

유전자총과 아그로박테리움을 이용한 여러 가지 한국 잔디류의 형질전환체계 확립

김종보* · 김경덕 · 박대섭

삼성에버랜드 잔디환경연구소

Establishment of a transformation protocol combination particle bombardment
with *Agrobacterium tumefaciens* in different zoysiagrass cultivars

Jong-Bo Kim*, Kyong-Duck Kim, and Dae-Sup Park

Turfgrass and Environment Research Institute, Samsung Everland Inc.

ABSTRACT

In this report, several factors such as infection time and concentration of bacterial suspension, influencing on transient gene expression in *Agrobacterium*-mediated transformation were evaluated. An appropriate concentration (O.D600nm = 1.0-1.2) of bacteria and 30 min of infection time showed a higher level of GUS expression. To improve transformation efficiency (TE), friable embryogenic calli (FEC) were bombarded by tungsten particles without plasmid DNA, and then co-cultivated with *A. tumefaciens* LBA4404 which contains pTOK233 super binary vector, carrying neomycin phosphotransferase (NPTII), hygromycin phosphotransferase (hpt) and β -glucuronidase (GUS) genes. Three days after co-cultivation with *A. tumefaciens* and particle bombardment, FEC cultures were transferred to the selection medium (SM: MS medium supplemented with BA 1mg/l, hygromycin 100mg/l, cefotaxime 250 mg/l and vancomycin 200mg/l). They were cultured for 2 weeks and then transferred to the second SM containing hygromycin 50mg/l, cefotaxime 200 mg/l and vancomycin 100mg/l. Later, stable GUS expression was detected 4 to 6 weeks after transfer to the SM. Further, TE from *Agrobacterium*-mediated transformation after particle bombardment increased to about 3-folds compared with *Agrobacterium*-mediated transformation without particle bombardment. In the present study, we established an efficient transformation protocol of zoysiagrass by using *A. tumefaciens* in the combination with particle bombardment for the first time.

Key words: *Agrobacterium*, embryogenic callus, particle bombardment, transformation, zoysiagrass

*Corresponding author. Tel : 031-460-3408
E-mail : jb1011.kim@samsung.com

서 론

들잔디 (*Zoysia japonica* Stued.)는 난지형 잔디에 속하며, 한국을 포함한 극동아시아 및 미국 중남부 등의 대부분의 온대지역에 분포하는 식물이다. 그 용도는 도로부근, 하천제방, 묘지 등의 퍼복용과 주택 및 공원의 조경용으로 쓰이고 있다 (배 등, 2001). 또한 최근 한국잔디의 중요성이 나날이 증대되면서, 병저항성, 제초제저항성, 내음/내서/내고온성, 그리고 녹색 기간 연장형 등의 다양한 형질을 가진 잔디품종 개량연구와 마찬가지로 한국에서도 도입, 선발 및 교배 등의 고전기술을 이용하여 한국잔디의 품종개량이 이루어져 왔지만, 그 결과는 미미한 편이다. 이를 해결하기 위해서는 생명공학 기술을 포함하는 첨단 기술과 국내 잔디유전자원을 활용한 고전육종기술을 활용하여 새로운 품종개량연구가 필요한 실정이다 (임 등, 2003). 그러나 타 작물의 경우와 마찬가지로 잔디품종개량에서 고전육종기술의 적용 시에 직면하게 되는 한계점들이 발견됨에 따라 70년대부터 급속히 발전하기 시작한 식물분자 생물학 및 생명공학기술의 도입이 절실했으나, 이런 경향에 맞추어 80년대 후반 이후부터 잔디품종개량에 형질전환방법들이 도입되어 이용되고 있는데 그 중 각광 받고 있는 방법으로는 *Agrobacterium*을 매개로 특정유전자를 작물에 도입시키는 방법과 텅스텐 등의 입자에 외래 DNA를 코팅하여 물리적으로 식물세포로 도입시키는 particle bombardment방법이 있다. 전자는 안전성과 재현성이 높고 경제적으로 유리하며 특히 single copy도입이 가능하다는 장점이 있으나, 쌍자엽 식물에서 체계적인 유전자 전이가 이루어지고 화본과 및 백합과 등의 단자엽 식물에서는 그 효율이 떨어지고, T-DNA 전이에 관여하는 폐놀화합물 및 온도 등의 조

