

유전자총을 이용한 잔디 형질전환 체계 확립

임선형* · 강병철 · 남궁용 · 신흥균

삼성에버랜드(주) 잔디 · 환경연구소

Establishment of Transformation Systems of Zoysiagrass by Particle Bombardment

Sun-Hyung Lim* · Byung-Chorl, Kang · Yong, Namgung · Hong-Gyun, Shin

Turfgrass and Environment Research Institute, Samsung Everland Inc.

ABSTRACT

Callus formation and plant regeneration from the seeds of zoysiagrass cv. Zenith was tested on MS basal medium supplemented with various concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D) and of several cytokinins. A concentration of 1 mg/L 2,4-D on medium stimulated callus formation. In the presence of 5 mg/L 2,4-D, addition of 1 mg/L kinetin significantly enhanced callus formation and plant regeneration over 2,4-D alone. To transfer foreign DNA into turfgrass, parameters for the bombardment of embryogenic callus with the particle bombardment were partially optimized using transient expression assay of a chimeric β -glucuronidase(GUS) gene driven by the CaMV 35S promoter. GUS gene was strongly expressed at helium pressure 1,100 psi and 6~9 cm target distance.

Key words: particle bombardment, transformation, 2,4-D, GUS

서 론

잔디는 화본과(*Gramineae*)의 다년생 초종으로 전 세계적으로 난대, 온대, 한대지역에 널리 분포되어 있으며 600여 속(genus)에 약 5000여 종(species)이 있다(김, 1994). 잔디는 골프장, 공원, 정원, 사방공사 등의 지피식물로 널리 이용되고 있으며 최근 잔디에 관한 관심이 증대되면서 병해저항성품종, 제초제저항성품종, 사철

푸른잔디 등 잔디에 대한 품종개발 요구도 다양해지고 있다(Chai and Sticklen, 1998).

식물세포로 외래 유전자를 도입하는 많은 방법들이 개발되었으나, *Agrobacterium*과 particle bombardment에 의한 방법이 가장 흔히 쓰이고 있다. 많은 쌍자엽 식물의 경우 *Agrobacterium*에 의해서 형질전환이 성공적으로 이루어지고 있으나 단자엽 식물의 경우에는 숙주특이성 등의 어려움으로 형질전환이 성공적으로 수행되지 못하였다. Particle bombardment법으로 옥수수(Wan et al., 1995), 보리(Ritala et

*corresponding author. Tel : 031-460-3406
E-mail : limsh2@samsung.co.kr

al., 1994), 밀(Vasil et al., 1993), 난(Yu et al., 1999), 잔디(Xiao and Ha 1997; Inokuma et al., 1998) 등의 식물세포에 외래 유전자를 도입하여 성공적으로 형질전환이 이루어졌다.

본 실험에서는 형질전환을 수행하기 위해서 한국잔디의 배발생 캘러스의 형성조건과 재분화 조건 등을 규명하고 particle bombardment를 이용한 잔디형질전환 방법을 수립하고자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

한국잔디(*Zoysia japonica* cv. Zenith) 종자를 사용하였다. 잔디종자를 70% ethanol에 20분간 살균한 후, 4% NaOCl(유한락스) 용액에 20분간 처리한 후 멸균수로 3~4회 이상 세척하여 소독하였다.

식물체 캘러스 형성 및 재분화 조건 확립

소독된 종자를 MS기본배지에 2,4-D를 1, 3, 5, 7mg/l 농도로 첨가하여 치상한 후 30일간 배양하여 캘러스 형성률을 조사하였고, 형성된 캘러스를 1/2 MS배지에 옮겨 45일간 배양한 후, 재분화율을 조사하였다.

Cytokinin hormone 종류별 잔디 캘러스 형성 및 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 2,4-D 5mg/l에 BA(benzyladenine), Kinetin, 2iP(6- γ - γ -(Dimethyl-allylamino) purine)를 각각 조합 처리한 MS배지(sucrose 3%, agar 0.8%, pH 5.7)에 페트리디쉬(\varnothing 6cm)당 종자를 20개씩 치상하였다. 캘러스 형성률 조사는 배양 45일 후에 하였고, 재분화율 조사는 형성된 캘러스를 1/2 MS배지에 옮기고 70일 후에 실시하였다.

