포장생육 잔디 포복경을 이용한 잔디 형질전환에 있어서 살균방법의 영향

안나영¹ · 알람 이프테칼¹ · 김용구¹ · 배은지² · 이광수² · 이병현^{1*}

¹경상대학교 응용생명과학부(BK21), 농업생명과학연구원, 진주 660-701,

²국립산림과학원 남부산림자원연구소, 진주 660-300

Effect of Surface Sterilization Method on *Agrobacterium*-mediated Transformation of Field-grown Zoysiagrass Stolon

Na-Young Ahn¹, Iftekhar Alam¹, Yong-Goo Kim¹, Eun-Ji Bae², Kwang-Soo Lee² and Byung-Hyun Lee^{1*}

¹Division of Applied Life Science (BK21 program), IALS, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea,

²Southern Forest Research Center, Korea Forest Research Institute, Jinju 660-300, Korea

ABSTRACT

Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) is an important forage and turfgrass that spreads by stolons and rhizomes. Zoysiagrass stolon can be used directly for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation by exploiting the potential of direct shoot formation. However, surface sterilization of field-grown stolons is difficult and remains to be explored. We developed an effective surface sterilization and culture method using the stolon explant for infection with *Agrobacterium tumefaciens*. Among various treatments, sequential disinfection in 30% bleach for 15 min followed by 0.1% mercuric chloride for 25 min resulted in the highest number of clean stolons. The efficacy of mercuric chloride was increased under vacuum conditions by incubating at 800 mbar for 5 min. The inclusion of 2.5 mg/l amphotericin B further prevents fungal growth in *in vitro* cultures. This protocol would speed up the development of transgenic plants by utilizing field-grown stolon nodes.

(**Key words** : Genetic transformation, *In vitro*, Stolon, Surface sterilization, Zoysiagrass)

I. 서 론

잔디는 한국, 중국 및 일본 등의 아시아지역에서 유래된 난지형 다년생 초종이다. 잔디는 주로 지하경과 땅 위를 기는 포복경에 의해 밀집도를 높게 형성하는 특성을 가지고 있다. 지금까지 잔디는 주로 지피식물로 알려져 있으나, 우리나라를 포함해 일본 및 많은 아시아 국가에서는 잔디 우점 초지를 방목용으로 이용하고 있다(Dhital et al., 2010). 잔디로 조성된 초지는 목초생산성이 높을 뿐만 아니라, 높은 방목강도에도 잘 견디는 것으로 알려져 있다(Ito and Takatsuki, 2005). 또한 잔디는 C4 광합성을 통한 높은 광합성효율과 용수율을 지니는 작물이기도 하다(Carmo-Silva et al., 2009; Osborne and Freckleton, 2009). 더욱이 내한성과 내서성이 좋아 다양한 기후에 잘 적응하며, 관리가 편리한 것으로 알려져 있어서 미국을 비롯한 많은 나라에서 널리 재배되고 있다(Toyama et al., 2003).

지금까지 잔디에 관한 육종연구는 수량증대, 사료가치 증진 및 환경재해내성 증가 등에 대해 이루어졌으며, 이를 위해 교배와 선발 등과 같은 전통육종법이 이용되어져 왔다(Sugihara et al., 1999). 그러나 전통육종법에 의한 사료 작물 품종의 개선에는 어려움이 많고 또한 시간이 많이 걸리는 단점이 있다. 분자생물학적인 연구기법의 발달과 더불어 사료작물과 잔디의 육종 프로그램 또한 생명공학적인 기법을 응용하는 시대에 들어서게 되었다. 유전자 형질전환기술은 전통육종에서 불가능하다고 여겨졌던 이종간 유전자 도입을 통해 식물의 여러 가지 특성을 바꾸는 것을 가능하게 한다(Toyama et al., 2003; Sun et al., 2010).