건 등이 최적화되어야 하는 문제점이 발견되었다 (Hiei et al., 1994, 1997). 그러나 particle bombardment는 숙주식물에 상관없이 형질전환을 시도할 수 있고, 형질전환과정이 순쉬운 장점이 있으며, 여러 종류의 절편체에 형질전환이 가능하고 비교적 효율이 높은 장점을 지니고 있다. 반면 단점으로는 고가의 기기가 요구되고 multiple-copy 도입에 따른 chimeric 식물체 발생빈도가 높다는 점들이 보고 되어왔다 (Christou, 1997). 이러한 대부분의 쌍자엽 및 상당수의 단자엽 식물의 형질전환에 사용 되어온 방법들이 한국잔디에도 일부 적용되어 왔으나, 낮은 형질전환효율, 재현성 저하, 그리고 품종 특이적인 형질전환 결과들이 관찰 되었다 (Chai et al., 2000; 임 등, 2001). 또한 형질전환 잔디의 재분화 과정도 오랜 기간이 소요되고, 여러 품종에 적용하기 힘든 문제점이 노출되었다. 최근엔 이외에도 최근 베뮤다그래스에서 유전자총을 이용한 형질전환에서 체세포변이가 발견되는 문제점도 보고 되었다 (Goldman 등, 2004).

따라서 본 연구에서는 4가지 다른 한국잔디 품종에서 유기된 베릴생캘러스 계통들을 이용하여 *Agrobacterium* 형질전환 조건을 확립하여 위에서 언급한 문제점들을 어느 정도 최소화 하고, 동시에 particle bombardment로 상처를 유발시킨 후, *Agrobacterium*과 공동배양을 하여 어느 정도 형질전환효율이 향상 되는지를 알아보고자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료살균

식물재료로는 한국잔디의 품종 중 4개 품종 (*Z. japonica*, S94, Sinica Common, 안양종지)의 종자를 절편체로 사용하였다. 성숙종자를 70% 에탄올에서 1분간 침지하고, 멸균수로 1

회 수세 후에 4% NaOCl (유한락스)에 15분간 교반 하면서 표면살균 하였다. 살균된 종자는 멸균수로 3회 이상 세척한 후, 멸균된 여과지로 옮겨 건조한 후에 아래에 명시된 캘러스 유도 배지 (Callus induction medium: CIM)로 치상하였다.

식물체 캘러스 형성

멸균 처리된 종자로부터 형질전환에 사용할 캘러스를 유기하기 위해 CIM (MS 기본배지 ((Murashige and Skoog, 1962))에 2,4-D 3 mg/l, sucrose 30g/l 및 plant agar 5.5g/l, pH 6.0)에 치상 후, 25±1°C의 암조건에서 4주간 배양한 후, 형성된 캘러스 중에서 노란색의 잘 부서지는 배발생캘러스를 선택하여 상기 CIM에서 다른 성분은 동일하고 2,4-D 농도만 1mg/l로 낮춘 증식배지로 옮겨 주었다.

배양절편체의 kanamycin과 PPT(Phosphino-tricin) 선발농도 검정

일반적으로 형질전환실험에 선발마커로 많이 사용되어지는 kanamycin과 PPT의 적정선발농도를 조사하고자 본 실험의 선발배지에 첨가되는 kanamycin (0, 10, 50, 100, 200, 300, 400 mg/l)과 PPT (0, 1, 5, 10, 20, 50, 100 mg/l)을 재분화 배지 (MS 기본염류, BA 0.5mg/l, sucrose 30g/l, pH 6.0)에 첨가하여 실험하였다. 지름 2-3mm의 배발생캘러스를 25개/plate로 배양하였고, 반복은 25개가 배양된 plate 10개로 10반복하였으며, 배양 6주 후에 절편체의 고사율과 신초형성을 조사하였다.