캘러스 형성률 조사는 잔디종자를 치상한 후,

25 \pm 2 $^{\circ}$ C, 암조건에서 배양하였고, 재분화율 조사는 형성된 캘러스를 1/2 MS배지에 옮겨서 25 \pm 2 $^{\circ}$ C, 3,000lux, 16/8h 광조건에서 배양하여 실시하였다.

Plasmid

PDS-1000/He(Bio-Rad, USA)을 이용하여 잔디 형질전환에 필요한 최적 조건을 규명하기 위해서 pIG121-HM을 사용하였다. pIG121-HM은 kanamycin과 hygromycin에 내성을 가지는 운반체로 X-GluA(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid, Duchefa, Netherland)에 반응하는 GUS(β -glucuronidase) 유전자가 35S promoter 사이에 삽입되어 있다. Sambrook 등(1989)의 방법을 사용하여 이 plasmid를 증식하였고, alkaline lysis방법으로 분리하였다.

Biolistic transformation

GUS유전자를 지닌 pIG121-HM plasmid DNA를 코팅하기 위하여 gold particle 입자 30mg을 70% EtOH로 세척하고 50% glycerol 500 μ L로 현탁하였다. 현탁액을 진탕하여 잘 섞은 다음, 새 튜브에 50 μ L씩 분주하고 plasmid DNA 5 μ L(1 μ g/ μ L), CaCl₂(2.5M) 50 μ L, spermidine(0.1M) 20 μ L를 차례로 넣어 각각의 입자에 코팅하였다. 70% EtOH로 세척하고 100% EtOH 48 μ L를 첨가하여 현탁한 다음 macrocarrier에 1회에 8 μ L씩 분주하여 사용하였다.

형질전환 조건 수립

적정 bombardment조건을 수립하기 위해서 helium gas의 압력조건과 사출거리를 달리하여 pIG121-HM유전자를 잔디 내로 삽입하였다. Bombarding 후 chamber 내로 vacuum을

제거하고 sample을 꺼내어 7일간 배양하였다. GUS 활성의 조직화학적 분석을 Jefferson 등 (1987) 방법에 따라서 수행하였다. 캘러스를 X-GluA가 포함된 반응액에 18시간 동안 반응시킨 후 70% 알코올로 세척한 후 해부현미경으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

한국잔디 캘러스 형성 및 재분화에 미치는 효과

2,4-D 농도별 효과

한국잔디의 캘러스 형성과 식물체 재분화에 미치는 2,4-D 농도별 효과를 알아보았다 (Table 1). 캘러스 형성률은 2,4-D 농도 1mg/L에서 53.3%로 가장 높았고, 2,4-D의 농도가 올라갈수록 캘러스 형성률은 낮아지는 경향이며, 형성된 캘러스의 크기는 2,4-D의 농도가 올라갈수록 커지는 경향이 나타났다. 재분화율은 2,4-D 농도 5mg/L에서 4.6%로 다른 처리에 비하여 가장 좋게 나타났다.

Tanpo 등(1994)은 들잔디의 캘러스 형성에 2,4-D 농도 1~5mg/L 범위 가운데 2mg/L가 가장 좋았다고 보고하였으나, 본 실험에서는 캘러스 형성률, 형성된 캘러스의 크기 및 재분화 정도를 통해 2,4-D 농도 3~5mg/L 범위가 효과적인 것으로 생각된다. 따라서 한국잔디종자도 계통이나 품종이 다르면 캘러스 형성을 위한 적정 농도가 다를 수 있으므로 정확한 실험을 위해 품종마다 적정 농도를 테스트해 보아야 할

것으로 생각된다. 또한 Tanpo 등(1994)은 2,4-D 농도 1~5mg/L 범위 가운데 어느 처리에서도 캘러스 형성률이 80% 이상이었다고 하였는데, 본 실험에서는 캘러스 형성률은 53.3%가 가장 높게 나타났다. Tanpo 등(1994)은 잔디종자를 발아시켜 배지에 치상한 반면 본 실험에서는 소독한 종자를 발아시키지 않고 바로 배지에 치상하였는데 이것이 낮은 캘러스 형성률의 원인으로 생각된다. 형성된 캘러스를 관찰한 결과 발아된 종자에서는 거의 100% 캘러스가 형성된 반면 발아하지 않은 종자에서는 캘러스가 형성되지 않았고, 종자의 발아율이 50% 전후였던 것으로 보아 종자를 발아시킨 후 캘러스 유도 배지로 옮기는 것이 캘러스 형성률을 높이는 방법으로 판단된다.

