의 티디아주론, 200~400 mg/l 농도의 (NH₄)H₂PO₄·H₂O, 2000~3000 mg/l 농도의 KNO₃, 75~275 mg/l 농도의 CaCl₂·2H₂O, 300~500 mg/l 농도의 MgSO₄·7H₂O, 10~50 mg/l 농도의 Fe-EDTA·3H₂O, 5~25 mg/l 농도의 MnSO₄·H₂O, 1~15 mg/l 농도의 H₃BO₃, 0.2~4 mg/l 농도의 KI, 0.2~4 mg/l 농도의 ZnSO₄·7H₂O, 0.05~1 mg/l 농도의 CuSO₄·5H₂O, 0.01~0.25 mg/l 농도의 Na₂MoO₄·2H₂O, 0.01~0.25 mg/l 농도의 CoCl₂·6H₂O, 10~250 mg/l 농도의 미오이노시톨(myo-inositol), 0.1~2.5 mg/l 농도의 니코틴산(Nicotinic acid), 0.1~2.5 mg/l 농도의 피리독신염산염(Pyridoxine HCl), 1~25 mg/l 농도의 티아민염산염(Thiamine HCl), 10~35 g/l 농도의 수크로스(Sucrose), 0.1~1.5 g/l 농도의 카제인 가수분해물(Casein hydrolysate), 0.1~1.5 g/l 농도의 MES[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid], 0.1~1.5 g/l 농도의 글루콘산칼슘(Calcium gluconate), 0.2~2.5 μM 농도의 AVG[L-α-(2-aminoethoxyvinyl)glycine], 200~900 mg/l 농도의 오그멘틴(Augmentin; Amoxicillin clavulanate) 및 1~5 g/l 농도의 젤란검(Gellan gum)을 포함하는 것을 특징으로 하는 메디카고속 식물의 형질전환 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 체세포배 발생용 배지 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더 상세하게는 메디카고속 식물의 체세포배 발생 효율이 높은 배지 조성물 및 이를 이용하여 메디카고속 식물을 형질전환하는 방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

[0002] 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*)는 콩과 개자리속(genus *Medicago*) 식물로서, 알팔파(*Medicago sativa*) 등과 함께 중요한 녹비 및 사료 작물로 사용되고 있다. 특히, 콩과 식물의 유전학 및 유전체학 연구를 위한 모델 식물로서 질소 고정 박테리아와의 뿌리혹 공생 및 균근(mycorrhiza) 공생을 위한 연구와 식량 및 사료작물의 가치를 증진시키기 위한 유전자 기능 연구에서 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*)는 전 세계적으로 이용되고 있다. 또한, 메디카고 트룬카툴라 유전체는 A17 계통을 재료로 해독되었고[Young et al (2011). The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses, Nature, Nov 16, 480(7378), 520-524.], 이를 바탕으로 다양한 연구 재료와 정보가 축적되어 세계적으로 활용되고 있다.

[0003] 그러나 메디카고 트룬카툴라 기준 유전형인 A17은 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)를 이용한 안정적 형질전환이 매우 어려워 형질전환을 이용한 유전자 기능 연구나 품종 개발이 이루어지지 않고 있다. 그 대안으로서 식물체 재분화가 비교적 쉬운 품종인 메디카고 트룬카툴라 R108을 재료로 하여 돌연변이집단이 육성되었고(Trinh et al., 1998, Plant Cell Reports, 17 : 345-355.), 메디카고 트룬카툴라 A17 품종과 근연 품종 또는 변이 품종인 메디카고 트룬카툴라 2HA 등을 이용하여 식물 형질전환을 실시하고 있으나(Rose et al., 1999, Journal of Plant Physiology 155:788-791.; Araujo et al., 2004, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 78:123-131.), 기준 유전형인 메디카고 트룬카툴라 A17과의 유전적 변이 및 유전체 서열의 차이에 따른 문제점이 있는 실정이다.

[0004] 메디카고속 식물의 안정적 형질전환은 대두 등 콩과식물의 형질전환 방법을 따라 주로 떡잎 기부에 위치하는 정단분열조직 주변에서 새로운 식물체를 직접 유도하는 직접적인 신초기관발생(direct shoot organogenesis) 방법(Trieu et al., 1996, Plant Cell Reports, Volume 16, Issue 1-2, pp 6-11)과 떡잎이나 잎, 하배축 조직에서 캘러스를 형성시킨 후, 여기에 체세포배발생(indirect somatic embryogenesis)을 유도하는 방법(Cosson et al., Methods Mol Biol. 2006;343:115-27)이 활용되어 왔다. 이중 메디카고 트룬카툴라 A17 유전형은 체세포배 발생 유도 효율이 낮아 이의 형질전환은 직접 신초기관발생 방법이 이용되고 있으나 시간과 노력에 비해 효율이 매우 낮은 것으로 알려져 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 종래의 기술적 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 목적은 메디카고속 식물의 체세포배 발생 효율이 높은 배지 조성물 및 이를 이용하여 메디카고속 식물을 형질전환하는 방법을 제공하는데에 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 발명자들은 체세포배 발생을 이용한 메디카고 트룬카툴라 A17 유전형의 형질전환 과정에서 체세포배 발생에 의한 형질전환 식물체의 재분화 효율을 획기적으로 높이기 위해 체세포배 발생용 배지에 첨가되는 다양한 호르몬 조합을 시험하였고, 그 결과 특정 호르몬 조합 및 소정 범위의 농도에서 체세포배 발생 효율이 현저하게 향상되어 메디카고 트룬카툴라 A17 유전형을 안정적으로 형질전환시킬 수 있다는 점을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0008] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 옥신(Auxin)과 사이토키닌(Cytokinin)을 포함하는 배지 조성물로서, 상기 옥신은 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA)이고 상기 사이토키닌은 티디아주론(Thidiazuron, TDZ)이며, 배지 조성물 총 부피를 기준으로 상기 1-나프탈아세트산의 농도는 0.4-5 μM이고 티디아주론의 농도는 1.5-5 μM인 것을 특징으로 하는 메디카고속(*Medicago*) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물을 제공한다.

[0009] 상기 목적을 해결하기 위하여, 본 발명의 일 예는 메디카고속 식물체의 외식편(Explant)을 형질전환 유전자가 도입된 아그로박테리움속 균과 공동배양하는 단계; 상기 공동배양한 외식편을 캘러스 형성용 배지에서 배양하여 캘러스를 형성하는 단계; 상기 캘러스를 전술한 체세포배 발생용 배지 조성물에서 배양하여 체세포배를 발생시키는 단계; 및 상기 체세포배를 식물체로 발달시키는 단계를 포함하는, 메디카고속 식물의 형질전환 방법을 제공한다. 또한, 본 발명의 다른 예는 메디카고속 식물체의 외식편(Explant)을 캘러스 형성용 배지에서 배양하여 캘러스를 형성하는 단계; 상기 캘러스를 형질전환 유전자가 도입된 아그로박테리움속 균과 공동배양하는 단계; 상기 공동배양한 캘러스를 전술한 체세포배 발생용 배지 조성물에서 배양하여 체세포배를 발생시키는 단계; 및

상기 체세포배를 식물체로 발달시키는 단계를 포함하는, 메디카고속 식물의 형질전환 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 메디카고속 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물은 종래의 메디카고 트룬카툴라 체세포배 발생용 배지와 비교할 때 새로운 호르몬의 조합을 포함하고, 그로 인해 약 10배 이상 향상된 체세포배 발생 효율을 가진다. 또한, 본 발명에 따른 메디카고속 식물의 형질전환 방법을 사용하면 종래의 방법으로는 형질전환이 매우 어려웠던 메디카고 트룬카툴라 기준 유전형 A17을 안정적으로 형질전환시킬 수 있다. 따라서, 본 발명을 이용하면 메디카고 트룬카툴라 기준 유전형 A17에 대한 유전체 기반의 유전자 기능 연구 및 유전자 조작이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 메디카고 트룬카툴라 유전형 A17 (*Medicago truncatula* cultivar Jemalong A17) 식물체의 잎 절편을 식물 형질전환용 벡터가 도입된 아그로박테리움 튜메파시엔스로 감염시키고 공동배양 배지 CCM3에서 공동배양한 후, 캘러스 형성용 배지인 CIM3에서 배양하여 캘러스를 형성하고, 형성한 캘러스를 다양한 호르몬 조합의 체세포배 발생용 배지에서 배양하였을 때 체세포배가 발생한 잎 절편의 비율(%)를 나타낸 것이다.

도 2는 메디카고 트룬카툴라 유전형 A17 (*Medicago truncatula* cultivar Jemalong A17) 식물체의 잎 절편을 식물 형질전환용 벡터가 도입된 아그로박테리움 튜메파시엔스로 감염시키고 공동배양 배지 CCM3에서 공동배양한 후, 캘러스 형성용 배지인 CIM3에서 배양하여 캘러스를 형성하고, 형성한 캘러스를 다양한 호르몬 조합의 체세포배 발생용 배지에서 배양하였을 때 잎 절편당 발생한 체세포배의 수를 나타낸 것이다.

도 3은 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체의 생산 과정 중 체세포배 발생 및 식물체로의 발달 과정을 나타낸 것이다.

도 4는 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체의 생산 과정을 단계별로 나타낸 것이다.

도 5는 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체의 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP) 형광을 관찰한 결과이다.

도 6은 연쇄증합효소반응(PCR)을 이용하여 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체 내의 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP) 유전자를 확인한 결과이다.

도 7은 바스타(Basta) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체의 생산 과정을 단계별로 나타낸 것이다.

도 8은 바스타(Basta) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체의 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP) 형광을 관찰한 결과이다.

도 9는 연쇄증합효소반응(PCR)을 이용하여 바스타(Basta) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체 내의 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP) 유전자를 확인한 결과이다.

도 10은 Nolan et al.의 캘러스 형성용 배지 및 체세포배 발생용 배지를 사용하여 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체를 생산하였을 때와 본 발명의 캘러스 형성용 배지 및 체세포배 발생용 배지를 사용하여 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체를 생산하였을 때의 체세포배 발생을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0014] 본 발명의 일 측면은 메디카고속 식물의 체세포배 발생 효율이 높은 배지 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물은 옥신(Auxin)으로 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA) 및 사이토키닌으로 티디아주론(Thidiazuron, TDZ)을 포함하는 것을 특징으로

한다. 또한, 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물에서 상기 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA)의 농도는 배지 조성물 총 부피를 기준으로 0.4-5 μM이고, 체세포배 발생 효율을 고려할 때 배지 조성물 총 부피를 기준으로 0.5~4 μM인 것이 바람직하고, 0.8~2 μM인 것이 더 바람직하다. 또한, 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물에서 상기 티디아주론(Thidiazuron, TDZ)의 농도는 배지 조성물 총 부피를 기준으로 1.5~5 μM이고, 체세포배 발생 효율을 고려할 때 배지 조성물 총 부피를 기준으로 1.5~3 μM인 것이 바람직하고, 1.8~2.5 μM인 것이 더 바람직하다.