Agrobacterium을 이용한 형질전환

형질전환에 사용된 벡터는 super binary vector인 pTOK238으로서 T-DNA 내부에 intron을 포함한 GUS (β -glucuronidase), NPTII (neomycin phosphotransferase:

kanamycin 저항성) 및 HPT (hygromycin phosphotransferase: hygromycin 저항성) 유전자를 포함하고 있으며, 이 벡터를 *Agrobacterium* strain LBA4404에 도입하여, kanamycin 50mg/l과 hygromycin 50 mg/l가 포함된 AB배지에서 28°C에서 2일간 배양한 후, 형질전환에 이용하였다. 배발생캘러스를 상기 벡터가 포함된 LBA4404 혼탁액 (O.D600nm = 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0)에 각각 1, 5, 15, 30, 60분간 침지시킨 후, 무균여과지에서 20분간 건조 시킨다. 건조 후에 공동배양배지 위에서 25±1°C, 3일간 암조건에서 공동배양을 실시하고 나서, 세척배지 (MS 액체배지, cefotaxime 300mg/l과 vancomycin 250mg/l)에서 6시간 배양한 후, 호르몬이 제거된 선발배지 (MS 고체배지, cefotaxime 250mg/l)에서 10일간 25°C, 연속 명배양 (약 1,500-2,000 lux) 조건하에서 배양하였다. 형질전환은 하나의 페트리디쉬에 필터를 놓고 그 위에 100mg의 배발생캘러스 덩어리를 메스를 이용하여 골고루 퍼지게 한 후 실시하였고, 실험은 4반복으로 실시하였다.

Particle gun 전처리를 통한 *Agrobacterium* 형질전환

또 하나의 시도로서 먼저 particle gun (PDS-1000/He, Bio-Rad, U.S.A)을 이용하여 아무런 plasmid DNA도 들어있지 않은 텅스텐 입자로 배발생캘러스에 상처를 입힌 후, 위의 경우처럼 *Agrobactreium* 형질전환을 실시하였으며, 한편 particle bombardment 실험은 임 (2001)등의 방법을 아래와 같이 일부 변형하여 실시하였다. 먼저 50mg의 텅스텐 입자를 70% 에탄올에 세척하고, 50% glycerol 500 μ l로 혼탁 하였다. 혼탁액을 진탕하여 잘 섞은 다음, 1.5ml 새 튜브에 플라스미드 DNA 10 μ l, CaCl2 (2.5M) 50 μ l, 0.1 M spermidine 20 μ l

을 차례로 넣어 70% 에탄올로 한번 더 수세한 후, 최종적으로 100% 에탄올을 첨가하여 최종 10ml로 맞추어 -20°C에 보관하였다. 여기서 163μl씩 혼탁액을 microcarrier에 분주하여 형질전환에 사용하였고, 페트리디иш 중앙의 지름 3.5cm 안에 약 250mg의 배발생캘러스를 골고루 퍼지게 한 후 시행하였고, 각 1회 실험에 10개의 페트리디иш가 사용되었다. Helium 가스의 압력조건과 사출거리는 임 등 (2001)의 방법에 따라 시행하였다.

형질전환체 선발

첫번째 방법인 오직 *Agrobacterium*을 통하여 형질전환 시킨 경우 그리고 두번째 방법인 particle gun으로 상처를 먼저 유기하고 *Agrobacterium*으로 형질전환 한 배발생캘러스들을 형질전환 직후에 cefotaxime 250mg/l, vancomycin 200mg/l과 hygromycin 100mg/l 첨가된 1차 선발배지에서 3주간 배양한 후, 2차 선발배지 (cefotaxime 200mg/l, vancomycin 100mg/l, hygromycin 50mg/l)로 옮겨 재분화를 유도하였다. 2차 선발배지에서 배양 8주 후에, 살아 남은 캘러스들을 신선한 동일성분의 배지로 옮겨 주어 재분화를 유도하였다. 선발과정에서 모든 배양은 25±1°C, 16시간 명조건

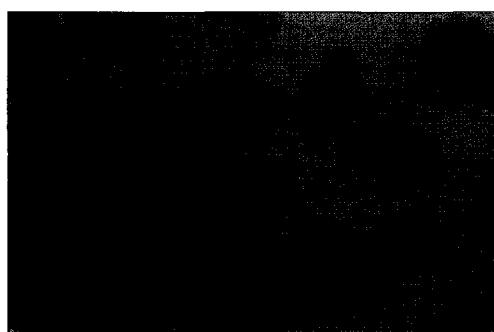
으로 실시하였다.