잔디의 경우 장기간 동안 저온에 놓이게 되면 잔디의 품질은 저하되며 땅 위를 기는 포복경 줄기와 엽색은 황색으로 변하고 때때로 고사하게 된다. 그러므로 생명공학적인 기술을 이용하여 녹색유지기간을 장기간 유지시키는 것은 중요한 육종목표 중에 하나이다. 이와 같은 새로운 유전자

* Corresponding author : Byung-Hyun Lee, IALS, Division of Applied Life Science (BK21), Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea. Tel: +82-55-772-1882, Fax: +82-55-772-1880, E-mail: hyun@gnu.ac.kr

도입을 통한 형질전환 잔디를 개발하기 위해서는 효율적인 식물체 재분화 프로토콜 확립이 요구된다. 지금까지는 주로 종자유래의 캘러스에 *Agrobacterium*을 이용하여 감염시킴으로서 형질전환 잔디를 개발해 왔다(Toyama et al., 2003). 그러나 이 과정은 다소 시간이 많이 소요되며 재분화능을 가지고 있는 캘러스 선발에도 많은 노력이 요구된다. 최근 보고된 다른 형질전환방법으로 잔디의 포복경 조직에 *Agrobacterium*을 감염시켜 형질전환체를 재분화시키는 방법이 보고된 바 있다(Ge et al., 2006; Kim et al., 2011). 이 방법은 캘러스 배양에 소요되는 시간을 줄일 수 있으므로 단기간 내에 형질전환체를 획득할 수 있는 장점이 있다. 그러나 포장에서 생육된 포복경 조직의 경우 다양한 종류의 미생물에 의해 오염된 상태여서 기내배양에 제한사항으로 작용하는 단점이 있다. 이를 방지하기 위해서는 기내(*in vitro*) 또는 실내에서 생산시킨 포복경 조직을 이용할 수 있으나, 배양에 많은 시간이 소요되고 많은 양의 배양체를 얻기에는 한계가 있다. 그러므로 포장에서 생육시킨 잔디로부터 포복경을 대량으로 채취하여 형질전환에 활용할 수 있다면 형질전환 효율을 크게 증가시킬 수 있을 것이다. 지금까지 본 연구그룹을 포함하여 몇몇 연구에서 포복경의 살균법에 관한 연구가 보고된 바 있으나(Ge et al., 2006; Kim et al., 2011), 이들은 대부분 미생물 오염이 심하지 않은 환경인 온실 또는 실내에서 재배하여 생육시킨 잔디의 포복경을 이용한 경우로서 미생물 오염이 심한 포장상태에서 채취한 포복경에 대해서는 효율적이지 않은 측면이 있었다. 본 연구에서는 포장에서 재배된 잔디의 포복경에 대한 효율적인 표면살균체계를 확립함으로써 포복경 조직을 이용한 *Agrobacterium* 형질전환체계를 수립하기 위하여 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 처리

잔디의 포복경은 경상대학교 시험포장에서 재배한 잔디로부터 채취하였다. 포장생육 잔디로부터 채취한 포복경을 3~4 cm 크기의 절편으로 절단하였다. 전단한 절편은 70% ethanol, 30% NaOCl과 0.1% HgCl₂ 등을 이용하여 다양한 시간을 조합하여 처리하였다(Table 1). NaOCl과 HgCl₂ 용액은 0.001%의 Tween-20를 첨가하였다. HgCl₂ 처리 시 진공처리는 800 mbar에서 시간별로 실시하였다. 살균처리 한 절편체는 멸균수로 6회 이상 세정한 다음, 마디를 포함하도록 0.5 cm 크기의 절편으로 잘라 생장호르몬을 포함하지 않은 MS 배지에 2.5 mg/l amphotericin B (AmB, Sigma, A2942)를 포함한 배지에 치상하였다. 절편체의 오염여부는 배양 7일 이후에 관찰하여 생존(오염) 여부를 관찰 한 후, 오염되지 않은 절편체를 선별하여 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 사용하였다.