[0015] 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물은 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA) 및 티디아주론의 조합 외에 공지의 메디카고속(*Medicago*) 식물 체세포배 발생용 배지에 포함되는 다양한 성분들을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물은 캘러스로부터의 체세포배 발생을 촉진하기 위하여 당 업계에 공지된 화합물인 지베렐린, 예컨대 GA3 혹은 GA4와 앱시스산(ABA), 또는 L-alpha-(2-aminoethoxyvinyl)glycine (AVG)을 0.2~5 μM의 농도로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물은 아그로박테리움이 계속 성장하는 경우 이를 억제하기 위해 적절한 항생제, 예컨대 Cefotaxime, Augmentin, Timentin, Carbenicillin 등을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 100~900 mg/l 농도의 Augmentin을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물은 아가, 아가로스 또는 Gelrite 등과 같은 검류를 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물은 체세포배 발생 효율을 고려할 때 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA) 및 티디아주론 외에 (NH₄)₂PO₄ · H₂O, KNO₃, CaCl₂ · 2H₂O, MgSO₄ · 7H₂O, Fe-EDTA · 3H₂O, MnSO₄ · H₂O, H₃BO₃, KI, ZnSO₄ · 7H₂O, CuSO₄ · 5H₂O, Na₂MoO₄ · 2H₂O, CoCl₂ · 6H₂O, 미오이노시톨(myo-inositol), 니코틴산(Nicotinic acid), 피리독신염산염(Pyridoxine HCl), 티아민염산염(Thiamine HCl), 수크로스(Sucrose), 카제인 가수분해물(Casein hydrolysate), MES[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid], 글루콘산칼슘(Calcium gluconate), AVG[L-α-(2-aminoethoxyvinyl)glycine], 오그멘틴(Augmentin; Amoxicillin clavulanate) 및 젤란검(Gellan gum)을 더 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물은 체세포배 발생 효율을 고려할 때 배지 조성물 총 부피를 기준으로 0.5~4 μM 농도의 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA), 1.5~3 μM 농도의 티디아주론, 200~400 mg/l 농도의 (NH₄)₂PO₄ · H₂O, 2000~3000 mg/l 농도의 KNO₃, 75~275 mg/l 농도의 CaCl₂ · 2H₂O, 300~500 mg/l 농도의 MgSO₄ · 7H₂O, 10~50 mg/l 농도의 Fe-EDTA · 3H₂O, 5~25 mg/l 농도의 MnSO₄ · H₂O, 1~15 mg/l 농도의 H₃BO₃, 0.2~4 mg/l 농도의 KI, 0.2~4 mg/l 농도의 ZnSO₄ · 7H₂O, 0.05~1 mg/l 농도의 CuSO₄ · 5H₂O, 0.01~0.25 mg/l 농도의 Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.01~0.25 mg/l 농도의 CoCl₂ · 6H₂O, 10~250 mg/l 농도의 미오이노시톨(myo-inositol), 0.1~2.5 mg/l 농도의 니코틴산(Nicotinic acid), 0.1~2.5 mg/l 농도의 피리독신염산염(Pyridoxine HCl), 1~25 mg/l 농도의 티아민염산염(Thiamine HCl), 10~35 g/l 농도의 수크로스(Sucrose), 0.1~1.5 g/l 농도의 카제인 가수분해물(Casein hydrolysate), 0.1~1.5 g/l 농도의 MES[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid], 0.1~1.5 g/l 농도의 글루콘산칼슘(Calcium gluconate), 0.2~2.5 μM 농도의 AVG[L-α-(2-aminoethoxyvinyl)glycine], 200~900 mg/l 농도의 오그멘틴(Augmentin; Amoxicillin clavulanate) 및 1~5 g/l 농도의 젤란검(Gellan gum)를 포함하고, 바람직하게는 0.8~2 μM 농도의 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA), 1.8~2.5 μM 농도의 티디아주론, 250~350 mg/l 농도의 (NH₄)₂PO₄ · H₂O, 2200~2800 mg/l 농도의 KNO₃, 120~240 mg/l 농도의 CaCl₂ · 2H₂O, 350~450 mg/l 농도의 MgSO₄ · 7H₂O, 15~40 mg/l 농도의 Fe-EDTA · 3H₂O, 8~15 mg/l 농도의 MnSO₄ · H₂O, 2~8 mg/l 농도의 H₃BO₃, 0.5~2.5 mg/l 농도의 KI, 0.5~2.5 mg/l 농도의 ZnSO₄ · 7H₂O, 0.1~0.5 mg/l 농도의 CuSO₄ · 5H₂O, 0.05~0.2 mg/l 농도의 Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.05~0.2 mg/l 농도의 CoCl₂ · 6H₂O, 50~200 mg/l 농도의 미오이노시톨(myo-inositol), 0.5~2 mg/l 농도의 니코틴산(Nicotinic acid), 0.5~2 mg/l 농도의 피리독신염산염(Pyridoxine HCl), 5~20 mg/l 농도의 티아민염산염(Thiamine HCl), 15~30 g/l 농도의 수크로스(Sucrose), 0.2~1.0 g/l 농도의 카제인 가수분해물(Casein hydrolysate), 0.2~1.0 g/l 농도의 MES[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid], 0.2~1.0 g/l 농도의 글루콘산칼슘(Calcium gluconate), 0.5~2.0 μM 농도의 AVG[L-α-(2-aminoethoxyvinyl)glycine], 250~800 mg/l 농도의 오그멘틴(Augmentin; Amoxicillin clavulanate) 및 2~4 g/l 농도의 젤란검(Gellan gum)를 포함한다.

[0017] 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물은 형질전환 체세포배만을 선별하기 위한 체계로서 카나마이신, 히그로마이신(Hygromycin), 바스타(Basta) 등과 같은 형질전환 선별용 화합물을 더 포함

할 수 있다. 본 발명의 메디카고속(Medicago) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물에서 형질전환 선별용 화합물의 농도는 1~100 mg/ℓ의 농도에서 선택되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명의 메디카고속(Medicago) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물에서 상기 카나마이신의 농도는 20~80 mg/ℓ인 것이 바람직하고 30~60 mg/ℓ인 것이 더 바람직하다. 또한, 본 발명의 메디카고속(Medicago) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물에서 상기 바스타(Basta)의 농도는 2~10 mg/ℓ인 것이 바람직하고 3~8 mg/ℓ인 것이 더 바람직하다.

[0018] 본 발명의 메디카고속(Medicago) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물은 바람직하게는 매질로 물을 포함한다. 본 발명의 메디카고속(Medicago) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물은 바람직하게는 오토클레이브 등으로 멸균 후 냉각하면 구성성분 중 하나인 검류에 의해 고체상으로 존재한다.

[0019] 본 발명의 메디카고속(Medicago) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물은 메디카고속(Medicago) 식물로부터 형성한 캘러스의 체세포배 발생을 유도하는데에 적용되며, 상기 메디카고속(Medicago) 식물은 그 종류가 크게 제한되지 않으며 약 90 여개의 종(Species)이 보고되었다. 본 발명의 메디카고속(Medicago) 식물의 체세포배 발생용 배지 조성물은 바람직하게는 메디카고 트룬카툴라(Medicago truncatula)로부터 형성한 캘러스의 체세포배 발생을 유도하는데에 적용되며, 더 바람직하게는 메디카고 트룬카툴라 유전형 A17(Medicago truncatula genotype A17)로부터 형성한 캘러스의 체세포배 발생을 유도하는데에 적용된다.

[0021] 본 발명의 일 측면은 메디카고속(Medicago) 식물의 형질전환 방법에 관한 것이다. 본 발명의 일 예에 따른 메디카고속(Medicago) 식물의 형질전환 방법은 메디카고속 식물체의 외식편(Explant)을 형질전환 유전자가 도입된 아그로박테리움속 균과 공동배양하는 단계; 상기 공동배양한 외식편을 캘러스 형성용 배지에서 배양하여 캘러스를 형성하는 단계; 상기 캘러스를 전술한 체세포배 발생용 배지 조성물에서 배양하여 체세포배를 발생시키는 단계; 및 상기 체세포배를 식물체로 발달시키는 단계를 포함한다. 또한, 본 발명의 다른 예에 따른 메디카고속(Medicago) 식물의 형질전환 방법은 메디카고속 식물체의 외식편(Explant)을 캘러스 형성용 배지에서 배양하여 캘러스를 형성하는 단계; 상기 캘러스를 형질전환 유전자가 도입된 아그로박테리움속 균과 공동배양하는 단계; 상기 공동배양한 캘러스를 전술한 체세포배 발생용 배지 조성물에서 배양하여 체세포배를 발생시키는 단계; 및 상기 체세포배를 식물체로 발달시키는 단계를 포함한다. 본 발명의 일 예에 따른 메디카고속(Medicago) 식물의 형질전환 방법은 메디카고속 식물체의 외식편(Explant)을 형질전환 유전자가 도입된 아그로박테리움속 균으로 감염시켜 형질전환시키는 방법인 반면, 본 발명의 다른 예에 따른 메디카고속(Medicago) 식물의 형질전환 방법은 메디카고속 식물체의 외식편(Explant)으로부터 형성한 캘러스를 형질전환 유전자가 도입된 아그로박테리움속 균으로 감염시켜 형질전환시키는 방법이다. 이하, 본 발명의 일 예에 따른 메디카고속(Medicago) 식물의 형질전환 방법을 단계별로 나누어 설명한다. 본 발명의 다른 예에 따른 메디카고속(Medicago) 식물의 형질전환 방법은 상기 차이점을 제외하고 본 발명의 일 예에 따른 메디카고속(Medicago) 식물의 형질전환 방법과 기술적 특징이 동일하므로 구체적인 설명을 생략한다.

[0023] 메디카고속 식물체의 외식편(Explant)을 형질전환 유전자가 도입된 아그로박테리움속 균과 공동배양하는 단계

[0024] 본 발명의 메디카고속(Medicago) 식물의 형질전환 방법에서 상기 메디카고속 식물체의 외식편(Explant)은 메디카고속 식물체의 조직 또는 기관을 절제한 단편으로서, 캘러스를 형성할 수 있는 것이라면 메디카고속 식물체의 다양한 부위에서 얻을 수 있고, 바람직하게는 잎 절편이다. 또한, 본 발명에서 사용된 잎 절편은 성숙한 메디카고 트룬카툴라, 더 바람직하게는 메디카고 트룬카툴라 A17 식물체의 잎이며, 잎자루, 줄기, 꽃잎과 뿌리, 유식물체 또는 유식물의 떡잎과 하배축 등도 동일한 방법으로 사용할 수 있다. 본 발명에서 최적의 식물 재료로는 무균 상태에서 생산한 잎을 사용하는 것이 좋다. 또한, 일반적으로 온실이나 배양기에서 생육시킨 식물체의 잎을 채취하여 적절한 살균 처리를 한 후 사용할 수 있다. 예를 들어, 식물체에서 분리한 잎을 70% 농도의 에탄올 수용액에 1~3분 동안 담근 후, 10~50% 농도의 락스 용액에 10~30분 동안 담가서 살균한 후, 멸균된 증류수로 씻어서 잎 절편의 재료로 사용할 수 있다. 메스를 이용하여 적당한 크기로 잘라 잎 절편을 준비한다.