GUS검정 및 형질전환 효율측정

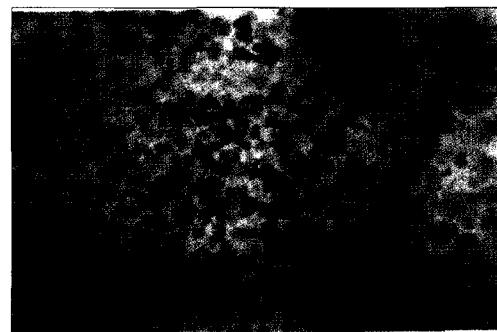
항생제 및 제초제 선발배지에서 선발된 배발생캘러스에서 유전자의 도입 및 발현의 확인은 먼저 쉽게 확인할 수 있는 GUS 유전자를 이용하여 실시하였다. 형질전환 10일, 4주 그리고 12주가 경과된 시점에서 각각의 방법을 이용하여 형질전환 된 배발생캘러스들의 GUS 유전자의 발현분석을 Jefferson 등 (1987)의 방법에 따라 조사하였다.

결과 및 고찰

선발배지에서의 kanamycin/PPT (phospinotricin) 적정선발농도 한국잔디류에서 형성된 배발생캘러스 (Fig. 1a)를 항후 형질전환체 선발 시에 적정한 kanamycin과 PPT농도를 조사하고자 재분화배지에 hygromycin을 0-400mg/l까지 첨가하고 PPT의 경우에는 0-100mg/l의 농도로 각각 첨가하였다. 배발생캘러스의 생존율은 hygromycin의 경우 100mg/l의 농도에서 적절한 선발이 이루어졌으나 (임 등, 2001), kanamycin을 선발배지에 첨가하여 형질전환 계통을 선발 시에는 단자엽이 자연적으로



(a) Embryogenic calli used in this study



(b) GUS expression on embryogenic calli of *Zoysia japonica*

Fig 1. *Agrobacterium*-mediated transformation in zoysiagrass

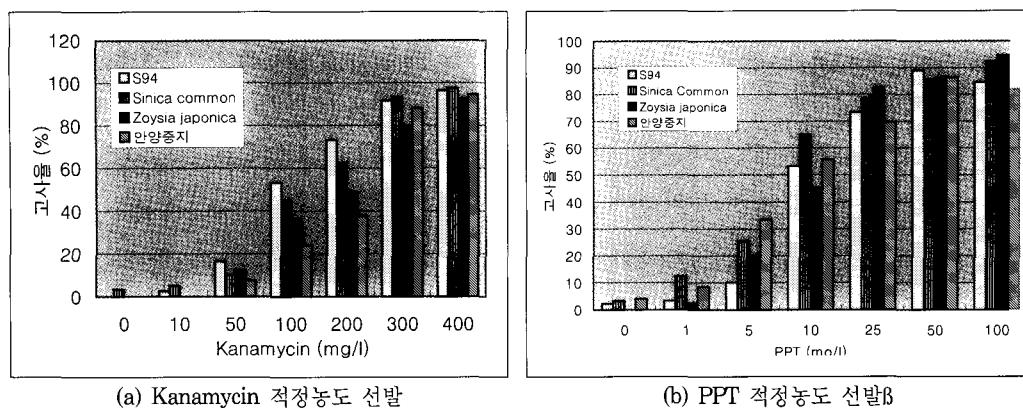


Fig. 2. Kanamycin and PPT (phosphinotricin) resistance of embryogenic calli on selection medium (MS basal salts with BA 0.25mg/l and sucrose 30g/l) after 6 weeks of culture.

kanamycin에 대해 저항성을 가지고 있으므로 선발이 어려운 단점이 있다. Kanamycin 100mg/l가 첨가된 배지에서 10% 미만의 신초 형성율을 나타내었으며, 300mg/l의 농도에서 모든 캘러스의 생장이 억제되었고, 80-85%의 캘러스가 고사하였다. 그러나 kanamycin의 경우에는 200mg/l의 농도에서 어느정도 선발이 가능하였으나, 일부 배발생캘러스의 경우 체세 포배 형성도 관찰되었다. 따라서 300mg/l정도의 kanamycin이 사용되어야 좀 더 효율이 높은 형질전환체 선발이 가능하였다 (Fig. 2a). 또 한 PPT의 경우는 50mg/l에서 배발생캘러스의 생장이 정지되고 갈변화되어 형질전환체 선발

에 적정한 농도라고 사료되었다 (Fig. 2b).

