

BcHSP17.6 유전자 도입에 의한 알팔파의 형질전환

김기용 · 성병렬 · 임용우 · 최기준 · 임영철 · 장요순 · 서 성 · 윤세형 · 박근제 · 조진기*

Transformation of Alfalfa by BcHSP17.6 Gene using *Agrobacterium tumefaciens*

K. Y. Kim, B. R. Sung, Y. W. Rim, G. J. Choi, Y. C. Lim, Y. S. Jang, S. Seo,
S. H. Yoon, G. J. Park and J. Jo*

Abstract

This study was conducted to obtain the transformed alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants with thermotolerance gene (*BcHSP17.6*) using *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and we confirmed the transformed gene from the regenerated alfalfa plants. The expression vector, pBKH4, harboring *BcHSP17.6* gene was used for production of transgenic alfalfa plants. In a process for transformation, the callus of alfalfa was cocultivated with *Agrobacterium tumefaciens* and transformed calli were selected on kanamycin-containing SH-3-kc medium to regenerate into the plant. The complete transgenic alfalfa plants were produced by cultivation for about 4 months on several regeneration media, SH-nk-c, SH-11b-c, SH-sp-c, and SH-IBA. The transgenic alfalfa plants were analyzed by isolation of genomic DNA and PCR/Southern blot.

(Key words : Alfalfa, Transgenic plant, *BcHSP17.6* gene, Callus induction, Plant regeneration)

I. 서 론

우리 나라 축산업은 조사료 부족으로 인해 60% 이상을 농후사료로 급여하고 있으며, 농후사료 또한 90% 이상을 수입에 의존하고 있는 실정이다. 조사료 역시 매년 수입량이 증가하여 2000년에는 약 60만톤을 수입하기에 이르렀다 (농림부, 2001). 이들 수입 조사료중 절반 이상이 건조 형태의 목초류이며, 큐브, 펠렛, 베일 등의 형태로 된 알팔파 가공품이 36%에 달한다. 알팔파 (*Medicago sativa* L.)는 이란을 중심으로 한 서남아시아의 산악지역이 원산지로, 한발과 더위에 매우 강하며, 가축들이 좋아하고, 높은 질소고정력과 다량의 필

수 아미노산을 함유하여 단백질 함량이 타 목초에 비하여 높다 (Smith, 1981). 하지만 대부분의 다른 목초들과 마찬가지로, 현재 한국에서 재배·이용되는 알팔파 품종은 모두 외국으로부터 도입된 것으로서 한국의 기후풍토에 적합하지 못한 것이 사실이다.

한국의 기후풍토에서 잘 자라는 목초를 개발하는데는 전통적인 육종방법과 유전공학적인 기법을 이용하는 형질전환 방법이 있겠는데, 형질전환 방법은 새로운 품종을 개발하는데 소요되는 기간을 대폭 단축하는 장점이 있다.

형질전환 식물체를 얻기 위해서는 무엇보다도 식물체 재분화기술이 확립되어야 하는데, 알팔파

축산기술연구소 (National Livestock Research Institute, Suwon 441-350, Korea)

* 경북대학교 농과대학 (College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea)

의 경우 Kim 등 (1999)이 SH 배지에서 재분화를 성공한 보고가 있기 때문에 동일한 방법으로 재분화실험을 진행하였다. 알팔파에 도입하고자 하는 내열성 유전자 (*BcHSP17.6*)는 Kim 등 (1997)이 이따 담배에 도입하여 형질전환된 담배가 내열성을 획득하는 것으로 보고하였으며, 세계 유전자은행에 등록되어 있는 유전자로서 (GenBank AF022217, Kim 및 Jo, 1997), 내열성 유전자 (*BcHSP17.6*)를 알팔파에 도입할 경우 형질전환된 알팔파는 내하고성 및 내재해성이 증진될 것으로 예상되며, 한국 기후에 적응하는 알팔파 신품종을 확보하는 동시에 국내 조사료의 증산에도 기여하리라 기대된다.