2. *Agrobacterium* 감염과 공동배양

살균된 포복경 절편체의 마디를 가로로 절단 한 다음 *Agrobacterium* 감염에 이용하였다. 오옥신 유도성 프로모터인 AUX 프로모터의 하류에 *tzs* 유전자(Beaty et al., 1986)가 도입된 pCambia3301 벡터(Choi et al., 2009)를 가지는 *Agrobacterium*을 포복경 절편체 감염에 이용하였다. 포복경 형질전환을 위한 *Agrobacterium*은 kanamycin (50 ug/ml)이 첨가된 YEP 배지로 28℃에서 하룻밤 배양하였다. 배양한 *Agrobacterium*은 원심분리하여 회수한 다음 30 g/l의 sucrose가 포함된 MS 배지로 OD₆₀₀ = 0.8 전후가 되도록 현탁하였다. 살균된 포복경 조직은 *Agrobacterium* 현탁액에 침지시킨 다음 진공(800 mbar) 처리를 10분간 실시하고 상온에서 30분간 정치하여 감염시켰다. 감염이 끝난 절편체는 여분의 균을 제거한 다음 MS 기본배지에 치상하여 25℃에서 7일간 암상태에서 공동배양하였다.

3. 식물체 재분화

Table 1. Effect of different treatments on surface sterilization of stolon explants of zoysiagrass

Experiments Treatment steps		Treatment duration (min)						
		Experiment # 1	Experiment # 2	Experiment # 3	Experiment # 4	Experiment # 5	Experiment # 6	Experiment # 7
1. 70% Ethanol		1	1	1	1	1	1	1
2. 30% Bleach		30	0	15	15	30	15	30
3. 0.1% HgCl ₂ (vacuum)		0	5	0	5	5	10	5
4. 0.1% HgCl ₂ (shaking)		0	20	25	20	15	0	20
Survival (%)	AmB (0 mg/l)	11±2.4	11±3.1	28.7±2.3	34.3±3.8	31.5±4.4	27.4±3.1	21.7±4.1
	AmB (2.5 mg/l)	20±1.1	18±2.5	52.5±3.1	65.6±2.4	55.7±2.3	47.5±4.1	38.6±2.7
Shoot regeneration (%)		7.5±2.3	6.9±3.4	12.9±2.8	16.5±3.7	13.3±4.1	11.7±1.1	10.3±2.7

공동배양이 끝난 포복경은 250 µg/ml cefotaxime이 포함된 멸균수로 세정한 다음 250 µg/ml cefotaxime이 포함된 재분화배지 (MS 배지 + 1 µg/ml Kinetin)에 치상하여 25℃에서 5일간 암상태에서 배양한 다음 다시 cefotaxime이 포함되지 않은 재분화배지로 옮겨 25℃에서 16시간 광조건 (100 µmol m⁻² s⁻¹)에서 15일간 배양하여 신초 재분화율을 조사하였다.

4. 통계처리

각각의 살균처리 후에 박테리아 또는 곰팡이 오염에서 살아남은 포복경 절편체의 생존율을 계산하여 살균효율을 비교하였다. 모든 실험은 3반복으로 실시하였으며 결과는 평균 ± SE로 나타내었다.

III. 결과 및 고찰

1. 포장생육 포복경 절편체의 살균에 있어서 NaOCl과 HgCl₂의 살균효과

잔디의 기내배양 시 가장 문제가 되는 오염은 곰팡이 오염으로 알려져 있다. 특히 잔디의 포복경은 흙의 표면에 생육 증식하는데 이는 곧 다양한 종류의 미생물이 포복경 조직에 기생하게 하는 원인으로 작용한다. 따라서 포장 생육된 잔디의 포복경을 형질전환 실험재료로 사용하기 위해서는 이들 곰팡이 오염을 완전히 제거하는 것은 필수적이다. 이러한 오염을 제거하기 위하여 예비실험을 통해 먼저 70% ethanol 처리 후에 NaOCl과 HgCl₂의 살균효과를 다양한 농도로 처리해 본 결과 30% NaOCl과 0.1% HgCl₂가 가장 효과적인 농도였다(결과 미제시). 이들 두 살균제의 처리시간별 살균효과를 조사하기 위하여 다양한 시간처리 조합으로 처리해 보았다(Table 1). 그 결과 단일처리(실험 1-3)에 비하여 30% NaOCl과 0.1% HgCl₂를 순차적으로 조합처리 했을 때가 더 높은 생존율을 나타내었다. 그 중에서도 30% NaOCl에서 15분 처리 후 0.1% HgCl₂로 5분간 진공처리하고 다시 20분간 진탕처리 했을 때(실험 4)가 34.3%로 가장 높은 살균효과를 보였다. 이때 미생물 오염은 전혀 관찰되지 않았고 곰팡이 오염은 배양 4~7일 사이에 관찰되었다(Fig. 2A). 이보다 높은 농도 또는 처리시간을 늘려 본 결과 살균효율은 증가되었으나, 동시에 조직절편체의 생존율이 현격히 감소하였다(결과 미제시). 지금까지 식물조직 절편체의 기내배양에 있어서 HgCl₂가 NaOCl과 Ca(OCl)₂ 등의 단독처리 보다 조합처리 했을 때, 오염