*Agrobacterium-mediated*의 적정 박테리아 농도(O.D값)과 감염시간의 조건 구명

*Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 한국 잔디류의 GUS 유전자 발현효율에 영향을 미치는 요인 중, 박테리아 농도 (O.D600nm)의 효과와 감염시간을 조사하였는데, 박테리아 농도 조사 실험에서는 O.D600nm = 1.8에서 가장 높은 GUS 유전자 발현정도를 나타내었다 (Table 1). 그러나, 이 농도에서 형질전환 된 배발생캘러스 들은 배양 2-4주 사이에 박테리아에 의한 심한 오염율을 나타내어 형질전환

Table 1. Effect of bacterial density on transient GUS gene expression in Zoysiagrass cultivar S94

Bacterial density (O.D600nm)	# of hygromycin positive calli / 80 calli ¹	# of GUS spot / 500mg of calli ²	Level of bacteria overgrowth ²
0.3	7.5c ³	15.3±2.1c	-
0.5	13.4c	45.1±6.8bc	+
0.8	25.5b	59.9±9.6bc	+
1.2	35.3a	73.2±13.9a	++
1.8	32.2ab	84.5±12.4a	+++

1: Data were evaluated at 24 days after transformation.

2: Data were evaluated at 36 days after transformation. -: no overgrowth, +: less, ++: normal, +++: severe over-growth

3: Mean separation in columns by Duncans multiple range test at P=0.05

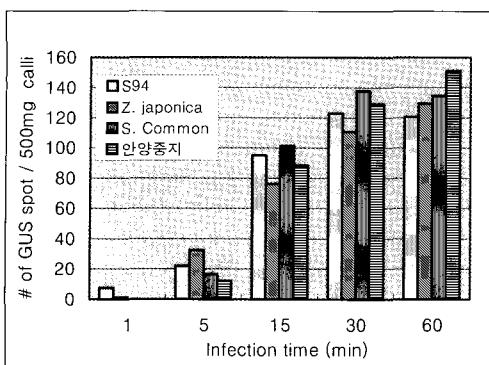


Fig 3. Effect of infection time on transient GUS gene expression in Zoysiagrass

효율을 계산하는데 어려움이 발생하였으므로, 향후 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에는 O.D600nm=1.0-1.2의 농도로 배발생캘러스들을 감염시킨 후, 공동배양 하는 것이 효과적이라고 사료된다. 한편 박테리아 감염시간이 형질전환 효율에 미치는 영향을 살펴보면, 4가지 잔디품종들에서 유기된 배발생캘러스를 *Agrobacterium*과 30분 동안 감염시켰을 경우, GUS 유전자의 발현도 다른 처리구에 비해 비교적 높은 경향을 나타내었고, 선발과정에서 발생하는 박테리아에 의한 감염도 거의 나타나지 않았다 (Fig 3).

Particle bombardment 전처리 효과

*Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 형질전환을 하기 전에 particle bombardment를 이용한 전처리가 전이된 유전자의 발현에 어떤

영향을 미치는가를 알아보았다 (Table 2). 일반적으로 형질전환 실험에서 한 가지 방법만을 사용하는 것이 보편적이나, 본 연구에서는 두 가지 방법을 병행하여 형질전환 효율을 향상시키고자 하였다. 이 방법을 이용하여 참나리에서는 3배 이상 높은 형질전환 효율을 나타내었다 (남 등, 2004). 표 2에 나타난 것처럼 hygromycin이 첨가된 배지에서만 선발한 경우, *Agrobacterium*만 이용하여 형질전환 시킨 경우보다 20% 정도 낮은 선발효율을 나타내었으나, hygromycin과 kanamycin이 2가지 항생제가 첨가된 선발배지에서 선발 시에는 particle bombardment를 병행하여 형질전환 한 방법이 escape의 발생도 감소하고 GUS 유전자 발현에 있어서도 30% 향상된 결과를 나타내었다 (Table 2). 형질전환 과정에서 *Agrobacterium*만 사용하는 경우는 식물조직의 상태에 따라서 효율에 영향을 받지만, particle bombardment를 이용하여 식물체 조직에 상처를 유발 시킨 후, *Agrobacterium*을 감염 시키면 표피세포가 얇은 캘러스 조직뿐만 아니라 분열조직, 줄기 및 잎 등의 다양한 식물조직에서도 효과적일 것이라고 추론하였다 (남 등, 2004). 참나리 외에도 카네이션과 해바라기에서도 particle bombardment를 이용하여 상처를 유발시킨 후, *Agrobacterium* 감염을 시켜 더 높은 형질전환 효율을 얻었다고 보고하였다 (Zuker et al., 1999; Lucas et al., 2000). 이 particle bombardment처리가 식물

Table 2. Effect of pre-treatment by particle bombardment on transient GUS gene expression in Zoysiagrass

Treatment	# of callus clumps with Hygr+/500mg FEC	# of callus clumps with Hygr+/Kan+/500mg FEC	# of GUS spot/500mg FEC
Only A ¹	73	41	125.5±8.4b ³
P+A ²	59	51	176.2±19.7a

1: Co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*.