그래서 본 연구에서는 알팔파 종자로부터 캘러스를 유도하고, 내열성 유전자 (*BcHSP17.6*)를 갖는 형질전환용 벡터 pBKH4를 제작하여, pBKH4를 도입한 *Agrobacterium* LBA4404로서 알팔파 캘러스를 감염시킨 다음, 항생제를 첨가한 배지에서 형질전환된 캘러스를 선발, 이들을 재분화배지에서 완전한 식물체로 재분화한 후, genomic DNA를 분리하여 PCR 분석 및 Southern blot 분석을 통해 알팔파의 형질전환을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 사용배지

형질전환체를 위한 식물재료로는 알팔파 (*Medicago sativa* L.)의 Vernal 품종을 공시하였으며, 알팔파 종자를 70% 에탄올에서 1분, 0.1% SDS/HgCl₂ 용액에서 15분, 1% NaOCl 용액에서 5분간 소독한 다음, 멸균수로 2회 씻어내어 조직배양 재료로 사용하였다.

알팔파 종자로부터 캘러스 유도 및 식물체 재분화에 사용한 배지는 Table 1과 같다.

2. 캘러스 유도 및 발현벡터 준비

알팔파 종자로부터 직접 캘러스를 유도하고 증식시키기 위한 배지로는, SH (Schenk 및 Hildebrandt, 1972) 배지에 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) 3 mg/l 농도로 첨가한 SH-3 배지를 사용하였으며 (Kim 등, 1999), 본 실험에 사용된 모든 조직배양용 배지는 pH 5.8, 0.8% agar 농도로 조절하였고, 유도된 캘러스는 20일 간격으로 계대 배양하면서 대량으로 증식하였다.

알팔파의 형질전환을 위해, *BcHSP17.6* 유전자를 가지는 pBKH4를 형질전환 벡터로 사용하였다 (Kim 등, 1993). pBKH4는 양 말단이 BamH I 을 갖도록 한 *BcHSP17.6* 유전자 단편을 pBKS1-1 벡터의 BamH I 제한효소 부위에 subcloning 하여 제작한 벡터로서, kanamycin 내성 유전자인 NPT-II, 내열성 유전자인 *BcHSP17.6*, 그리고 항상적 발현을 유도하는 35S promoter를 가지고 있다 (Fig. 1).

Table 1. The list and composition of media used for callus formation and plant regeneration

Used media	Composition of each medium
SH	SH medium (basal medium)
SH-c	SH + cefotaxim (500mg/l)
SH-3	SH + 2,4-D (3mg/l)
SH-3-c	SH-3 + cefotaxim (500mg/l)
SH-3-kc	SH-3 + kanamycin (100mg/l) and cefotaxim (500mg/l)
SH-nk-c	SH + NAA (5mg/l), kinetin (2mg/l) and cefotaxim (500mg/l)
SH-11b-c	SH + 2,4-D (11/l), kinetin (1mg/l) and cefotaxim (500mg/l)
SH-sp-c	SH + (NH ₄) ₂ SO ₄ (1.6g/l), L-proline (5.75g/l) and cefotaxim (500mg/l)
SH-IBA	SH + IBA (1mg/l)

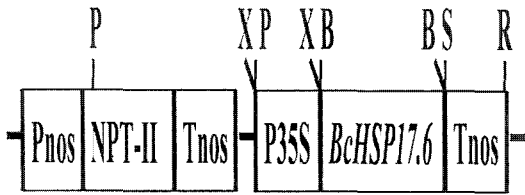


Fig. 1. Restriction Map of pBKH4. P35S, 35S promoter of CaMV; Tnos, Terminator of nopaline synthase; Pnos, Promoter of nopaline synthase; NPT II, Neomycin phosphotransferase Type II; BcHSP17.6, thermotolerance gene; B, BamH I; P, Pst I; S, Sal I; R, EcoR I; X, Xba I.

3. 형질전환 알팔파 생산 및 확인

pBKH4 plasmid를 Holster 등 (1978)의 'freeze and thaw method'에 따라 *Agrobacterium*에 도입하였으며, 형질전환된 *Agrobacterium*을 YEP 배지에서 2일간 배양하여 2배의 SH 액상배지에 현탁후, *Agrobacterium* 현탁액에 알팔파 캘러스를 3~10분간 담구었다가 멸균수로 2회 세척한 다음, 항생제가 첨가되지 않은 SH agar plate에서 2일간 co-culture 하므로써 감염을 유도하였다.

형질전환된 캘러스를 선발하기 위해, SH-3 배지에 100µg/ml의 kanamycin과 500µg/ml의 cefotaxim을 첨가한 SH-3-kc 배지에서 감염된 캘러스를 배양하였으며, 20일 간격으로 새로운 배지에 옮겨 주면서 2개월간 배양한 다음, 이들 배지에서 살아남는 캘러스를 형질전환 캘러스로 선발하였다.

