

오차드그래스의 형질전환에 있어서 Acetosyringone과 품종이 미치는 영향

이기원 · 이상훈 · 이동기 · 김도현 · 이병현

Effect of Acetosyringone and Variety on Transformation of Orchardgrass

Ki-Won Lee, Sang-Hoon Lee, Dong-Gi Lee, Do-Hyun Kim and Byung-Hyun Lee

ABSTRACT

Effects of acetosyringone and on *Agrobacterium*-mediated transformation of orchardgrass were investigated. Embryogenic calli induced from 3 varieties, Frontier, Potomac and Roughrider, were infected and co-cultured with *Agrobacterium* EHA101 carrying standard binary vector pIG121Hm encoding the hygromycin phosphotransferase (HPT), neomycin phosphotransferase II (NPTII) and intron-containing β -glucuronidase (intron-GUS) genes in the T-DNA region. The effects of varieties and acetosyringone (AS) concentrations on transformation and the expression of the GUS gene were investigated. Inclusion of 200 μ M AS in inoculation and co-cultivation media lead to a significant increase in stable transformation efficiency. Hygromycin resistant calli were developed into complete plants via somatic embryogenesis. GUS histochemical assay and PCR analysis of transgenic plants demonstrated that transgenes were integrated into the genome of orchardgrass.

(Key words : *Agrobacterium*, Orchardgrass, Transformation)

I. 서 론

오차드그래스 (*Dactylis glomerata* L.)는 다년생의 북방형 화본과 사료작물로서 우리나라에서도 널리 재배되고 있는 주요한 사료작물에 속한다 (Dalton 등, 1999). 그러나 여름철 기온이 25°C 이상의 고온이 지속될 때에는 하고현상 (summer depression)을 나타내어 적절한 재배 관리를 해주지 못하면 고사되기 쉽고, 내건성

과 월동성이 다소 약하며 출수기 이후에는 사료가치가 급격히 저하되는 등의 단점이 있다 (Van과 Sleper, 1996). 이러한 단점을 보완하기 위하여 최근 목초와 사료작물에 유용유전자를 도입하여 신품종을 개발하는 분자육종 연구가 시도되고 있다 (McKersie, 1997; Spangenberg 등, 1998).

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환 기법은 가장 경제적이며 genome 내에 1~2 copy의 적은

경상대학교 응용생명과학부 낙농학전공(Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea)

Corresponding author : Byung-Hyun Lee, Major of Dairy Science, Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Tel : +82-55-751-5418, Fax : +82-55-751-5410, E-mail: hyun@gsnu.ac.kr

수의 copy number로 도입되며 특히 거대분자의 DNA도 안정적으로 도입하는 것이 가능하여 매우 효율적인 형질전환 기법 중에 하나로 알려져 있다 (Hiei 등, 1994). 최근 *Agrobacterium* 법에 의한 화분과 사료적물 형질전환에 대한 보고가 툴 페스큐 (Lee 등, 2004; Dong과 Qu, 2005) 이탈리아 라이그래스 (Bettany 등, 2003) 및 페레니얼 라이그래스 (Bajaj 등, 2006) 등에서 보고되어 다른 화분과 사료작물로의 응용범위가 점점 넓어지고 있다. *Agrobacterium* 법에 의한 오차드그래스의 형질전환에 대한 보고는 Lee 등 (2006)에 의해 최근 보고된 바 있다.

본 연구에서는 오차드그래스에 유용유전자를 도입하여 신품종을 개발하기 위한 기초실험으로 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환의 경우 품종과 배지첨가물질인 AS의 첨가농도 차이가 형질전환의 효율에 어떤 영향을 미치는지 체계적으로 조사함으로써 오차드그래스의 최적의 형질전환조건을 확립하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료

형질전환을 위한 재료로는 오차드그래스의 품종 중 Frontier, Potomac과 Roughrider 3가지 품종의 성숙종자로부터 유도된 배발생 캘러스를 사용하였다. 캘러스 유도를 위해 종자의 살

균은 Lee 등 (2006)의 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 성숙종자의 종피를 제거한 다음 70% ethanol에서 30초간 표면살균하고 멸균수로 3회 세정한 후, 다시 5% (v/v) sodium hypochlorite 용액을 첨가하여 30분간 교반하면서 표면살균 하였다. 살균한 종자를 MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지를 기본으로 하는 캘러스 유도배지 (3 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BA, 300 mg/L L-proline, 100 mg/L myo-inositol, 30 g/L sucrose, 3 g/L Gelrite)에 치상한 후 유도된 배발생 캘러스를 4주간 배양하여 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 사용하였다.