[0025] 본 발명의 메디카고속(Medicago) 식물의 형질전환 방법 상기 형질전환 유전자는 그 종류가 크게 제한되지 않으며 공지의 다양한 형질전환 유전자에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 형질전환 유전자는 항생제 저항성 유전자, 제초제 저항성 유전자, 병 저항성 유전자, 바이러스 저항성 유전자, 스트레스 저항성 유전자, 효소 생합성 유전자, 재조합 단백질 발현 유전자 또는 식물 성장 촉진 유전자에서 선택되는 1종 이상으로 구성될 수 있다. 상기 항생제는 카나마이신, 히그로마이신 등 공지의 다양한 항생제에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 제초제는 바스타(Basta) 등 공지의 다양한 제초제에서 선택될 수 있다. 본 발명의 메디카고속(Medicago) 식물의 형질전환 방법에서 사용될 수 있는 형질전환 유전자의 구체적인 예로는 가뭄 스트레스 저항성 유전자, 피토크 생합성 효소(phytoene synthase, PSY) 유전자, RECA1 유전자, 피옥시다제 유전자, 대장균 장독소 B 서브유닛 유

전자, 식물의 성장을 촉진하는 gull1/sur2-7 유전자, OsRAF 유전자, 안토시아닌 생합성 조절 유전자 AtbHLH113, 병 저항성 유전자 CaChitIV(Capsicum annuum Chitinase class IV), 병 저항성 유전자 CaML02(Capsicum annuum mildew resistance locus O2), 병 저항성 유전자 CaGRP1(Capsicum annuum Glycine-rich RNA-binding Protein 1), 에이브이알비에스티 (avrBsT) 유전자, 병 저항성 유전자 CaADC1 (Capsicum annuum Arginine Decarboxylase 1), 병 저항성 CaALDH1 (Capsicum annuum Aldehyde Dehydrogenase 1), 음지 내성 또는 염 저항성 유전자인 세로토닌 N-아세틸전이효소2 유전자, 저온 저항성 단백질 15A(COR15A), 토크소플라빈 분해 효소 오전자(toxoflavin lyase: tf1A), 자일라나제 유전자, 토코트리에놀(tocotrienol) 생합성 유전자 HGGT(homogentisic acid geranylgeranyl transferase), OsGlu2 유전자, 열 충격 저항성 유전자, 산화 스트레스 저항성 유전자, 액티빈 A 유전자, 내건성 단백질 BrDST28, 온도 스트레스 저항성 유전자 AtP3B, 식물 성장 촉진용 CYP705A13 유전자, 열충격 전사인자 유전자 CaHsfB1, HOX25 유전자, 염 스트레스 저항성 유전자 BrGI(Brassica rapa GIGANTEA) 유전자, 뿌리 발달 관련 유전자 CRF2 또는 CRF3, COMT(caffeic acid O-methyltransferase) 효소를 코딩하는 유전자, 식물체 성장조절 b1p 키메라 유전자, 콩 모자이크 바이러스(Soybean mosaic virus) 유래의 HC-Pro(helper component-proteinase) 유전자, 중금속 저항성 유전자 카멜리나 HMA3 유전자, 열충격단백질을 코딩하는 분리된 유전자(CaHSP70), 저온 스트레스 저항성 유전자 grxC 유전자, TTG1 유전자, OsFKBP16-3(Oryza sativa FK506-binding protein 16-3) 단백질 코딩 유전자, 텍사디엔 신타아제 (taxadiene synthase) 유전자, CaSGT1(Capsicum annuum Suppressor of G Two allele of SKP1 1) 등이 있다.

[0026] 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 형질전환 방법에서 상기 형질전환 유전자는 형질전환 유전자를 포함하는 벡터 시스템을 통해 아그로박테리움속 균에 도입된다. 본 발명에서 이용되는 벡터 시스템은 식물체 형질전환에 적합한 다양한 재료를 이용할 수 있으며, 식물체에서 작동하는 프로모터와 형질전환 유전자 구조 및 형질전환 식물체의 선발을 위한 선발마커를 포함한다. 상기 형질전환 유전자 구조는 목적 유전자 과발현, 프로모터 및 유전자의 형광단백질이나 uid 유전자와의 결합, microRNA, shRNA 및 lhRNA를 이용한 유전자침묵 중의 하나일 수 있다. 상기 벡터 시스템은 식물체 선발을 위한 마커 유전자로서 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자, 히그로마이신(Hygromycin) 저항성 유전자, 제초제 저항성 유전자 등을 포함할 수 있다. 그러나 이 예시에 국한되는 것은 아니며 업계에 공지된 다양한 벡터 시스템을 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 형질전환 방법에서 상기 형질전환 유전자가 도입되는 아그로박테리움속 균은 식물체의 외식편을 감염시켜 외식편을 형질전환시킬 수 있는 공지의 다양한 아그로박테리움속 균에서 선택될 수 있으며, 형질전환 효율 등을 고려할 때 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)인 것이 바람직하다.

[0028] 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 형질전환 방법에서 잎 절편에 형질전환 벡터를 도입하는 방법은 공지된 통상적인 아그로박테리움 튜메파시엔스를 이용한 식물형질전환 방법에 따라 실시될 수 있으며, 전기천공, 유전자 총 등 당 업계에 공지된 유전자 도입 방법을 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 형질전환 방법에서 외식편을 형질전환 유전자가 도입된 아그로박테리움속 균과 공동배양하거나 캘러스를 형질전환 유전자가 도입된 아그로박테리움속 균과 공동배양하는 경우 다양한 공동배양 배지가 사용될 수 있다. 본 발명에서 사용하는 공동배양 배지는 당 업계에 공지된 MS 배지 또는 SH 배지를 사용할 수 있으며, 그 조성은 (NH₄)₂SO₄, KNO₃, CaCl₂, MgSO₄, Fe-EDTA, MnSO₄, HBO₃, KI, ZnSO₄, CuSO₄, Na₂MoO₄, CoCl₂, myoinositol, nicotinic acid, pyridoxine, thiamine HCl, Glycine, casein hydrolysates, calcium gluconate, MES, acetosyringone, 당류, 옥신, 사이토키닌 등을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에서 사용하는 공동배양 배지는 바람직하게는 아가, 아가로스 또는 Gelrite 등과 같은 겔류를 포함할 수 있다. 상기 공동배양 배지의 pH 조절을 위해 MES를 0.2-2 g/l의 농도, 바람직하게는 0.5 g/l 농도로 첨가할 수 있으며, 공동배양 배지의 pH는 5.7~5.8로 조절하여 사용할 수 있다. 또한, 공동배양 배지에는 아그로박테리움 튜메파시엔스와 캘러스의 성장을 촉진하기 위한 casein hydrolysates, calcium gluconate, 아미노산인 프롤린과 시스테인 등이 각각 0.1~2 g/l의 농도로 첨가될 수 있다. 또한, 공동배양 배지에는 아그로박테리움 튜메파시엔스의 형질전환 활성을 촉진하기 위해 acetosyringone이 50~200 μM 범위로 첨가될 수 있다. 또한, 공동배양 배지에서 사용되는 당류는 당 업계에서 공지된 식물 형질전환에 사용되는 당류 중 하나일 수 있으며, 바람직하게는 5~50 g/l의 농도 범위에서 수크로스(sucrose)가 사용할 수 있다. 또한, 공동배양 배지의 구성성분으로 사용되는 옥신과 사이토키닌은 당 업계에서 공지된 식물 형질전환에 사용되는 옥신과 사이토키닌 화합물 중 하나일 수 있으며, 바람직하게는 NAA와 BAP를 1~20 μM 농도로 조합하여 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시 예에 따르면, 잎 절편을 아그로박테리움 튜메파시엔스와 공동배양하면, 잎 절편이 아그로박테리움 튜메파시엔스로 감염되고 아그로박테리움 튜메파시엔스에 도입된 형질전환 유전자 또는 이를 포함하는 벡터가 잎 절편에 도입되어

있 절편이 형질전환된다.