형질전환 캘러스로부터 식물체를 재분화하기 위해 Kim 등 (1999)의 방법으로 실험을 진행하였다. SH-3-kc 배지에서 선발한 캘러스를 SH-nk-c 배지에서 28일간 배양, SH-11b-c 배지에서 3일간 배양, SH-sp-c 배지에서 21일간 배양한 다음, 줄기를 잘라 1µg/ml의 IBA를 첨가한 SH-IBA 배지에서 배양하여 뿌리를 유도함으로써 완전한 식물체로 재분화하였으며, 재분화된 식물체의 형질전환을 확인하기 위해 Murray 및 Thompson (1980)의 방법에 따라 genomic DNA를 분리하여, PCR 분석 및 Southern blot 분석 (Southern, 1975)을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 알팔파 캘러스 유도 및 pBKH4의 확인

2,4-D를 3 mg/l 첨가한 SH-3 배지에 소독한 알팔파 종자를 치상하여 배양했을때, 15~20일이 지난후에 캘러스가 유도되었으며, 캘러스를 동일배지에서 20일 간격으로 2~3회 계대배양하여 증식시켜 *Agrobacterium*으로 감염시킬 재료로 사용하였다. 캘러스유도 조건은 Kim 등 (1999)이 보고한대로 배지조건을 맞추어 줌으로써 쉽게 많은 양의 캘러스를 유도할 수 있었다.

pBKH4 벡터를 *E. coli* HB101에 도입하여 증식한 다음, plasmid DNA를 분리하여 BamH I 제한효소로 절단후 전기영동으로 확인하였을 때, Fig. 2에서와 같이 0.73kb의 BcHSP17.6 단편의 DNA band를 확인하였다 (Lane 1과 Lane 4).

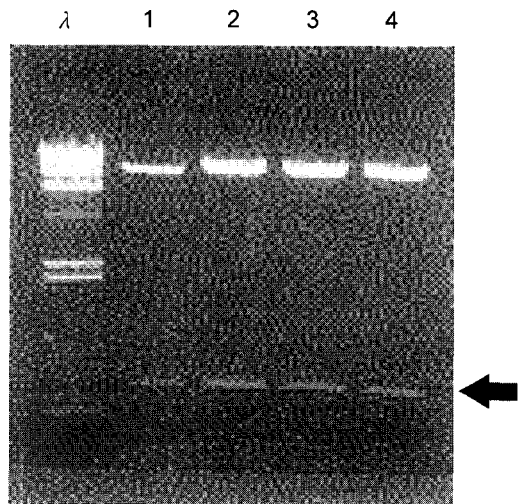


Fig. 2. Restriction pattern of pBKH4. λ, HindIII digested λ DNA Marker; Lane 1 and Lane 4, BamH I digested pBKH4 isolated from *E. coli*; Lane 2 and Lane 3, BamH I digested pBKH4 isolated from *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404; ←, The arrow indicated 0.73kb of BcHSP17.6 fragment.

전기영동으로 확인한 pBKH4는 Holster 등 (1978)의 'freeze and thaw method'에 따라 *Agrobacterium*에 도입하였으며, 형질전환된 *Agrobacterium*을 YEP 배지에서 2일간 배양하여 plasmid DNA를 분리한 다음, 역시 *Bam*H I 제한효소로 절단후 전기영동하여 *Agrobacterium*이 pBKH4로 형질전환되었는지를 확인한 결과, 0.73kb의 *BcHSP17.6* 단편의 band가 관찰되었다 (Fig. 2의 Lane 2와 Lane 3).

2. 형질전환 캘러스의 선발 및 알팔파 재분화

BcHSP17.6 유전자가 도입된 *Agrobacterium*을 배양하여 준비한 *Agrobacterium* 현탁액에 담구어 감염시킨 캘러스를 100 μ g/ml의 kanamycin과 500 μ g/ml의 cefotaxim을 첨가한 SH-3-kc 배지에 치상하여 2개월 동안 약 20일 간격으로 계대 배양하였을 때, 항생제 첨가 배지에서 살아남는 형질전환 캘러스를 선발할 수 있었다 (Fig. 3A). 이에 반해 *Agrobacterium* 현탁액으로 감염시키지 않은 캘러스는 SH-3-kc 배지에서 전혀 생존하지 않았다. 따라서 SH-3-kc 배지에서 선발한 캘러스는 pBKH4 plasmid로 형질전환된 것으로 예상되며, 선발한 캘러스를 SH-3-c 배지에 옮기고 약 20일 간격으로 계대배양하며 충분히 증식시켰다.