2: Co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* after particle bombardment

3: Means followed by different letters are significantly different at the P=0.05 level

조직에 미세한 상처를 발생시키고, 이 상처를 통해서 *Agrobacterium*이 좀 더 쉽게 침투하여 감염이 되는 환경을 조성해 준 것으로 사료된다(남 등, 2004).

요 약

다양한 Zoysiagrass 4가지 품종들을 식물재료로 사용하여 *Agrobacterium*만 이용한 방법 그리고 particle bombardment로 배발생캘러스에 상처를 낸 후, *Agrobacterium*으로 공동배양 시키는 2가지 다른 형질전환 방법을 비교하였다. 예비실험에서 일반적으로 형질전환에 널리 사용되는 kanamycin과 PPT (phospinitrinicin)의 적정선발농도에 대해서 실험하였는데, kanamycin의 경우 300mg/l 그리고 PPT의 경우는 50mg/l의 농도에서 가장 효과적인 선발효율을 나타내었다. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환은 *Agrobacterium*을 2일간 배양시킨 다음, 박테리아 농도를 O.D 600nm=1.0 - 1.2로 맞추고, 배발생캘러스를 30분간 감염 시키는 방법이 효과적이었는데, particle bombardment를 이용하여 캘러스에 상처를 유발시킨 후, *Agrobacterium*으로 감염시키면 3배 이상 높은 형질전환 수율을 획득할 수 있었다. 이상의 결과는 한국잔디 형질전환에 있어서 particle bombardment과 *Agrobacterium*을 병행하여 실시한 최초의 보고이고, 이러한 시스템을 기반으로 하여 향후 한국잔디를 포함하여 다른 난지형 및 한지형 잔디의 품종개량에 널리 이용되리라 생각된다.

참고문헌

- Chai, M. L., D. H. Kim. 2000. Agrobacterium-mediated transformation of Korean Lawngrass (*Zoysia japonica*). J. of Korean Soc. Hort. Science 41: 455-458.
- Christou, P. 1997. Rice transformation: bombardment. Plant Molecular Biology 35:197-203.
- Goldman, J. J., Hanna, W. W., Fleming, G. H., Ozias-Akins, P. 2004. Ploidy variation among herbicide-resistant bermudagrass plants of cv. TifEagle transformed with the bar gene. Plant Cell Rep. 22:553-560.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant J 6:271-282.
- Hiei, Y., Komari, T., Kubo, T. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol Biol 35: 205-218.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., Bevan, N. H. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker for higher plants. EMBO J 6: 3901-3907.
- Lucas O, Kallerhoff J, Alibert G. 2000. Production of stable transgenic sunflowers (*Helianthus annuus* L.) from wounded immature embryos by particle bombardment and co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. Molecular Breeding 6: 479-487.
- Murashige, T., and F, Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

9. Zuker A, Ahroni A, Tzfira T, Ben-Meir H, Vainstein A. 1999. Wounding by bombardment yields highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Molecular Breeding* 5: 367-375
10. 남상욱, 김혜영. 2004. Particle Bombardment에 의해 전처리된 참나리 (*Lilium lancifolium* Thunb.) 캘러스의 *Agrobacterium tumefaciens*를 통한 형질전환. *Korean J. Plant Biotechnol.* 31(1):13-17.
11. 배창규, 遠山統一, 이성춘, 임용표, 김호일, 송필순, 이효연. 2001. 성숙종자 유래 캘러스를 이용한 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)의 효과적인 식물체 재분화. *Korean J. of Plant Tissue Culture* 28(2):61-67
12. 임선형, 강병철, 남궁용, 신흥균. 2001. 유전자총을 이용한 잔디 형질전환 체계 확립. *Kor. Turfgrass Sci.*, 15(1) 9-14.
13. 임용우, 김기용, 김맹중, 성병렬, 임영철, 정의수, 신흥균, 김용선. 2003. 한국잔디 수집계통들 중에서 우수계통들의 생육특성 비교. *Kor. Turfgrass Sci.* 17(2,3) 75-80.