[0031] 공동배양한 외식편을 캘러스 형성용 배지에서 배양하여 캘러스를 형성하는 단계

[0032] 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 형질전환 방법에서 캘러스 형성 단계는 아그로박테리움 튜메파시엔스에 감염된 잎 절편을 적절한 옥신과 사이토키닌을 포함하는 캘러스 형성용 배지에서 배양하여 배 발생이 가능한 캘러스 (embryogenic callus) 세포의 형성과 생장을 유도하는 단계이다. 상기 캘러스 형성용 배지는 옥신인 NAA를 2-50 μM , 사이토키닌인 BAP를 1-25 μM 의 농도로 포함할 수 있다. 또한, 상기 캘러스 형성용 배지는 배 발생 캘러스의 형성을 촉진하기 위하여 당 업계에 공지된 화합물인 L-alpha-(2-aminoethoxyvinyl) glycine(AVG)을 0.2-5 μM 농도로 포함할 수 있다. 또한, 상기 캘러스 형성용 배지는 아그로박테리움 튜메파시엔스의 생장을 억제하기 위하여, 적절한 항생제, 예컨대 Augmentin, Timentin, Carbenicillin, Cefotaxime에서 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있고, 바람직하게는 400-800 mg/l 농도의 Augmentin을 포함할 수 있다. 또한, 상기 캘러스 형성용 배지는 아가, 아가로스 또는 Gelrite 등과 같은 검류를 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 형질전환 방법에서 상기 캘러스 형성용 배지는 배 발생이 가능한 캘러스의 형성 효율을 고려할 때 바람직하게는 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA), 6-벤질아미노푸린(6-Benzylaminopurine, BAP), $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe-EDTA} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , KI, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 미오이노시톨(myo-inositol), 니코틴산(Nicotinic acid), 피리독신염산염(Pyridoxine HCl), 티아민염산염(Thiamine HCl), 수크로스(Sucrose), 카제인 가수분해물(Casein hydrolysate), MES[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid], 글루콘산칼슘(Calcium gluconate), AVG[L- α -(2-aminoethoxyvinyl)glycine], 오그멘틴(Augmentin; Amoxicillin clavulanate) 및 젤란검(Gellan gum)을 포함한다. 또한, 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 형질전환 방법에서 상기 캘러스 형성용 배지는 배지 조성물 총 부피를 기준으로 2-20 μM 농도의 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA), 1-8 μM 농도의 6-벤질아미노푸린(6-Benzylaminopurine, BAP), 200-400 mg/l 농도의 $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2000-3000 mg/l 농도의 KNO_3 , 75-275 mg/l 농도의 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 300-500 mg/l 농도의 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10-50 mg/l 농도의 $\text{Fe-EDTA} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 5-25 mg/l 농도의 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1-15 mg/l 농도의 H_3BO_3 , 0.2-4 mg/l 농도의 KI, 0.2-4 mg/l 농도의 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05-1 mg/l 농도의 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.01-0.25 mg/l 농도의 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01-0.25 mg/l 농도의 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10-250 mg/l 농도의 미오이노시톨(myo-inositol), 0.1-2.5 mg/l 농도의 니코틴산(Nicotinic acid), 0.1-2.5 mg/l 농도의 피리독신염산염(Pyridoxine HCl), 1-25 mg/l 농도의 티아민염산염(Thiamine HCl), 10-35 g/l 농도의 수크로스(Sucrose), 0.1-1.5 g/l 농도의 카제인 가수분해물(Casein hydrolysate), 0.1-1.5 g/l 농도의 MES[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid], 0.1-1.5 g/l 농도의 글루콘산칼슘(Calcium gluconate), 0.2-2.5 μM 농도의 AVG[L- α -(2-aminoethoxyvinyl)glycine], 400-800 mg/l 농도의 오그멘틴(Augmentin; Amoxicillin clavulanate) 및 1-5 g/l 농도의 젤란검(Gellan gum)를 포함하고, 바람직하게는 4-15 μM 농도의 1-나프탈아세트산(1-Naphthaleneacetic acid, NAA), 2-6 μM 농도의 6-벤질아미노푸린(6-Benzylaminopurine, BAP), 250-350 mg/l 농도의 $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2200-2800 mg/l 농도의 KNO_3 , 120-240 mg/l 농도의 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 350-450 mg/l 농도의 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15-40 mg/l 농도의 $\text{Fe-EDTA} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 8-15 mg/l 농도의 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2-8 mg/l 농도의 H_3BO_3 , 0.5-2.5 mg/l 농도의 KI, 0.5-2.5 mg/l 농도의 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1-0.5 mg/l 농도의 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.05-0.2 mg/l 농도의 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05-0.2 mg/l 농도의 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 50-200 mg/l 농도의 미오이노시톨(myo-inositol), 0.5-2 mg/l 농도의 니코틴산(Nicotinic acid), 0.5-2 mg/l 농도의 피리독신염산염(Pyridoxine HCl), 5-20 mg/l 농도의 티아민염산염(Thiamine HCl), 15-30 g/l 농도의 수크로스(Sucrose), 0.2-1.0 g/l 농도의 카제인 가수분해물(Casein hydrolysate), 0.2-1.0 g/l 농도의 MES[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid], 0.2-1.0 g/l 농도의 글루콘산칼슘(Calcium gluconate), 0.5-2.0 μM 농도의 AVG[L- α -(2-aminoethoxyvinyl)glycine], 500-700 mg/l 농도의 오그멘틴(Augmentin; Amoxicillin clavulanate) 및 2-4 g/l 농도의 젤란검(Gellan gum)를 포함한다.

[0034] 또한, 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 형질전환 방법에서 상기 캘러스 형성용 배지는 유전자 형질전환이 일어난 세포의 선택적 생장을 위해 형질전환 선별용 화합물, 예를 들어 카나마이신, 히그로마이신(Hygromycin), 바스타(Basta) 등에서 선택되는 하나를 포함할 수 있다. 상기 캘러스 형성용 배지에서 형질전환 선별용 화합물의 농도는 1-100 mg/l 의 농도에서 선택되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 상기 캘러스 형성용 배지에서 상기 카나마이신의 농도는 20-80 mg/l 인 것이 바람직하고 30-60 mg/l 인 것이 더 바람직하다. 또한, 상

기 캘러스 형성용 배지에서 상기 바스타(Basta)의 농도는 2~10 mg/ℓ 인 것이 바람직하고 3~8 mg/ℓ 인 것이 더 바람직하다.

[0035] 또한, 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 형질전환 방법에서 상기 캘러스 형성용 배지는 바람직하게는 매질로 물을 포함한다. 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 형질전환 방법에서 상기 캘러스 형성용 배지는 바람직하게는 오토클레이브 등으로 멸균 후 냉각하면 구성성분 중 하나인 검류에 의해 고체상으로 존재한다.

[0037] 캘러스를 체세포배 발생용 배지 조성물에서 배양하여 체세포배를 발생시키는 단계

[0038] 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 형질전환 방법에서 체세포배를 발생시키는 단계는 전술한 소정의 체세포배 발생용 배지 조성물을 사용하는 것을 특징으로 한다. 상기 체세포배 발생용 배지 조성물에 대한 기술적 특징은 전술한 내용을 참조하며, 구체적인 설명을 생략한다.

[0039] 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 형질전환 방법에서 체세포배를 발생시키는 단계는 체세포배의 수를 늘리거나 균일한 식물체 발달을 얻기 위하여 2차 배 발생(secondary somatic embryogenesis)을 반복하는 것으로 구성될 수 있다.

[0041] 체세포배를 식물체로 발달시키는 단계

[0042] 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 형질전환 방법에서 체세포배를 식물체로 발달시키는 단계는 구체적으로 체세포배가 발생한 캘러스 또는 잎 절편을 식물발달 배지로 옮기고 배양하여 체세포배의 반복 형성을 억제하고 식물체로의 발달을 유도하는 것으로 구성된다. 상기 식물발달 배지는 공지의 다양한 배지에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는 체세포배의 반복 형성을 억제하기 위해 옥신과 사이토키닌을 포함하지 않고, 당류의 농도가 체세포배 발생용 배지 조성물에 비해 줄어드는 것을 특징으로 한다. 상기 식물발달 배지에서 당류인 수크로스(Sucrose)의 농도는 2~15 g/ℓ 인 것이 바람직하고 5~12 g/ℓ 인 것이 더 바람직하다. 상기 식물발달 배지의 교환은 2~6주 간격으로 수행할 수 있으며, 바람직하게는 2~3주 간격으로 교체함으로써 체세포배 발생용 배지 조성물에서 흡수한 호르몬의 영향을 신속하게 감소시키는 효과를 얻을 수 있다. 또한, 본 발명의 메디카고속(*Medicago*) 식물의 형질전환 방법에서 체세포배를 식물발달 배지에서 약 2~4주 배양하면 뿌리가 형성된 식물체로 발달하고, 뿌리가 형성된 식물체를 체세포배 균집 또는 식물체 균집에서 분리하여 당류를 제외한 기본 배지 또는 토양을 담은 화분에 식재함으로써 형질전환 식물체를 획득할 수 있다.

[0044] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것 일뿐, 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

[0046] **1. 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17의 체세포배 발생을 위한 최적 조건 규명**

[0048] **(1) 식물 형질전환용 벡터가 도입된 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 준비**

[0049] 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자 NPT II 와 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP) 유전자가 포함된 식물 형질전환용 벡터 pK7WG2D[Karimi et al., Trends Plant Sci. 2002 May;7(5):193-5.]를 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* EHA105)에 전기천공법으로 도입하였다. 이후, 식물 형질전환용 벡터가 도입된 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* EHA105)를 항생제인 스펙티노마이신(Spectinomycin)이 100 mg/ℓ 의 농도로 첨가된 TY/Ca 배지에 접종하고 28℃에서 배양한 후, 후술하는 공동배양 배지 CCM3에 OD600(Optical Density at 600nm)의 값이 0.5가 되도록 희석하여 아그로박테리움 현탁액을 조제하였다. 이하, 식물 형질전환용 벡터가 도입된 아그로박테리움 튜메파시엔스를 '아그로박테리움'으로 간략하게 표기한다.

[0051] **(2) 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17의 잎 절편과 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 공동배양**

[0052] 약 2개월 동안 성장한 메디카고 트룬카툴라 유전형 A17 (*Medicago truncatula* cultivar Jemalong A17) 식물체에서 잎을 채취하고, 채취한 잎을 70% 에탄올에서 1분 동안 침지하고 20% 락스 수용액(유효요소농도는 약 1%임)에 20분 동안 침지하여 표면을 소독하였다. 이후, 메스를 이용하여 한 개의 잎에서 3개씩, 직사각형 모양의 잎 절편을 제작하였다. 이후, 잎 절편을 앞에서 조제한 아그로박테리움 현탁액 현탁액에 침지하고, 20 InHg의 진공에서 20분 동안 처리하여 감염이 이뤄지도록 하였다. 이후, 잎 절편에 묻은 아그로박테리움 현탁액을 종이 타월에 흡수시켜 제거하고, 아그로박테리움으로 감염된 잎 절편을 공동배양 배지 CCM3에 치상한 후 22℃의 암 조건에서 3일 동안 공동배양하였다. 하기 표 1에 공동배양 배지 CCM3의 구성성분과 농도를 나타내었다.

표 1

[0053]

구성성분	농도
Schenk and Hildebrandt Basal Salt	1×
Sucrose	20 g/ℓ
B5 vitamins 용액	1×
Casein hydrolysates	0.5 g/ℓ
MES	0.5 g/ℓ
Calcium gluconate	0.5 g/ℓ
NAA	10 μM
BAP	4 μM
GELRITE	3 g/ℓ
Acetosyringone	100 μM

[0054]

* MES : 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

[0055]

* NAA : 1-Naphthaleneacetic acid

[0056]

* BAP : 6-Benzylaminopurine

[0057]

* GELRITE : Gellan gum

[0058]

하기 표 2에 공동배양 배지 CCM3의 구성성분으로 사용된 Schenk and Hildebrandt Basal Salt(1×)의 조성을 나타내었다. 또한, 하기 표 3에 공동배양 배지 CCM3의 구성성분으로 사용된 B5 vitamins 용액(1,000×)의 조성을 나타내었다. 공동배양 배지 CCM3에는 표 3에 표시된 B5 vitamins 용액(1,000×)이 1/1,000 농도로 첨가되었다.

표 2

[0059]

구성성분	농도
Ammonium phosphate, monobasic, H2O	300 mg/ℓ
Potassium nitrate	2500 mg/ℓ
Calcium chloride, 2H2O	175 mg/ℓ
Magnesium sulfate, 7H2O	400 mg/ℓ
Fe-EDTA, 3H2O	25 mg/ℓ
Manganese sulfate, H2O	10 mg/ℓ
Boric acid	5 mg/ℓ
Potassium iodide	1 mg/ℓ
Zinc sulfate, 7H2O	1 mg/ℓ
Cupric sulfate, 5H2O	0.2 mg/ℓ
Sodium molybdate, 2H2O	0.1 mg/ℓ
Cobalt chloride, 6H2O	0.1 mg/ℓ

표 3

[0061]

구성성분	농도
myo-inositol	100 g/ℓ
Nicotinic acid	1 g/ℓ
Pyridoxine HCl	1 g/ℓ
Thiamine HCl	10 g/ℓ

[0063]

(3) 켈러스 형성 조건의 최적화

[0064]

상기의 공동배양 후, 일 절편에 형성된 아그로박테리움을 멸균된 증류수로 씻어낸 후, 300 mg/ℓ 농도의 항생제 오그멘틴(Augmentin : Amoxicillin/clavulanic acid) 황산염 수용액에 담그고 실온에서 약 4 hr 동안 교반하였다. 또한, 켈러스 형성용 기본 배지에 40 mg/ℓ 농도의 카나마이신(Kanamycin)과 호르몬을 조합하여 다양한 켈러스 형성용 배지를 준비하였다. 이어서 일 절편의 물기를 제거하고, 다양한 켈러스 형성용 배지에 치상한 후, 약한 광 조건에서 4주 동안 배양한 결과, 모든 조합의 호르몬 조건에서 켈러스가 형성되었다.