2. *Agrobacterium* 배양 및 감염

형질전환을 위하여 pIG121Hm (Hiei 등, 1994, Fig. 1) 발현벡터를 *Agrobacterium* strain EHA101에 형질전환한 후, 단일 colony를 선발하여 kanamycin (Km)과 hygromycin (Hm)이 각각 50 mg/L로 첨가된 YEP 액체배지에 접종, 배양하여 캘러스의 감염에 이용하였다. *Agrobacterium*의 감염과 공동배양은 Lee 등 (2006)의 방법에 준하여 실시하였다.

3. 형질전환체의 선발과 식물체 재분화

공동배양이 끝난 캘러스는 N6 (Chu 등, 1975)

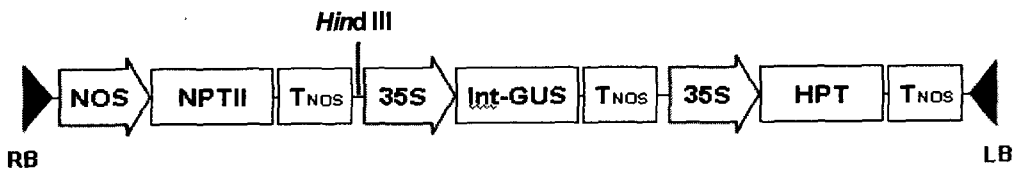


Fig. 1. Schematic diagram of the T-DNA region of expression vector, pIG121Hm. RB, right border; LB, left border; NPTII, neomycin phosphotransferase II; Int-GUS, β -glucuronidase; HPT, hygromycin phosphotransferase; NOS, nopaline synthase promoter; 35S, cauliflower mosaic virus 35S promoter; TNOS, 3' signal of nopaline synthase terminator.

선발배지(250 mg/L cefotaxime, 25 mg/L Hm, 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 500 mg/L L-proline, 3 mg/L thiamine-HCl, 30 g/L sucrose, 3 g/L gelrite)에서 3주간 배양하였으며 Hm 내성을 보이는 캘러스만을 선발하여 다시 50 mg/L Hm이 첨가된 선발배지에 옮겨 4주간 배양하여 살아남은 캘러스로부터 식물체를 재분화시켰다. 재분화된 식물체는 50 mg/L Hm이 첨가된 1/2MS 배지가 들어있는 배양병에 옮긴 후 4주간 배양하여 정상적으로 뿌리가 발육되고 살아남는 개체만을 선발하여 pot로 이식하여 온실에서 재배하였다.

4. GUS 분석과 형질전환체 분석

GUS 활성염색은 Jefferson (1987)의 방법에 준하여 실시하였다. GUS 발현조사는 5일간 공동배양한 캘러스를 사용하여 GUS 활성염색을 실시한 후 형질전환 여부를 판단하였다. 온실에서 재배한 형질전환 식물체로부터 genomic DNA를 CTAB법으로 분리한 후 Lee 등 (2006)의 방법에 준하여 pIG121Hm 벡터의 GUS 유전자를 primer를 사용하여 증폭시킨 후 agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Acetosyringone 첨가에 따른 형질전환효율의 차이

오차드그래스의 *Agrobacterium*을 이용한 최적 형질전환조건을 조사하기 위하여 *Agrobacterium*의 감염효율에 가장 큰 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있는 AS의 첨가에 따른 효과를 조사한 결과 Table 1과 같이 나타났다. AS를 100 또는 200 μ M 농도로 감염배지와 공동배양배지에 첨가했을 때 형질전환 효율이 각

각 64.1%와 71.3%로 높게 나타났다. 그러나 200 μ M 이상의 고농도 AS 첨가구에서는 캘러스가 갈변하여 치사되는 비율이 높아져 형질전환효율이 오히려 감소하였다. 또한 AS 무첨가구의 경우 형질전환 효율은 낮았지만 GUS 발현이 확인되었다. 이러한 결과는 AS의 첨가가 오차드그래스의 형질전환에 필수적이지는 않으나, 형질전환 효율을 현저히 증가시키는 중요한 요인 중의 하나임을 나타낸다.