Cytokinin 종류별 효과

캘러스 형성 및 재분화율을 향상시키기 위하여 cytokinin 효과를 알아보고자 BA, kinetin, 2iP를 농도별로 처리한 결과는 Table 2와 같다. 처리별 캘러스 형성률은 cytokinin의 농도가 올라갈수록 높아지는 경향이 나타났다. Asano (1995)는 벤투그라스에서 2,4-D 5mg/L에 BA 1mg/L 첨가시 BA 무첨가에 비해 배발생 캘러스 형성률이 약 10배 정도 증가된다고 보고하였으나, 본 실험에서는 BA 1mg/L 처리시 대조구에 비하여 배발생 캘러스 형성률이 2.5배, kinetin 1mg/L 처리시 대조구에 비하여 5배, 2iP의 경우는 0.1mg/L 처리시 대조구에 비하여

Table 1. Effect of 2,4-D concentrations on callus induction and plant regeneration of Zoysiagrass

Treatment 2,4-D (mg/L)	No. of seeds tested	Callus induction (%)	Callus size (mm)	Regeneration (%)
1	300	53.3 a ²	2.39 b	0
3	260	41.9 b	4.58 a	0
5	200	33.0 bc	4.46 a	4.6
7	240	31.3 c	4.23 a	1.4

²Mean separation within column by Duncan's multiple range test at 5% level

Table 2. Effect of BA, Kinetin and 2iP concentration on callus induction and plant regeneration of *Zoysiagrass*

	Treatment ^z (mg/L)	No. of seeds tested	Callus induction (%)	Callus size (mm)	Regeneration (%)
BA	0	320	40.0 ab ^y	3.5 abc	4.4
	0.01	400	44.8 a	3.4 bc	4.4
	0.1	340	35.9 bc	3.2 c	6.2
	1.0	380	34.2 bc	3.2 c	10.4
Kinetin	0	360	34.4 bc	3.7 ab	3.0
	0.01	400	32.8 bcd	3.9 a	7.2
	0.1	400	25.0 de	3.5 abc	8.3
	1.0	380	24.0 de	3.2 c	14.7
2iP	0	200	39.5 ab	3.7 ab	5.3
	0.01	260	24.6 de	3.3 bc	11.5
	0.1	380	20.0 e	3.9 a	9.1
	10.0	360	29.2 cd	2.7 d	2.1

^zBasal medium: MS+2,4-D 5 mg/L.

^yMean separation within column by Duncan's multiple range test at 5% level.

2배 정도 증가되었다. 본 실험결과 2,4-D에 cytokinin 첨가시 배발생 캘러스 형성이 촉진됨을 알 수 있었고, BA와 2iP에 비해 kinetin이 더욱 효과적인 것으로 판단된다.

형질전환 조건 수립

Particle bombardment 방법으로 형질전환을 수행할 경우, particle의 농도, DNA농도, helium gas의 압력과 사출거리 등이 유전자의 발현에 영향을 미친다고 보고되고 있다(Ye et al., 1997). 본 실험에서는 한국잔디의 particle bombardment 처리시 유전자의 효율적인 도입과 발현을 알아보기 위해서 helium gas 압력과 사출거리를 달리하여서 실험을 수행하였다. 유전자의 도입과 발현은 GUS 염색을 통하여 알아보았다(Table. 3). 사출거리를 6cm로 고정하고 helium gas 압력을 1,100, 1,350, 1,550psi로 달리하여 수행한 결과 압력이 1,100psi일 때 가장 안정적으로 삽입된 유전자가 발현하였다. 압력을 1,100psi로 고정하고 사출거리를 3, 6, 9, 12cm로 달리하여서 bombardment를 수행

Table 3. Effect of GUS gene expression according of target distance and helium pressure

Target distance (cm)	Helium pressure (psi)	GUS gene expression*
Control (no DNA)		-
6	1,100	+++
6	1,350	++
6	1,550	+
3	1,100	++
6	1,100	+++
9	1,100	++++
12	1,100	++

* -: not; +: poor; ++: moderate; +++: good; ++++: very good

한 결과, 압력이 1,100psi이고, 거리가 9cm인 경우에 가장 안정적으로 발현하였다. 외래유전자를 도입하기 위해서는 particle bombardment 처리시 helium 압력은 1,100psi, 사출거리는 6~9cm로 하여 처리하는 것이 효과적이라 판단된다.