[0065] 하기 표 4에 캘러스 형성용 기본 배지의 구성성분과 농도를 나타내었다. Schenk and Hildebrandt Basal Salt(1×)의 조성과 B5 vitamins 용액(1,000×)의 조성은 공동배양 배지에서 설명한 내용과 동일하므로 구체적인 설명을 생략한다.

표 4

구성성분	농도
Schenk and Hildebrandt Basal Salt	1×
Sucrose	20 g/ℓ
B5 vitamins 용액	1×
Casein hydrolysates	0.5 g/ℓ
MES	0.5 g/ℓ
Calcium gluconate	0.5 g/ℓ
L-alpha-(2-aminoethoxyvinyl) glycine (AVG)	1 μM
Augmentin	600 mg/ℓ
GELRITE	3 g/ℓ

[0067] * MES : 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

[0068] 또한, 하기 표 5에 캘러스 형성용 기본 배지에 첨가한 다양한 호르몬 조합을 사이토키닌(Cytokinin)과 옥신(Auxin)류으로 나누어 나타내었다. 상기 사이토키닌은 식물 호르몬의 한 종류로 식물의 성장을 조절하고 세포분열을 촉진하는 역할을 하는 물질을 가르킨다. 사이토키닌의 종류로는 키네티ن, 제아틴(Zeatin), 6-벤질아미노퓨린(6-benzylaminopurine, BAP)과 같은 아데닌 유도체형과 디페닐우레아(diphenylurea)와 티디아주론(thidiazuron, TDZ)와 같은 페닐요소(phenylurea) 유도체형이 있다. 또한, 상기 옥신은 식물의 성장을 촉진하는 식물 성장 호르몬 중 하나로서 협의로는 인돌아세트산(Indole acetic acid, IAA)을 가리키나 광의로는 인돌아세트산과 같은 작용을 하는 천연 화합물 및 합성 화합물을 모두 포함하며, 광의의 옥신을 옥신류(Auxins)라고 한다. 상기 옥신류에는 PAA(2-phenylacetic acid), IBA(Indole-3-butyric acid), IPA(Indole-3-propionic acid)와 같은 천연 화합물뿐만 아니라 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid); NAA(1-Naphthalene acetic acid); 2,4,5-T(2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid) 등과 같은 합성 화합물이 모두 포함된다.

표 5

Cytokinin	Auxins	
	2,4-D	NAA
2.5 μM TDZ	5 μM	-
2.5 μM TDZ	10 μM	-
2.5 μM TDZ	20 μM	-
2.5 μM TDZ	40 μM	-
2.5 μM TDZ	-	5 μM
2.5 μM TDZ	-	10 μM
4 μM BAP	5 μM	-
4 μM BAP	10 μM	-
4 μM BAP	20 μM	-
4 μM BAP	40 μM	-
4 μM BAP	-	5 μM
4 μM BAP	-	10 μM
5 μM Zeatin	5 μM	-
5 μM Zeatin	10 μM	-
5 μM Zeatin	20 μM	-
5 μM Zeatin	40 μM	-
5 μM Zeatin	-	5 μM
5 μM Zeatin	-	10 μM

[0070] * TDZ : Thidiazuron

[0071] * BAP : 6-Benzylaminopurine

[0072] * 2,4-D : 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

[0073] * NAA : 1-Naphthaleneacetic acid

[0075] 상기의 모든 캘러스 형성용 배지에서 캘러스가 형성되었지만, 형성된 캘러스(캘러스가 형성된 잎 절편 또는 분리된 캘러스 덩어리)를 후술하는 최적 체세포배 발생용 배지 EID3에 옮겨 배양한 결과 10 μ M의 NAA와 4 μ M의 BAP 호르몬 조합을 갖는 캘러스 형성용 배지에서 캘러스를 형성한 후 체세포배 발생용 배지 EID3에 배양하였을 때 가장 높은 배 발생 캘러스 빈도를 보였다. 구체적으로, 다양한 호르몬 조합의 캘러스 형성용 배지에서 형성된 캘러스를 40 mg/l 농도의 카나마이신(Kanamycin)이 첨가된 체세포배 발생용 배지 EID3으로 옮겨 4주 동안 배양하였다. 그 결과, 10 μ M NAA와 4 μ M BAP의 조합을 가진 캘러스 형성용 배지에서 캘러스를 형성한 후 체세포배 발생용 배지 EID3에 배양하였을 때 배 발생 캘러스가 형성된 잎 절편의 비율은 38%이고 잎 절편당 발생한 체세포배의 수는 2.875개로 다른 호르몬 조합의 캘러스 형성용 배지에 비해 현저히 높은 값을 보였다. 하기 표 6에 캘러스 형성용 배지의 호르몬 조합 조건에 따른 배 발생 캘러스가 형성된 잎 절편의 비율(%)을 나타내었고 하기 표 7에 캘러스 형성용 배지의 호르몬 조합 조건에 따른 잎 절편당 배 발생 캘러스의 수를 나타내었다.

표 6

[0076]

Cytokinin	Auxins(μ M)					
	2,4-D				NAA	
	5	10	20	40	5	10
2.5 μ M TDZ	13%	0%	0%	0%	13%	6%
4 μ M BAP	19%	0%	13%	0%	25%	38%
5 μ M Zeatin	6%	6%	0%	0%	13%	6%

표 7

[0078]

Cytokinin	Auxins(μ M)					
	2,4-D				NAA	
	5	10	20	40	5	10
2.5 μ M TDZ	0.25	0	0	0	0.375	0.25
4 μ M BAP	1.375	0	0.25	0	1.875	2.875
5 μ M Zeatin	0.25	0.125	0	0	0.375	0.25

[0079] 상기 표 6 및 표 7의 결과로부터 10 μ M NAA와 4 μ M BAP의 호르몬 조합을 가진 캘러스 형성용 배지를 최적 배지로 선택하고 상기 배지를 CIM3으로 명명하였다. 하기 표 8에 최적 캘러스 형성용 배지인 CIM3의 구성성분과 농도를 나타내었다.

표 8

[0080]

구성성분	농도
Schenk and Hildebrandt Basal Salt	1 \times
Sucrose	20 g/l
B5 vitamins 용액	1 \times
Casein hydrolysates	0.5 g/l
MES	0.5 g/l
Calcium gluconate	0.5 g/l
NAA	10 μ M
BAP	4 μ M
L-alpha-(2-aminoethoxyvinyl) glycine (AVG)	1 μ M
Augmentin	600 mg/l
GELRITE	3 g/l

[0082] (4) 체세포배 발생 조건의 최적화

[0083] 체세포배 발생용 기본 배지에 40 mg/l 농도의 카나마이신(Kanamycin)과 호르몬을 조합하여 다양한 체세포배 발생용 배지를 준비하였다. 캘러스 형성용 배지 CIM3에서 4주 동안 배양하여 캘러스가 형성된 잎 절편 또는 분리

된 캘러스 덩어리를 다양한 체세포배 발생용 배지로 옮기고, 광 조건 및 28℃의 온도 조건에서 4주 동안 배양하여 체세포배 발생을 유도하였다.

[0084] 하기 표 9에 체세포배 발생용 기본 배지의 구성성분과 농도를 나타내었다. Schenk and Hildebrandt Basal Salt(1×)의 조성과 B5 vitamins 용액(1,000×)의 조성은 공동배양 배지에서 설명한 내용과 동일하므로 구체적인 설명을 생략한다.

표 9

구성성분	농도
Schenk and Hildebrandt Basal Salt	1×
Sucrose	20 g/ℓ
B5 vitamins 용액	1×
Casein hydrolysates	0.5 g/ℓ
MES	0.5 g/ℓ
Calcium gluconate	0.5 g/ℓ
L-alpha-(2-aminoethoxyvinyl) glycine (AVG)	1 μM
Augmentin	300 mg/ℓ
GELRITE	3 g/ℓ

[0086] * MES : 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

[0087] 또한, 하기 표 10에 체세포배 발생용 기본 배지에 첨가한 다양한 호르몬 조합을 나타내었다.

표 10

NAA	TDZ	BAP
0.5 μM	1 μM	-
0.5 μM	2 μM	-
0.5 μM	4 μM	-
0.5 μM	-	4 μM
0.5 μM	-	10 μM
0.5 μM	-	17 μM
1 μM	1 μM	-
1 μM	2 μM	-
1 μM	4 μM	-
1 μM	-	4 μM
1 μM	-	10 μM
1 μM	-	17 μM
4 μM	1 μM	-
4 μM	2 μM	-
4 μM	4 μM	-
4 μM	-	4 μM
4 μM	-	10 μM
4 μM	-	17 μM

[0089] 다양한 체세포배 발생용 배지에서 캘러스를 4주 동안 배양한 후, 체세포배가 발달한 잎 절편의 수와, 잎 절편당 발생한 체세포배의 수를 측정하여 최적의 호르몬 조합을 선택하였다. 도 1은 메디카고 트룬카툴라 유전형 A17 (*Medicago truncatula cultivar Jemalong A17*) 식물체의 잎 절편을 식물 형질전환용 벡터가 도입된 아그로박테리움 튜메파시엔스로 감염시키고 공동배양 배지 CCM3에서 공동배양한 후, 캘러스 형성용 배지인 CIM3에서 배양하여 캘러스를 형성하고, 형성한 캘러스를 다양한 호르몬 조합의 체세포배 발생용 배지에서 배양하였을 때 체세포배가 발생한 잎 절편의 비율(%)를 나타낸 것이다. 도 2는 메디카고 트룬카툴라 유전형 A17 (*Medicago truncatula cultivar Jemalong A17*) 식물체의 잎 절편을 식물 형질전환용 벡터가 도입된 아그로박테리움 튜메파시엔스로 감염시키고 공동배양 배지 CCM3에서 공동배양한 후, 캘러스 형성용 배지인 CIM3에서 배양하여 캘러스를 형성하고, 형성한 캘러스를 다양한 호르몬 조합의 체세포배 발생용 배지에서 배양하였을 때 잎 절편당 발생한 체세포배의 수를 나타낸 것이다. 도 1 및 도 2에서 보이는 바와 같이 1 μM NAA와 2 μM TDZ의 호르몬 조합

을 가진 체세포배 발생용 배지에서 체세포배가 발생한 잎 절편의 비율이 88%이고 잎 절편당 체세포배의 수가 5.1개로 가장 높았다. 이는 다음으로 높은 빈도를 보인 4 μM NAA와 2 μM TDZ의 호르몬 조합을 가진 체세포배 발생용 배지에 비해 현저히 높은 효과이다.