AS는 *Agrobacterium*의 식물세포 감염 관련 유전자인 *vir* 유전자를 활성화시키는 페놀성 화합물로 알려져 있는데 (Usami 등, 1987), 대부분의 단자엽 식물조직에서는 이 물질이 합성되지 않아서 *Agrobacterium*에 의한 형질전환의 장애요인으로 작용해 왔다. 특히 버 (Hiei 등, 1995)와 옥수수 (Ishida 등, 1996)의 경우 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 있어서 AS의 첨가가 필수적이라고 보고된 바 있다.

2. 품종에 따른 형질전환 효율의 차이

오차드그래스의 세 가지 품종에 *Agrobacterium* 접종배지와 공동배양배지에 200 μ M의 AS를 첨가하거나 무첨가 하여 품종에 따른 GUS 활성염색이 되는 캘러스의 비율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 모든 오차드그래스 품종에서 200 μ M의 AS 첨가와 무관하게 GUS 활성염색은 되었으나 품종에 따른 형질전환 효율에는 상당한 차이를 나타내었다.

품종별로는 *Agrobacterium*으로 감염시킨 전체 캘러스 중에서 GUS 활성염색이 되는 캘러스의 비율로 조사한 결과, 'Roughrider' 품종이 AS를 첨가하지 않았을 때 GUS 활성염색 되는 비율이 34.9%, 그리고 200 μ M의 AS를 첨가해 주었을 때에는 59.1%로 24.2% 증가하여 세가지 품종 중 형질전환효율이 가장 높은 것으로 나타났다.

Table 1. Effect of acetosyringone on the transformation efficiency of orchardgrass

AS (μM) ^a	No. of calli tested	No. of calli with GUS stained	Calli with GUS spots (%) ^b
0	150	26.7 \pm 3.8	17.8 \pm 2.8
100	150	96.2 \pm 3.5	64.1 \pm 4.4
200	150	107.0 \pm 2.5	71.3 \pm 5.6
300	150	84.2 \pm 4.4	56.1 \pm 3.9
500	150	77.6 \pm 5.6	51.7 \pm 2.4

^a Embryogenic calli were used for co-cultivation with each *Agrobacterium* strain for 5 days.

^b Values represent the mean \pm standard deviation (SD) of three independent co-cultivation experiments.

Table 2. Effect of varieties on transformation efficiency in seed-derived callus of orchardgrass

Varieties	AS ^a	Number of calli tested	No. of calli with GUS stained	Calli with GUS spots (%) ^b
Roughrider	—	150	52.3 \pm 3.6	34.9 \pm 3.1
	+	150	88.7 \pm 3.1	59.1 \pm 4.1
Potomac	—	150	25.3 \pm 4.2	10.9 \pm 2.1
	+	150	37.7 \pm 2.5	15.1 \pm 3.7
Frontier	—	150	31.0 \pm 3.6	20.7 \pm 3.8
	+	150	67.3 \pm 8.5	44.9 \pm 5.7

^a — and + denote the absence and presence of 200 μM acetosyringone, respectively, in both the inoculation and co-culture media.

^b Values represent the mean \pm standard deviation (SD) of three independent experiments.

3. Polymerase Chain Reaction (PCR) 분석

형질전환 식물체의 genome내에 pIG121Hm 발현 vector가 가지고 있는 T-DNA 영역이 도입되었는지를 확인하기 위해 온실에서 재배중인 형질전환 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR 분석을 실시하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 비형질전환 식물체에서는 증폭산물을 확인할 수 없었으나, 형질전환 식물체에서는 0.4 kb의 증폭 산물이 관찰되어 T-DNA 영역이 형질전환 식물체의 genome내로 정상적으로 도입되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

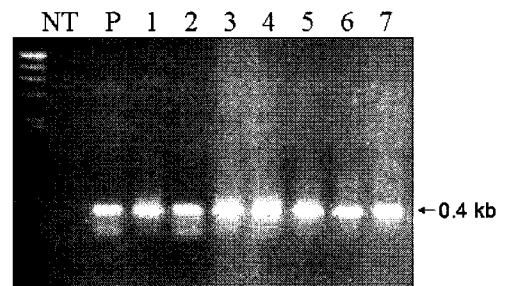


Fig. 2. PCR analysis for detecting GUS gene in transgenic orchardgrass plants. Lane 1, Molecular mark. lane 2, wild type, lane 3, plasmid DNA, lane 4-10, transgenic plant.