균 제거에 효과적이라는 보고는 많이 있어 왔다(Mwamba, 1995). 본 실험에서도 단독처리 시 보다 조합처리 했을 때 더 효율적인 살균효과를 나타내었다. 그러나 이러한 처리에도 불구하고 살균된 포복경 조직을 배양배지에서 장기간 배양 시 곰팡이 오염은 완전히 제거되지 않았다.

2. Amphotericin B의 곰팡이 오염 제거 효과

포복경 조직의 살균 후에도 장기 배양 시 발생되는 곰팡이 오염을 제거할 목적으로 항진균제인 Amphotericin B (AmB)의 첨가효과를 조사해 보았다.

Fig. 1. (A) Effect of vacuum on surface sterilization of zoysiagrass stolons. Stolons were surface sterilized with 30% bleach for 15 min followed by 25 min mercuric chloride. The explants were kept under 800 mb for the first 5 min (+vacuum) or under normal air pressure (-vacuum), (B) Effect of amphotericin B on surface sterilization efficacy of zoysiagrass stolons. Explants were cultured with different concentration of AmB after sterilization.

AmB는 균류의 세포막 sterol 성분에 결합해서 항균작용을 나타낸다. 그러나 세포막에 sterol을 포함하지 않는 박테리아 또는 식물세포에 대해서는 항균작용을 가지지 않는다. 이러한 특성으로 식물조직의 기내배양 시 가끔 이용되어져 왔다(Shield et al., 1984). 이러한 특성은 본 연구에서와 같이 살균한 잔디 포복경 조직을 *Agrobacterium*을 이용해서 형질전환 하고자 할 경우 매우 적절한 곰팡이 오염 제거제로 활용 할 수 있음을 나타낸다. 즉 곰팡이오염은 효율적으로 제거하지만 *Agrobacterium*이나 식물세포에는 영향을 미치지 않으므로 형질전환 효율에는 영향을 미치지 않을 것이다. 포장생육 잔디 포복경을 일반적인 살균법을 통하

여 살균한 후 배양하게 되면 곰팡이의 오염을 완전히 제거가 매우 어렵고 배양 후기에는 곰팡이의 증식에 의해 배양 식물조직 절편체가 고사 된다 (Fig. 2A).

곰팡이 제거를 위한 배지 중의 최적 AmB의 첨가 농도를 규명하기 위하여 NaOCl과 HgCl₂ 살균처리 후 AmB를 농도별로 처리해 본 결과 AmB 농도가 증가할수록 포복경 생존율이 증가하였으며, 2.5 mg/l에서 가장 높은 살균효과를 보였고, 그 이상의 농도에서는 같은 정도의 살균효과를 보였다 (Fig. 1B). 한편 NaOCl과 HgCl₂ 살균처리 된 포복경 조직을 2.5 mg/l AmB가 첨가 된 배지에서 배양했을 때의 살균효과를 비교해 본 결과 Table 1에 나타낸 바와 같이 AmB 무처리구에 비해 모든 처리구에서 훨씬 높은 살균효과를 보였다 (Table 1). 특히 0.1% HgCl₂ 살균처리 시 5분간 진공처리 후 20분간 진탕처리하고 나서 AmB가 첨가된 배지에서 배양했을 때 (실험 #4)가 가장 높은 포복경의 생존율을 나타내었다 (Table 1, Fig. 2B).