[0090] 도 1 및 도 2에 보이는 결과로부터 1 μM NAA와 2 μM TDZ의 호르몬 조합을 가진 체세포배 발생용 배지를 최적 배지로 선택하고 상기 배지를 EID3으로 명명하였다. 하기 표 11에 최적 체세포배 발생용 배지인 EID3의 구성 성분과 농도를 나타내었다.

표 11

구성성분	농도
Schenk and Hildebrandt Basal Salt	1×
Sucrose	20 g/ℓ
B5 vitamins 용액	1×
Casein hydrolysates	0.5 g/ℓ
MES	0.5 g/ℓ
Calcium gluconate	0.5 g/ℓ
NAA	1 μM
TDZ	2 μM
L-alpha-(2-aminoethoxyvinyl) glycine (AVG)	1 μM
Augmentin	300 mg/ℓ
GELRITE	3 g/ℓ

[0093] 2. 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체의 생산

[0095] (1) 형질전환 유전자 재조합 벡터의 제작 및 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 준비

[0096] 카나마이신(Kanamycin) 선발 체계로서, 메디카고 지베렐린(Gibberellin) 분해효소인 GA2-oxidase 10(MtGA2ox10) 유전자의 과발현 벡터를 제작하고, 이를 아그로박테리움 튜메파시엔스 EHA105에 도입하여 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17의 형질전환에 사용하였다. 구체적으로, 먼저 메디카고의 first strand cDNA를 주형으로 하여 MtGA2ox10 유전자를 증폭하고, Gateway™ (Invitrogen, USA) 실험절차에 따라 pDONR221 플라스미드에 클로닝 한 후, 이것을 다시 바이너리 벡터인 pK7WG2D(Karimi et al., 2002)에 재조합한 플라스미드 GA2ox10-OX를 제작하였다. 상기 pK7WG2D 벡터는 식물 선발마커로서 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자 NPT II와 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP) 유전자를 지니고 있다. 또한, 상기 MtGA2ox10 유전자를 증폭할 증폭하기 위한 프라이머 및 염기서열은 다음과 같다.

[0097] * 순방향 프라이머 : 5'-AAAAAGCAGGCTcATGATTGACTCAAATCCACC-3'

[0098] * 역방향 프라이머 : 5'-AGAAAGCTGGGTcCTAAGCCATGGTCGTTGTGT-3'

[0099] 이후, 아그로박테리움 튜메파시엔스 EHA105 (*Agrobacterium tumefaciens* EHA105)에 GA2ox10-OX 플라스미드를 전기천공법으로 도입하고, 항생제인 스펙티노마이신(Spectinomycin)이 100 mg/ℓ의 농도로 첨가된 TY/Ca 배지에 접종하고 28℃에서 배양한 후, 공동배양 배지 CCM3에 OD600(Optical Density at 600nm)의 값이 0.5가 되도록 희석하여 아그로박테리움 현탁액을 조제하였다.

[0101] (2) 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17의 잎 절편과 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 공동배양

[0102] 메디카고 트룬카툴라 유전형 A17 (*Medicago truncatula* cultivar Jemalong A17)을 화분에서 약 2개월 동안 키운 후, 잎을 채취하였다. 이후, 채취한 잎을 70% 에탄올에서 1분 동안 교반하여 표면을 소독하였고, 이어서 20% 락스 수용액(유효염소농도는 약 1%임) 및 약간의 Tween-20으로 구성된 용액에 첨가한 후 20분 동안 살균하였다. 이후, 락스 수용액을 제거하고, 멸균 증류수로 잎을 세척하여 잎 표면에 존재하는 락스 성분을 모두 제거하였다. 이후, 살균처리 한 잎의 물기를 종이 타월로 제거하였다. 이후, 메스를 이용하여 한 개의 잎에서 3개씩, 직사각형으로 잎 절편을 제작하였다. 이후, 앞에서 조제한 아그로박테리움 현탁액 현탁액에 잎 절편을 담그고, 진공자에 넣어 20분간 약 20 InHg의 진공을 걸어 감염이 이뤄지도록 하였다. 진공을 해제한 후, 잎 절편

에 묻은 아그로박테리움 현탁액을 종이타월에 흡수시켜 일부 제거하고 공동배양 배지 CCM3에 치상하고 22℃의 암 조건에서 3일 동안 공동배양하였다.

[0104] (3) 캘러스 형성 유도

[0105] 상기의 공동배양 후, 잎 절편의 표면에 콜로니를 형성한 아그로박테리움을 제거하고, 캘러스 형성용 배지 CIM3에 치상하여 배 발생 캘러스의 형성을 유도하였다. 구체적으로, 잎 절편 표면의 아그로박테리움을 제거하기 위하여, 잎 절편을 4~5차례 반복하여 멸균증류수에 담그고 교반하여 아그로박테리움을 씻어내고, 300 mg/ℓ 농도의 오그멘틴 황산염 수용액에 담그고 실온에서 4 hr 동안 교반하여 항생제가 잎 절편으로 흡수되도록 하였다. 이후, 잎 절편을 종이 타월에 닿게 하여 물기를 제거하고, 40 mg/ℓ 농도의 카나마이신(Kanamycin)이 첨가된 캘러스 형성용 배지 CIM3에 치상하고, 약한 광 조건에서 배양하였다. 약 2~3주 후 새로운 배지로 옮겨주었으며, 아그로박테리움이 자라나온 경우는 위의 방법에 따라 아그로박테리움을 제거하고 새로운 배지로 옮겨 주었다. 약 4~6주 후 대부분의 잎 절편에 캘러스가 형성되었다.

[0107] (4) 체세포배 발생 유도 및 형질전환 식물체의 수득

[0108] 캘러스가 형성된 잎 절편 또는 분리한 캘러스 덩어리를 40 mg/ℓ 농도의 카나마이신(Kanamycin)이 첨가된 체세포배 발생용 배지 EID3로 옮기고 배양하였다. 그 결과, 체세포배 발생용 배지 EID3에서 배양한 지 약 2주 경과 후, 체세포배의 발달이 관찰되었고, 6~8주 후 2차 배 발생으로 진전되어 다발 내지 군집을 형성하였다. 이후, 일차 체세포배 또는 이차 체세포배의 다발 내지 군집을 50 mg/ℓ 농도의 카나마이신(Kanamycin)이 첨가된 식물발달 배지 SDM3으로 옮겨 배양하였고, 그 결과 완전한 식물체로 발달하였다. 도 3은 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체의 생산 과정 중 체세포배 발생 및 식물체로의 발달 과정을 나타낸 것이다. 도 3의 A는 캘러스를 체세포배 발생용 배지 EID3로 옮기고 4주간 배양하였을 때 체세포배가 발생한 모습을 나타낸 것이고, 도 3의 B는 체세포배 발생용 배지 EID3 상에서 발생한 일차 체세포배(primary somatic embryo) 및 이차 배 형성(secondary embryogenesis)이 반복되는 것을 화살표로 표시한 것이고, 도 3의 C는 식물발달 배지 SDM3으로 옮겨 배양하였을 때 발달한 식물체의 모습을 나타낸 것이다.

[0109] 줄기와 잎이 완전히 전개되고 뿌리가 발달한 식물체를 화분 토양에 심어 성장시켜 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17의 형질전환 식물체를 수득하였다. 하기 표 12에 식물발달 배지 SDM3의 구성성분과 농도를 나타내었다.

표 12

구성성분	농도
Schenk and Hildebrandt Basal Salt	1×
Sucrose	10 g/ℓ
B5 vitamins 용액	1×
MES	0.5 g/ℓ
Calcium gluconate	0.5 g/ℓ
L-alpha-(2-aminoethoxyvinyl) glycine (AVG)	1 μM
Plant agar	8 g/ℓ

[0112] (5) 식물체의 형질전환 여부 검증

[0113] 앞에서 수득한 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17의 형질전환 식물체의 형질전환 여부를 형질전환 벡터에 포함된 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP)이 식물체에 도입되었는지 여부로 검증하였다. 구체적으로, 수득한 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17의 형질전환 식물체를 형광현미경으로 검사하여 녹색 형광이 나타나는지 여부를 관찰하였다. 또한, 중합효소연쇄반응(PCR)을 이용하여 수득한 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17의 형질전환 식물체로부터 GFP 유전자를 증폭하고 증폭 산물에 GFP 유전자가 존재하는지 여부를 측정하였다. 상기 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17의 형질전환 식물체로부터 GFP 유전자를 증폭하기 위해 사용한 프라이머 및 염기서열은 다음과 같다.

[0114] * 순방향 프라이머 : 5'-TTCATCTGACCACCGCAAG-3'

[0115] * 역방향 프라이머 : 5'-GATCGCGCTTCTCGTTGGGGT-3'