IV. 요약

유용유전자 도입을 통한 신품종 오차드그래스를 개발할 목적으로 *Agrobacterium*을 이용한 효율적인 형질전환 체계를 확립하였다. 오차드그래스 성숙종자 유래의 캘러스를 standard binary vector인 pIG121Hm을 가지고 있는 *Agrobacterium*을 이용하여 감염시킨 후 공동배양하여 형질전환 시켰다. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 있어서 중요한 인자로 작용하는 AS 첨가와 오차드그래스 품종에 따른 캘러스의 형질전환 효율의 차이를 GUS 유전자의 발현정도로 조사하였다. ‘Roughrice’ 품종의 형질전환 효율이 가장 우수하였으며, *Agrobacterium* 감염시에 접종배지와 공동배양매지에 200 µM의 AS를 첨가해 주었을 때 형질전환 효율이 증가하는 것으로 나타났다. 50 mg/L의 hygromycin이 첨가된 선발배지에서 살아남은 캘러스로부터 정상적인 식물체가 재분화 되었으며 이들 형질전환체에 대한 GUS 염색과 PCR 분석을 실시한 결과 발현벡터의 T-DNA 영역이 형질전환 식물체의 genome에 성공적으로 도입되었음을 확인할 수 있었다.

본 연구를 통하여 확립된 효율적인 형질전환 시스템은 환경스트레스 내성 신품종 오차드그래스의 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

V. 사사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 연구비 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

VI. 인용문헌

1. Bajaj, S.Y., J. Ran, G. Phillips, S. Kulrajathevan, D.K. Pal, C. Elborough and S. Puthigae. 2006. A high throughput *Agrobacterium tumefaciens*-

mediated transformation method for functional genomics of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant Cell Rep.* 25:651-659.

2. Bettany, J.E., S.J. Dalton, E. Timms, B. Manderyck, M.S. Dhanoa and P. Morris. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Festuca arundinacea* (Schreb.) and *Lolium multiflorum* (Lam.). *Plant Cell Rep.* 21:437-444.
3. Chu, C.C., C.S. Wang, C.C. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu and F. Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica.* 18:659-668.
4. Dalton, S.J., A.J.E. Bettany, E. Timms and P. Morris. 1999. Co-transformed, diploid *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum* and *Lolium temulentum* plants produced by microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.* 18:721-726.
5. Dong, S. and R. Qu. 2005. High efficiency transformation of tall fescue with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.* 168:1453-1458.
6. Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari and T. Kumasiro. 1994. Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6:271-282.
7. Ishida, Y., H. Saito, S. Ohta, Y. Hiei, T. Komari, and T. Kumashiro. 1996. High efficiency of transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotech.* 14:745-750.
8. Jefferson, R.A. 1987. Assay chimeric genes in plant: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405.
9. Lee, S.-H., D.-G. Lee, H.-S. Woo and B.-H. Lee. 2004. Development of transgenic tall fescue plants from mature seed-derive callus via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Asian-Aust J Anim Sci.* 17:1390 - 1394.
10. Lee, S.-H., D.-G. Lee, H.-S. Woo, K.-W. Lee, D.-H. Kim, S.-S. Kwak, J.-S. Kim, Hyegi. Kim, Nagib Ahsan, M.S. Choi, J.-K. Yang and B.-H. Lee. (2006). Production of transgenic orchardgrass

- via *Agrobacterium*-mediated transformation of seed-derived callus tissues. *Plant Science*. 171:408-414.
11. McKersie, B.D. 1997. Improving forage production systems using biotechnology. In: McKersie, B. D. and Brown, D.C.W. (Eds), *Biotechnology in Agriculture Series*, No. 17, CAB International, Wallingford, p. 3.
 12. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15:473-497.
 13. Spangenberg, G., Z.Y. Wang and Potrykus. 1998. *Biotechnology in forage and turf grass improvement*. Frankel et al. *Monographs on theoretical and applied genetics*. Vol. 23. Springer Verlag, Heidelberg. pp. 192-221.
 14. Usami, S.S., Morikawa, I. Takabe and T. Machida. 1987. Absence in monocotyledonous plant so the diffusible plant factors inducing T-DNA circularization and vir gene expression in *Agrobacterium*. *Mol. Gen. Genet*. 209:221-226.
 15. Van, S.E. and D.A. Sleper. 1996. Orchardgrass. In: Moser, L. E. et al(eds), *Cool-season forage grasses*. Vol 34. ASA, CSSA, and SSSA, Madison WI. pp. 503-534.