항생제 첨가배지에서 선발한 캘러스로부터 알팔파 식물체를 재분화하기 위해, 광조건의 SH-nk-c 배지에서 28~30일, SH-11b-c 배지에서 3~5일, SH-sp-c 배지에서 21~25일, SH-IBA 배지 (Son 등, 2001)에서 2개월 이상 배양하여 재분화를 완성하였다. Kim 등 (1999)의 보고에 의하면 감염시키지 않은 캘러스로부터 재분화를 유도하는데 약 52~80일 정도가 소요되는 것으로 되어 있는데, 본 실험에서 감염시킨 캘러스로부터 재분화를 유도하는데에는 약 4개월이 소요되었다. 이와 같이 재분화에 소요되는 기간에 차이가 생기는 것은, 형질전환 캘러스를 선발하는 과정에서 kanamycin과 cefotaxim 등의 항생제를 사용하기 때문에 이들의 영향으로 캘러스의 활력이 저하되기 때문인 것으로 생각된다.

Fig. 3은 캘러스 선발부터 재분화까지의 과정을 나타내는 것으로서, 100 μ g/ml의 kanamycin과 500 μ g/ml의 cefotaxim을 첨가한 SH-kc 배지에서 캘러스의

생존 (A), shoot의 형성 (B), 뿌리의 유도 (C), 그리고 정상적인 성체식물 (D)을 보여 준다.

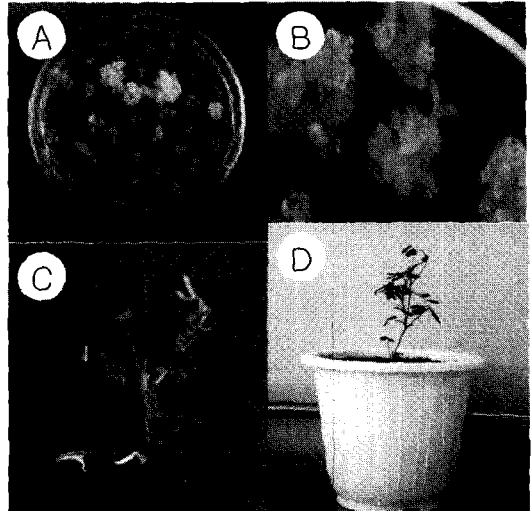


Fig. 3. Selection of transformed callus and plant regeneration. A, Selected alfalfa callus on antibiotic containing medium; B, Development of shoot formation; C, Induction of root formation; D, Regenerated alfalfa plant.

3. 형질전환 확인

알팔파의 형질전환 여부는 재분화된 알팔파의 잎조직에서 genomic DNA를 분리하여 PCR 분석 및 Southern blot 분석을 실시하여 확인하였다. Genomic DNA는 형질전환 알팔파와 형질전환시키지 않은 알팔파 모두로부터 추출하였으며, 추출한 genomic DNA를 *Bam*H I 제한효소를 이용하여 완전히 절단후 전기영동한 뒤, membrane에 transfer하여 Southern blot 분석을 실시하였다. α -³²P 방사능으로 표지한 *BcHSP17.6* cDNA 단편을 probe로 해서 분석한 결과, 형질전환시키지 않은 알팔파에서는 band가 나타나지 않은 반면, 형질전환 알팔파에서는 약 0.7kb 위치에 band가 나타난 것으로 보아서 PCR 분석에서 확인된 band는 *BcHSP17.6* 유전자 단편이 확실하며, 재분화된 알팔파는 *BcHSP17.6* 유전자로 형질전환되었음이 확인되었다 (Fig. 4).

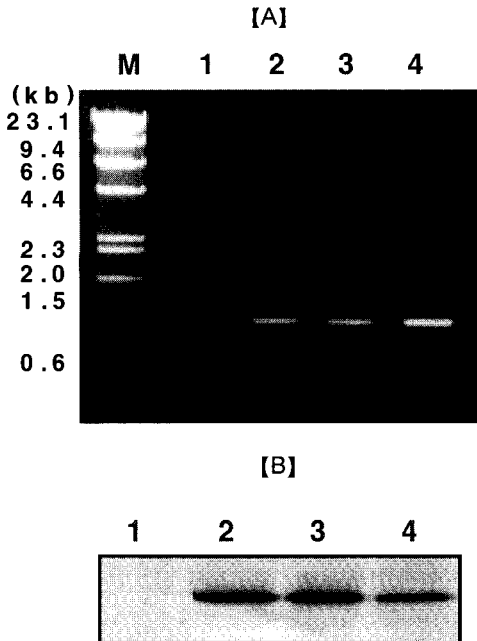


Fig. 4. PCR (A) and Southern blot analysis (B) of transgenic alfalfa plants. Lane 1, *Bam*H I digested genomic DNA from nontransgenic alfalfa plant; Lane 2~4, *Bam*H I digested genomic DNA from transgenic alfalfa plants (Vernal).