- [0117] **(6) 실험 결과**
- [0118] 도 4는 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체의 생산 과정을 단계별로 나타낸 것이다. 도 4에 나타난 각 단계별 내용은 다음과 같다.
- [0119] * 단계 A : 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체의 잎 절편을 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)로 감염시키고 공동배양 배지 CCM3에 치상한 모습이다.
- [0120] * 단계 B : 공동배양한 잎 절편을 캘러스 형성용 배지 CIM3로 옮겨 배양하고 캘러스 형성을 유도하는 모습으로서, 위쪽은 배양 2주차 모습이고 아래쪽은 형광현미경으로 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP) 형광을 관찰한 모습이다.
- [0121] * 단계 C : 캘러스가 형성된 잎 절편을 체세포배 발생용 배지 EID3로 옮겨 배양하였을 때 체세포배가 발생한 모습이다.
- [0122] * 단계 D : 체세포배 발생용 배지 EID3 상에서 이차 배 발생이 반복되어 체세포배 다발을 형성한 모습이다.
- [0123] * 단계 E : 식물발달 배지 SDM3 상에서 식물체 줄기와 잎이 형성된 모습이다.
- [0124] * 단계 F : 화분에 심어 생육시킨 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체의 모습이다.
- [0125] 도 5는 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체의 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP) 형광을 관찰한 결과이다. 도 5의 A는 형광을 조사하기 전의 모습이고 도 5의 B는 형광현미경으로 관찰한 모습이다. 도 5에서 보이는 바와 같이 형질전환 식물체는 형광현미경 검사에서 잎의 줄기 부분에 뚜렷한 녹색 형광을 나타내었다.
- [0126] 도 6은 연쇄증합효소반응(PCR)을 이용하여 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체 내의 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP) 유전자를 확인한 결과이다. 도 6에서 보이는 바와 같이 조사 대상 23개의 형질전환 식물체 모두에서 양성 대조시료로 사용한 벡터 플라스미드 GA2ox10-OX와 동일한 514 bp 크기의 증폭 DNA를 나타내었다. 따라서, 모든 식물체에서 형질전환이 일어났음을 알 수 있다.
- [0128] **3. 바스타(Basta) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체의 생산**
- [0130] **(1) 형질전환 유전자 재조합 벡터의 제작 및 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 준비**
- [0131] 바스타(Basta) 선발 체계로서, CRISPR/Cas9 벡터인 pGK3304 플라스미드를 아그로박테리움 튜메파시엔스 EHA105에 도입하여 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17의 형질전환에 사용하였다. 상기 바스타(Basta)는 글루포시네이트(Glufosinate) 성분의 제초제 상품 브랜드이다. 또한, 상기 pGK3304 플라스미드는 식물 선발마커로서 바스타(Basta) 저항성 유전자 Bar, 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP) 유전자 및 Cas9 유전자를 지니고 있다. 아그로박테리움 튜메파시엔스 EHA105 (*Agrobacterium tumefaciens* EHA105)에 pGK3304 플라스미드를 전기천공법으로 도입하고, 항생제인 스펙티노마이신(Spectinomycin)이 100 mg/l의 농도로 첨가된 TY/Ca 배지에 접종하고 28℃에서 배양한 후, 공동배양 배지 CCM3에 OD600(Optical Density at 600nm)의 값이 0.5가 되도록 희석하여 아그로박테리움 현탁액을 조제하였다.
- [0133] **(2) 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17의 잎 절편과 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 공동배양**
- [0134] 메디카고 트룬카툴라 유전형 A17 (*Medicago truncatula* cultivar Jemalong A17)을 화분에서 약 2개월 동안 키운 후, 잎을 채취하였다. 이후, 채취한 잎을 70% 에탄올에서 1분 동안 교반하여 표면을 소독하였고, 이어서 20% 락스 수용액(유효염소농도는 약 1%임) 및 약간의 Tween-20으로 구성된 용액에 첨가한 후 20분 동안 살균하였다. 이후, 락스 수용액을 제거하고, 멸균 증류수로 잎을 세척하여 잎 표면에 존재하는 락스 성분을 모두 제거하였다. 이후, 살균처리 한 잎의 물기를 종이 타월로 제거하였다. 이후, 메스를 이용하여 한 개의 잎에서 3개씩, 직사각형으로 잎 절편을 제작하였다. 이후, 앞에서 조제한 아그로박테리움 현탁액 현탁액에 잎 절편을 담그고, 진공자에 넣어 20분간 약 20 InHg의 진공을 걸어 감염이 이뤄지도록 하였다. 진공을 해제한 후, 잎 절편에 묻은 아그로박테리움 현탁액을 종이타월에 흡수시켜 일부 제거하고 공동배양 배지 CCM3에 치상하고 22℃의

암 조건에서 3일 동안 공동배양하였다.

[0136] (3) 캘러스 형성 유도

[0137] 상기의 공동배양 후, 잎 절편의 표면에 콜로니를 형성한 아그로박테리움을 제거하고, 캘러스 형성용 배지 CIM3에 치상하여 배 발생 캘러스의 형성을 유도하였다. 구체적으로, 잎 절편 표면의 아그로박테리움을 제거하기 위하여, 잎 절편을 4~5차례 반복하여 멸균증류수에 담그고 교반하여 아그로박테리움을 씻어내고, 300 mg/l 농도의 오그멘틴 황산염 수용액에 담그고 실온에서 4 hr 동안 교반하여 항생제가 잎 절편으로 흡수되도록 하였다. 이후, 잎 절편을 종이 타월에 닿게 하여 물기를 제거하고, 3 mg/l 농도의 바스타(Basta)가 첨가된 캘러스 형성용 배지 CIM3에 치상하고, 약한 광 조건에서 배양하였다. 약 2~3주 후 새로운 배지로 옮겨주었으며, 아그로박테리움이 자라나온 경우는 위의 방법에 따라 아그로박테리움을 제거하고 새로운 배지로 옮겨 주었다. 약 4~6주 후 대부분의 잎 절편에 캘러스가 형성되었다.

[0139] (4) 체세포배 발생 유도 및 형질전환 식물체의 수득

[0140] 캘러스가 형성된 잎 절편 또는 분리한 캘러스 덩어리를 5 mg/l 농도의 바스타(Basta)가 첨가된 체세포배 발생용 배지 EID3로 옮겨 배양하였다. 그 결과, 체세포배 발생용 배지 EID3에서 배양한 지 약 2주 경과 후, 체세포배의 발달이 관찰되었고, 6~8주 후 2차 배 발생으로 진전되어 다발 내지 군집을 형성하였다. 이후, 일차 체세포배 또는 이차 체세포배의 다발 내지 군집을 5 mg/l 농도의 바스타(Basta)가 첨가된 식물발달 배지 SDM3으로 옮겨 배양하였고, 그 결과 완전한 식물체로 발달하였다. 줄기와 잎이 완전히 전개되고 뿌리가 발달한 식물체를 화분 토양에 심어 생장시켜 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17의 형질전환 식물체를 수득하였다.

[0142] (5) 식물체의 형질전환 여부 검증

[0143] 앞에서 수득한 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17의 형질전환 식물체의 형질전환 여부를 형질전환 벡터에 포함된 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP)이 식물체에 도입되었는지 여부로 검증하였다. 구체적으로, 수득한 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17의 형질전환 식물체를 형광현미경으로 검사하여 녹색 형광이 나타나는지 여부를 관찰하였다. 또한, 중합효소연쇄반응(PCR)을 이용하여 수득한 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17의 형질전환 식물체로부터 GFP 유전자를 증폭하고 증폭 산물에 GFP 유전자가 존재하는지 여부를 측정하였다. 상기 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17의 형질전환 식물체로부터 GFP 유전자를 증폭하기 위해 사용한 프라이머 및 염기서열은 다음과 같다.

[0144] * 순방향 프라이머 : 5'-TTCATCTGCACCACCGCAAG-3'

[0145] * 역방향 프라이머 : 5'-GATCGCGCTTCTCGTTGGGGT-3'

[0147] (6) 실험 결과

[0148] 도 7은 바스타(Basta) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체의 생산 과정을 단계별로 나타낸 것이다. 도 7에 나타난 각 단계별 내용은 다음과 같다.

[0149] * 단계 A : 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체의 잎 절편을 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)로 감염시키고 공동배양 배지 CCM3에 공동배양한 후 잎 절편을 캘러스 형성용 배지 CIM3로 옮겨 배양하고 캘러스 형성을 유도하는 모습으로서, 위쪽은 배양 2주차 모습이고 아래쪽은 형광현미경으로 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP) 형광을 관찰한 모습이다.

[0150] * 단계 B : 캘러스 형성용 배지 CIM3에서 4주간 배양하였을 때 배 발생 캘러스가 형성된 모습(화살표로 표시함)을 나타낸 것이다.

[0151] * 단계 C : 캘러스가 형성된 잎 절편을 체세포배 발생용 배지 EID3로 옮겨 4주간 배양하였을 때 체세포배가 발생한 모습이다.

[0152] * 단계 D : 체세포배가 발생한 캘러스를 식물발달 배지 SDM3 상에서 옮겨 배양하였을 때 식물체로 발달 중인 모습이다.

[0153] * 단계 E : 화분에 심어 생육시킨 바스타(Basta) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체의 모습이다.

[0154] 도 8은 바스타(Basta) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체의 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP) 형광을 관찰한 결과이다. 도 8의 A는 형광을 조사하기 전

의 모습이고 도 8의 B는 형광현미경으로 관찰한 모습이다. 도 8에서 보이는 바와 같이 형질전환 식물체는 형광 현미경 검사에서 잎의 줄기 부분에 뚜렷한 녹색 형광을 나타내었다.

[0155] 도 9는 연쇄증합효소반응(PCR)을 이용하여 바스타(Basta) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트런카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체 내의 녹색형광단백질(Green fluorescent protein, GFP) 유전자를 확인한 결과이다. 도 9에서 보이는 바와 같이 조사 대상 23개의 형질전환 식물체 모두에서 양성 대조시료로 사용한 벡터 플라스미드 pGK3304와 동일한 514 bp 크기의 증폭 DNA를 나타내었다. 따라서, 모든 식물체에서 형질전환이 일어났음을 알 수 있다.

[0157] **4. 종래 체세포배 발생 방법과의 형질전환 효율 비교**

[0158] 종래 방법 중에서 체세포배 발생 효율이 높고 메디카고 트런카툴라 A17 유전형에 적용이 가능하다고 주장된 방법의 체세포배 발생용 배지 P4 10:4:1:5(Nolan et al., 2014, PLOS ONE, Volume 9, Issue 6, e99908)를 본 발명의 체세포배 발생용 배지인 EID3와 비교하였다. 하기 표 13에 체세포배 발생용 배지 P4 10:4:1:5의 구성성분과 농도를 나타내었다.

표 13

구성성분	농도
B5 Basal Salt	1×
Sucrose	30 g/ℓ
B5 vitamins 용액	1×
MES	0.5 g/ℓ
Casein hydrolysates	0.5 g/ℓ
NAA	10 μM
BAP	4 μM
ABA	1 μM
GA	5 μM
Plant agar	8 g/ℓ

[0160] * NAA : 1-Naphthaleneacetic acid

[0161] * BAP : 6-Benzylaminopurine

[0162] * ABA : Abscisic Acid

[0163] * GA : Gibberellic Acid

[0164] 체세포배 발생용 배지 P4 10:4:1:5의 특징은 10 μM NAA 및 4 μM BAP의 호르몬 조합에 체세포배 발생 촉진을 위해서 1 μM ABA와 5 μM의 GA를 추가한 것으로서, 메디카고 트런카툴라 2HA 유전형에서 높은 체세포배 발생 효율을 나타내었고, A17 유전형에도 낮은 효율로 체세포배가 발생한다고 주장된 바 있다.