Fig. 2. Disinfection of zoysiagrass stolons for *Agrobacterium* infection. (A) typical fungal colony on the inoculated stolons. (B) clean explants surface sterilized with optimized method, (C, D) *Agrobacterium* growth on stolon in the co-cultivation medium containing 2.5 mg/l AmB, (E) shoot regeneration after co-cultivation with *Agrobacterium*.

한편 HgCl₂ 살균처리 시 진공처리 효과를 비교해 본 결과 800 mbar에서 5분간 진공처리 했을 때가 포복경 생존율이 월등히 증가하였다 (Fig. 1A, Table 1). 잔디의 포복경의 경우 각 마디에 측아가 달려있어서 살균액이 침투하기 어려운 구조를 하고 있는데, 진공처리는 이들 틈새까지 살균약제가 잘 침투하도록 도와주는 것으로 추측 된다. 따라서 포장생육 잔디의 포복경 살균에는 관행적인 살균법으로

살균한 절편체를 AmB (25 mg/l)가 첨가된 배양배지에 배양하는 것이 곰팡이 오염제거에 가장 효율적인 것으로 판단된다.

3. AmB의 *Agrobacterium* 성장 저해 효과

진균제인 AmB가 잔디 포복경 조직의 살균에는 효과적이었다. 그러나 유전자 도입을 위한 포복경 형질전환을 위해서는 *Agrobacterium*과의 공동배양과정이 필수적이다. 만약 AmB가 *Agrobacterium*에 영향을 미치게 되면 형질전환 효율이 현격히 저하될 것이다. 따라서 AmB가 *Agrobacterium*의 성장에 영향을 미치는지 여부를 조사해 보았다. 살균된 잔디 포복경 조직을 *Agrobacterium* 배양 현탁액에 침지시켜 “재료 및 방법”에서와 같이 감염시킨 후 2.5 mg/l AmB가 포함된 공동배양배지에 치상한 후 1주일간 *Agrobacterium*의 성장정도를 관찰하였다. 그 결과 정상적으로 *Agrobacterium*이 포복경 절편체 주변에 성장하는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 2C, D). 이러한 결과는 AmB가 곰팡이 특이적인 진균제임을 나타내는 것이며 (Hartsel and Bolard, 1996), 이러한 기작은 AmB가 곰팡이 sterol에 특이적으로 작용함을 나타내는 결과이다 (Umegawa, 2008). 또한 AmB가 *Agrobacterium* 감염 후에 포복경 조직으로부터 신초의 재분화에 영향을 미치는지 여부를 조사 해 본 결과, 모든 AmB 처리구에서 높은 신초 재분화율을 보임으로서 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (Table 1, Fig. 2E).

결론적으로 잔디의 형질전환에 있어서 이상적인 실험재료인 포장생육 포복경 조직을 이용하는데 있어서 가장 큰 제한인자인 박테리아와 곰팡이 오염을 획기적으로 제거할 수 있는 새로운 살균방법을 개발하였다. HgCl₂ 사용 시 진공처리가 살균에 매우 효과적이었으며, 특히 항진균제인 AmB를 *Agrobacterium* 감염 후 공동배양 배지에 첨가해 줌으로서 곰팡이 오염을 효과적으로 제거할 수 있었다. 이 결과는 잔디 형질전환체의 대량개발에 있어서 매우 효율적으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

IV. 요약

포장에서 생육된 잔디 포복경을 이용한 *Agrobacterium* 형질전환에 있어서 큰 제한이자였던 곰팡이 오염을 제거할 목적으로 포복경 조직에 대한 새로운 살균법을 개발하고자 하였다. 여러 가지 살균방법 중에서 30% NaOCl로 15분간 처리한 다음 0.1% HgCl₂로 25분간 처리 했을 때 포복경 절편체의 생존율이 높았으며, 0.1% HgCl₂로 처리시 800

mbar의 진공처리를 5분간 실시했을 때 가장 효과적이었다. 또한 *Agrobacterium*과 공동배양 시 2.5 mg/l의 amphotericin B를 첨가해 준 배지에서 배양했을 때 가장 높은 생존율을 나타내었다. AmB의 처리는 *Agrobacterium*의 생장에 영향을 미치지 않았다. 또한 살균된 포복경으로 부터 신초의 재분화에도 영향을 미치지 않았으며 곰팡이 오염만을 효율적으로 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 포장에서 대량으로 생육시킨 잔디 포복경을 이용한 *Agrobacterium* 형질전환 시 그 효율을 증가시키는데 큰 기여를 할 것으로 추측된다.