따라서 본 실험에서 *BcHSP17.6* 유전자의 도입에 의해 형질전환된 알팔파는 35S promoter에 의해 식물체내에서 항상적으로 발현하므로, 형질전환되지 않은 알팔파에 비해 하고에 견디는 힘이 더 강할 것으로 예상된다. *BcHSP17.6*의 발현이 *E. coli* (Kim 등, 1998a) 및 모델식물인 담배 (Kim 등, 1997)의 내열성을 향상시킨다는 것은 이미 보고되었다. 이 후의 연구에서 형질전환 알팔파의 내하고성을 조사하고, 이들이 내하고성이 강한 우량품종으로 육성할 가치가 있는지를 확인하는 실험을 계속적으로 수행할 계획이다.

IV. 적 요

내열성 유전자인 *BcHSP17.6*를 갖도록 제작한 발현벡터 pBKH4를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA

4404에 도입후, *Agrobacterium*과 알팔파 캘러스의 공배양을 통해 감염시킨 캘러스를 100 μ g/ml의 kanamycin과 500 μ g/ml의 cefotaxim을 첨가한 SH-kc 배지에서 배양하며 형질전환된 캘러스를 선발하였다. 식물체 재분화는 SH- nk-c, SH-sp-c, SH-11b-c, SH-IBA 배지에서 약 4개월간 배양하여 재분화를 완성하였으며, 재분화된 알팔파의 genomic DNA를 분리한 후, PCR 분석 및 Southern blot 분석을 실시하여 알팔파의 형질전환을 확인하였다.

V. 인 용 문 헌

- Holsters, M., O.D. Wael, A. Depicker, E. Messens, M.V. Montagu and J. Schell. 1978. Transfection and transformation of *A. tumefaciens*. Mol. Gel. Genet. 163:181-187.
- Kim, K.Y. and J. Jo. 1997. *BcHSP17.6* (Thermotolerance Gene). GenBank Accession Number AF022217.
- Kim, K.Y., D. Son, Y.G. Park, W.I. Jung and J. Jo. 1993. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of a Plant with *Saccharomyces cerevisiae* Acid Phosphatase Gene (*PHO5*). J. Korean Grassl. Sci. 13(3):177-183.
- Kim, K.Y., M.S. Chung and J. Jo. 1997. Acquisition of Thermotolerance in the Transgenic Plants with *BcHSP17.6* cDNA. J. Korean Grassl. Sci. 17(4):379-386.
- Kim, K.Y., Y.S. Jang, B.H. Lee and J. Jo. 1998a. Expression and Accumulation of LMW HSPs Under Various Heat Shock Conditions. J. Korean Grassl. Sci. 18(4):303-310.
- Kim, K.Y., Y.W. Rim, K.J. Choi, J.S. Shin, J.G. Kim and J. Jo. 1998b. Rapid Regeneration of Plants on N6 Medium from Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) Calli. J. Korean Grassl. Sci. 18(3):267-272.
- Kim, K.Y., J.S. Shin, Y.W. Rim, K.J. Choi, Y.S. Jang, W.H. Kim, B.H. Lee and J. Jo. 1999. Callus formation from alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed and plant regeneration from alfalfa calli. J. Korean Grassl. Sci. 19(1):23-30.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA.

- Nucleic Acids Res. 8:4321-4325.
9. Schenk, R.U. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199.
 10. Son, D., K.Y. Kim, Y.S. Jang, H. Lee, S.H. Won, B.H. Lee, M.H. Kim and J. Jo. 2001. Root initiation in cut alfalfa stems by treatment of IBA. *J. Korean Grassl. Sci.* 21(1):27-30.
 11. Smith, D. 1981. Forage management in the north. 4th ed., Kendal/Hunt Publishing Company pp. 71-91.
 12. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
 13. 농림부. 2001. 조사료 생산 이용 교육 교재. pp. 3-16.