[0165] 종래의 체세포배 발생용 배지 P4 10:4:1:5 와 본 발명의 체세포배 발생용 배지 EID3의 메디카고 트런카툴라 A17에 대한 체세포배 발생 효율을 비교하기 위해 캘러스 형성용 배지로 Nolan et al.에서 사용한 P4 10:4(10 μM NAA, 4 μM BAP)를 사용하고 체세포배 발생용 배지로 Nolan et al.에서 사용한 P4 10:4:1:5를 사용한 것을 제외하고는 앞에서 기술한 방법과 동일한 방법으로 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트런카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체 및 바스타(Basta) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트런카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체를 생산하였다. 종래의 방법과 본 발명의 체세포배 발생 효율을 체세포배가 발생한 잎 절편의 비율(%) 및 잎 절편당 발생한 체세포배의 수로 평가하였다. 도 10은 Nolan et al.의 캘러스 형성용 배지 및 체세포배 발생용 배지를 사용하여 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트런카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체를 생산하였을 때와 본 발명의 캘러스 형성용 배지 및 체세포배 발생용 배지를 사용하여 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트런카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체를 생산하였을 때의 체세포배 발생을 나타낸 것이다. 도 10에서 왼쪽은 종래의 방법을 사용하였을 때의 결과이고 오른쪽은 본 발명의 방법을 사용하였을 때의 결과이다. 종래 방법으로 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트런카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체를 생산하였을 때, 체세포배가 발생한 잎 절편의 비율(%)은 약 8%이고 잎 절편당 발생한 체세포배의 수는 약 0.1개인 것으로 나타났다. 반면, 본 발명의 방법으로 카나마이신(Kanamycin) 저항성 유전자에 의해 형

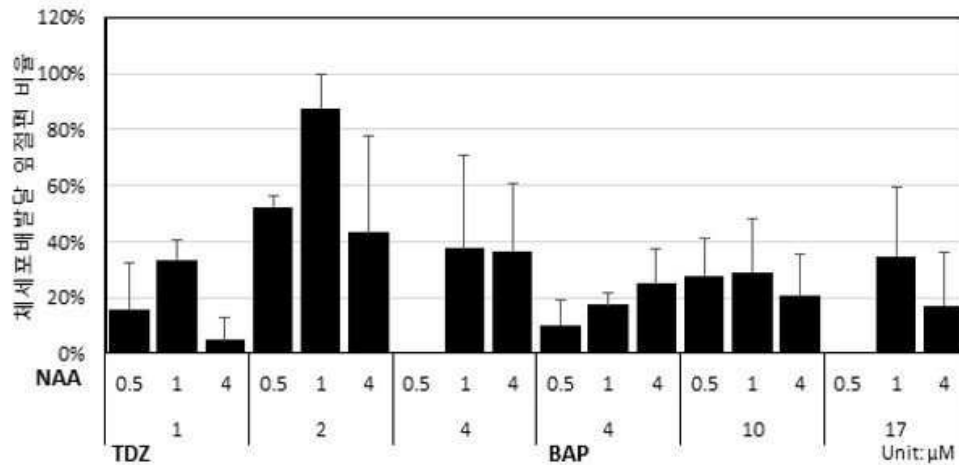
절편화된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체를 생산하였을 때, 체세포배가 발생한 잎 절편의 비율(%)은 약 86%이고 잎 절편당 발생한 체세포배의 수는 약 4.78개인 것으로 나타났다. Nolan et al.의 캘러스 형성용 배지 및 체세포배 발생용 배지를 사용하여 바스타(Basta) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체를 생산하였을 때와 본 발명의 캘러스 형성용 배지 및 체세포배 발생용 배지를 사용하여 바스타(Basta) 저항성 유전자에 의해 형질전환된 메디카고 트룬카툴라(*Medicago truncatula*) A17 식물체를 생산하였을 때에도 유사한 결과를 보였다. 결과적으로, 본 발명의 체세포배 발생용 배지 EID3는 종래의 체세포배 발생용 배지 P4 10:4:1:5에 비해 약 10배 이상 높은 체세포배 발생 효율을 보였다.

[0167]

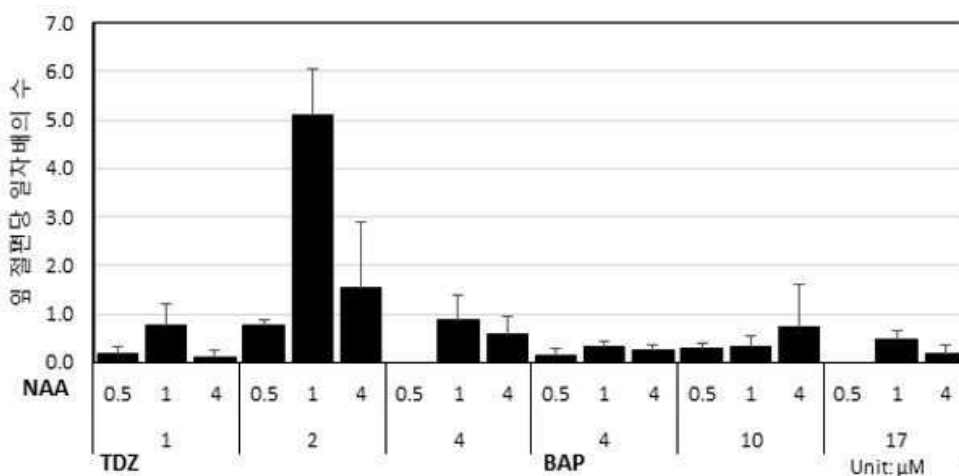
이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

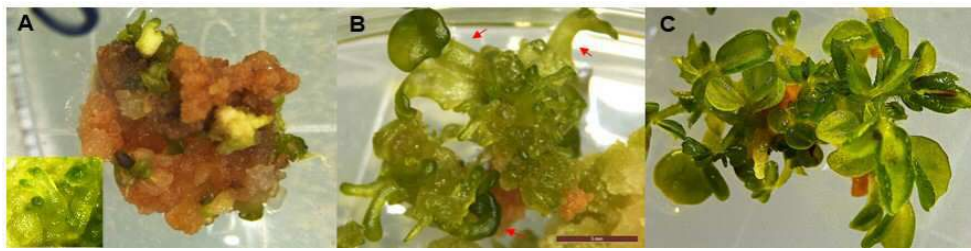
도면1



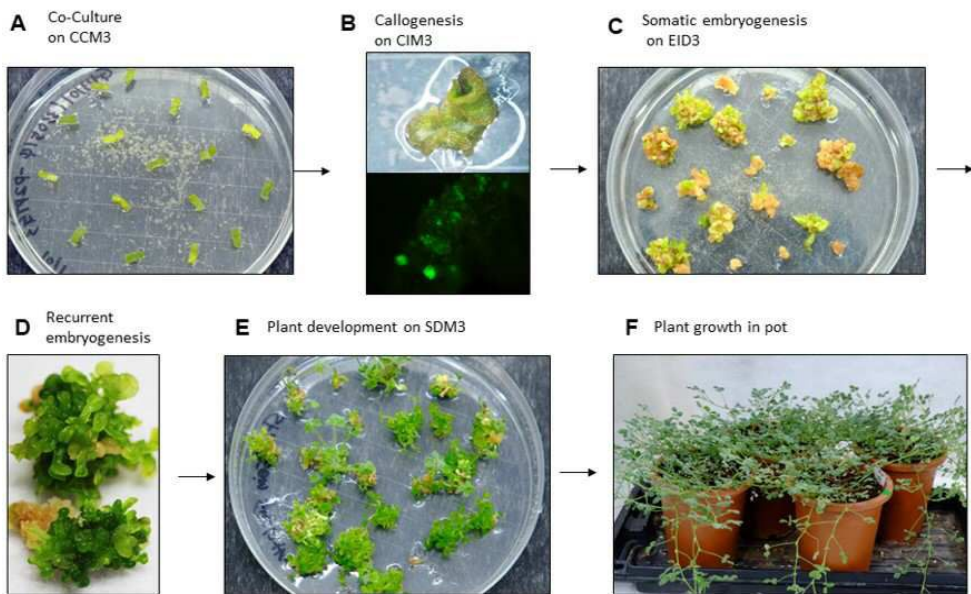
도면2



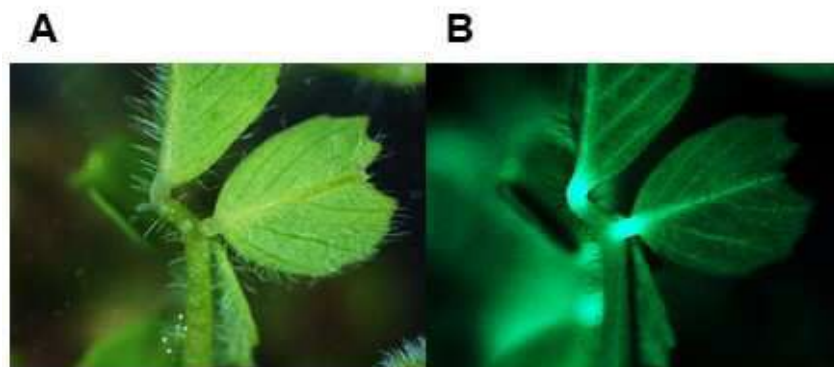
도면3



도면4



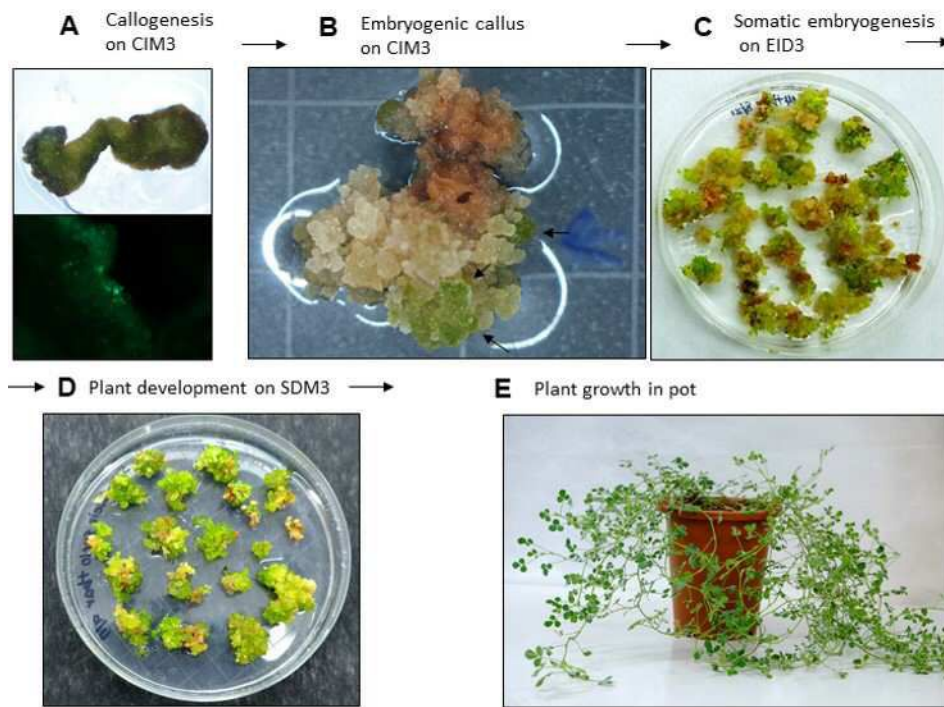
도면5



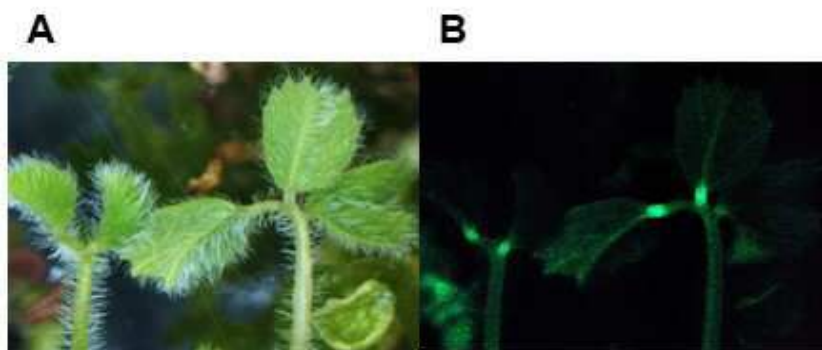
도면6



도면7



도면8



도면9



도면10

P4



EID3