V. 사 사

본 연구는 국립산림과학원 (남부산림연구소) 연구과제의 지원으로 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

VI. 인 용 문 헌

- Beaty, J.S., Powell, G.K., Lica, L., Regier, D.A., MacDonald, E.M.S., Hommes, N.G. and Morris, R.O. 1986. Tzs, a nopaline Ti plasmid gene from *Agrobacterium tumefaciens* associated with trans-zeatin biosynthesis. *Molecular General Genetics*. 203:274-280.
- Carmo-Silva, A.E., Keys, A.J., Beale, M.H., Ward, J.L., Baker, J.M., Hawkins, N.D., Arrabaça, M.C. and Parry, M.A.J. 2009. Drought stress increases the production of 5-hydroxynorvaline in two C4 grasses. *Phytochemistry*. 70:664-671.
- Choi, Y., Noh, E. and Choi, K. 2009. Low level expression of prokaryotic tzs gene enhances growth performance of transgenic poplars. *Trees*. 23:741-750.
- Dhital, D., Yashiro, Y., Ohtsuka, T., Noda, H., Shizu, Y. and Koizumi, H. 2010. Carbon dynamics and budget in a *Zoysia japonica* grassland, central Japan. *Journal of Plant Research*. 123:519-530.
- Ge, Y., Norton, T. and Wang, Z.Y. 2006. Transgenic zoysiagrass (*Zoysia japonica*) plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Reports*. 25: 792-798.
- Hartzel, S. and Bolard, J. 1996. Amphotericin B: new life for an old drug. *Trends in Pharmacological Sciences*. 17:445-449.
- Ito, T. and Takatsuki, S. 2005. Relationship between a high density of sika deer and productivity of the short-grass (*Zoysia japonica*) community: a case study on Kinkazan Island, Northern Japan. *Ecological Research*. 20:573-579.
- Kim, K.-H., Kim, Y.G., Heo, S.H., Bae, E.J., Lee, K.S., Park, N.C. and Lee, B.-H. 2011. Effect of plant growth regulators and medium supplements on plant regeneration from stolon of *Zoysia matrella* Merr. *Asian Journal of Turfgrass Sciences*. 25:184-189.
- Mwamba, C.K. 1995. Effect of root-inhabiting fungi on root growth potential of *Uapaca kirkiana* (Muell. Arg.) seedlings. *Applied Soil Ecology*. 2:217-226.
- Osborne, C.P. and Freckleton, R.P. 2009. Ecological selection pressures for C4 photosynthesis in the grasses. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 276:1753-1760.
- Shield, R.J., Robinson, S.A. and Anslow, P.A. 1984. Use of fungicides in plant tissue culture. *Plant Cell Reports*. 3:33-36.
- Sugihara, S., Kobayashi, M., Ebina, M., Tsurumi, Y., Ooya, I. and Nashiki, M. 1999. Review of researches concerning *Zoysia* in Japan. *Grassland Science*. 45:105-112.
- Sun, H.J., Song, I.J., Bae, T.W. and Lee, H.Y. 2010. Recent developments in biotechnological improvement of *Zoysia japonica* Steud. *Journal of Plant Biotechnology*. 37:400-407.
- Toyama, K., Bae, C.H., Kang, J.G., Lim, Y.P., Adachi, T., Riu, K.Z., Song, P.S. and Lee, H.Y. 2003. Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecules and Cells*. 16:19-27.
- Umegawa, Y., Matsumori, N., Oishi, T. and Murata, M. 2008. Ergosterol increases the intermolecular distance of amphotericin B in the membrane-bound assembly as evidenced by solid-state NMR. *Biochemistry*. 47:13463-13469.

(Received March 4, 2013/Accepted April 5, 2013)