Hygromycin 선발농도

Bombardment하지 않은 잔디캘러스를 이용

하여 형질전환체를 선발하기 위한 hygromycin 농도를 규명하였다. Hygromycin을 0, 50, 100, 200, 400mg/L로 농도로 배지에 첨가하여 4주 동안 캘러스를 배양하여 억제효과를 살펴보았다. 대조구(0mg/L)에 경우에는 억제효과가 나타나지 않았고, 50mg/L로 처리하였을 경우 90% 정도의 억제효과가 나타났고, 100mg/L 이상의 hygromycin에서는 모든 캘러스의 생장이 억제되었다. 따라서 한국잔디 형질전환 실험에서 hygromycin 100mg/L의 농도로 선발하는 것이 효과적이라고 판단된다.

요 약

난지형 잔디인 Zoysiagrass 품종 'Zenith' 종자를 다양한 농도의 2,4-D와 cytokinin가 포함된 MS배지에서 캘러스 형성률과 재분화율을 조사하였다. 캘러스의 형성률은 2,4-D 1mg/L 첨가되었을 때 가장 좋았다. 캘러스 형성률과 식물체 재분화는 2,4-D 5mg/L에 kinetin 1mg/L을 첨가한 경우가 2,4-D를 단독으로 처리하는 것보다 효과적이었다. 외래 DNA를 잔디로 도입하기 위해서 배발생 캘러스에 particle bombardment의 조건을 CaMV 35S promoter을 지닌 GUS유전자의 일시적 발현을 통하여 알아보았다. GUS유전자는 helium 압력이 1,100psi, 사출거리가 6~9cm인 것이 가장 강하게 발현되었다.

참고문헌

1. Asano, Y. 1995. Introduction to biotechnology application to turfgrass breeding. *J. of Japanese Society of Turfgrass Science*. 24:64-76.
2. Chai, B., and M. B. Sticklen. 1998. Application of biotechnology in turfgrass genetic improvement. *Crop science* 38:1320-1338.
3. Inokuma, C., K. Sugiura, N. Imaizumi, and C. Cho. 1998. Transgenic japanese lawngrass (*Zoysia japonica* Steud.) plants regenerated from protoplasts. *Plant Cell Reports* 17:334-338.
4. Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plant; the *GUS* gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5:397-405.
5. 김형기. 1994. 잔디학. 선진문화사 p. 21.
6. Ritala, A., K. Aspegren, U. Kurten, M. Salmenkallio-Marttila, L. Mannomen, R. Hannus, V. Kauppinen, T. H. Teeri, and T.-M. Enari. 1994. Fertile transgenic barley particle bombardment of immature embryos. *Plant Mol Biol*. 24: 317-325.
7. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
8. Sanford, J. C. 1990. Biolistic plant transformation. *Physologia Plantarum*. 98:1050-1056.
9. Tanpo, H., H. Totoda, T. Nonomura, and S. Ouchi. 1994. Callus induction and plant regeneration in zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). *J. of Japanese Society of Turfgrass Science* 23:27-30.
10. Vasil, V., V. Srivastava, A. M. Castillo, M. E. Fromm, and I. K. Vasil. 1993. Rapid production of transgenic wheat plants by direct bombardment of cultured immature embryos. *Bio/technology* 11:1553-1558.
11. Wan, Y., J. M. Widholm, and P. G.

- Lemaux. 1995. Type I callus as a bombardment target for generating fertile transgenic maize (*Zea mays* L.). *Planta* 196:7-14.
12. Xiao, L., and S. -B. Ha. 1997 Efficient selection and regeneration of creeping bentgrass transformants following particle bombardment. *Plant cell Reports* 16:874-878.
13. Ye, X., Z.-Y. Wang, X. Wu, I. Potrykus, and G. Spangenberg. 1997. Transgenic *italian rye grass* (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. *Plant Cell Reports*. 16:379-384.
14. Yu, Z., M. Chen, L. Nie, H. Lu, X. Ming, H. Zheng, L. -J. Qu, and Z. Chen. 1999. Recovery of transgenic orchid plants with hygromycin selection by particle bombardment to protocorms. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 58:87-92.