

캘러스의 형태와 항산화물질 첨가가 톨 페스큐의 식물체 재분화와 형질전환효율에 미치는 영향

이기원 · 이상훈 · 김도현 · 이동기 · 원성혜 · 이호신* · 이병현

Effect of Callus Type and Antioxidants on Plant Regeneration and Transformation of Tall Fescue

Ki-Won Lee, Sang-Hoon Lee, Do-Hyun Kim, Dong-Gi Lee, Sung-Hye Won, Hyo-Shin Lee* and Byung-Hyun Lee

ABSTRACT

An efficient transformation system for the production of transgenic plants has been developed for tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) via *Agrobacterium*-mediated transformation of seed-derived callus. From the point of morphogenetic capacity, three types of callus were selected. High frequency of plant regeneration was obtained by selection of type II callus, and the plant regeneration frequency was 52.6% when embryogenic callus were cultured on the regeneration medium. Supplementation of the media with 10 mg/L AgNO₃ and 40 mg/L cysteine enhanced frequencies of plant regeneration up to 65.3%. The highest transformation efficiency was also obtained when type II callus were inoculated with *Agrobacterium*. Southern blot analysis of PCR products of transgenic plants demonstrated that transgenes were successfully integrated into the genome of tall fescue. Efficient regeneration system and transformation established in this study will be useful for molecular breeding of tall fescue through genetic transformation.

(Key words : *Agrobacterium*, Forage crop, Regeneration, Tall fescue, transformation)

I. 서 론

다년생 화본과 작물인 톨 페스큐 (*Festuca arundinacea* Schreb.)는 목초로 일부 이용되고 있으며, 공원, 골프장 등에 있어서 토양보존용 잔디로도 많이 개발되어 이용되고 있다 (Buckner 등, 1979). 톨 페스큐는 척박한 토양, 습지 및 음지에서 잘 성장하여 사료작물로 이용 시 수량이 많으며, 다양한 환경 스트레스

에도 비교적 잘 적응 한다 (Buckner 등, 1979). 그러나 여름철 기온이 25°C 이상의 고온이 지속될 때에는 하고현상 (summer depression)을 일으키기 쉽고, 잎이 거칠어서 기호성이 낮으며, 특히 출수기 이후에는 사료가치가 급격히 저하되는 등의 단점이 있다 (Fieser와 Vanzant, 2004). 이러한 단점을 보완하기 위해 선발과 교잡을 통하여 톨 페스큐의 품질을 높이고자 하는 전통적인 육종법에 의한 연구가 활발히 진

경상대학교 농업생명과학대학 응용생명과학부 낙농학전공

* 국립산림과학원 생물공학과

Corresponding author : Byung-Hyun Lee, Major of Dairy Science, Division of Applied Life Science, College of Agriculture & Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea
Tel : +82-55-751-5418, Fax : +82-55-751-5410, E-mail : hyun@gnsu.ac.kr

행되고 있다 (Van Wijk 등, 1993). 지금까지 보고되어진 톨 페스큐의 외래 유전자 도입에 의한 형질전환은 원형질체 (Ha 등, 1992)와 particle bombardment (Cho 등, 1999)법이 대부분이다. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 기법은 가장 경제적이며 매우 효율적인 형질전환 기법 중에 하나로 알려져 있다. 최근에는 목초 또는 사료작물의 *Agrobacterium*법에 의한 유용 유전자의 도입에 의한 분자육종법을 통한 신종 개발 연구가 많이 시도되고 있다 (Spangenberg 등, 1998). 지금까지 보고된 톨 페스큐의 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 (Bettany, 2003)의 효율은 극히 낮으며 아직까지 형질전환 체계가 안정적으로 확립되어 있지 못한 실정이다.

본 연구에서는 톨 페스큐의 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 있어서 가장 중요한 몇 가지 요인의 영향에 대해 체계적으로 조사함으로써 고효율 형질전환시스템을 확립하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료

형질전환을 위한 식물재료로는 톨 페스큐의 Kentucky-31 품종을 사용하였다. 캘러스 유도를 위한 종자의 살균은 Lee 등 (2004)의 방법에 준하여 실시하였다. 살균한 종자는 MS (Murashige와 Skoog, 1962) 배지를 기본으로 하는 캘러스 유도배지 (Lee 등, 2004)에 치상한 후 암상 상태에서 6주간 배양하여 캘러스를 유도하였다. 유도된 캘러스를 5 mm 크기로 절단하여 새로운 캘러스 유도배지에서 암상 상태로 3주간 계대배양하여 캘러스를 증식시켰다. 증식된 캘러스의 색깔, 형태 및 전고도 등을 기준으로 하여 세 가지 type으로 분류한 다음, 각각을 식물체 재분화와 *Agrobacterium* 감염에 이용하였다.

2. 첨가물질에 따른 배양효과

배지첨가물질의 효과를 조사하기 위하여 AgNO₃ 및 L-cysteine을 각각 N6 (Chu 등, 1975) 배지를 기본으로 하는 재분화배지 (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)에 농도별로 첨가하여 첨가물질에 따른 배양효과를 조사하였다. 캘러스 유도배지에 살균된 종자를 치상한 다음, 캘러스의 유도율과 식물체의 재분화율을 각각 조사하였다.

3. *Agrobacterium* 배양 및 캘러스의 형질전환

형질전환을 위한 발현벡터는 pIG121Hm (Hiei 등, 1994)를 사용하였다. pIG121Hm 벡터를 가진 *Agrobacterium* strain EHA101을 YEP 액체배지로 28°C에서 하룻밤 배양하여 회수한 후, 기본적으로는 200 µM acetosyringone (AS)이 첨가된 접종배지 (MS medium, 30 g/L sucrose)에 OD₆₀₀ = 1.0이 되도록 현탁한 다음 캘러스의 감염에 이용하였다. 성숙종자로부터 유도된 3-5 mm 크기의 캘러스를 *Agrobacterium*을 현탁시킨 접종배지에 1시간 침지시켜 감염시킨 다음, 여분의 *Agrobacterium*을 멸균된 filter paper 위에서 제거하였다. 감염시킨 캘러스를 공동배양배지 (MS medium, 3 mg/L 2,4-D, 200 µM AS, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 3 g/L Gelrite)에 계대한 후 26°C에서 5일간 암상 상태로 공동배양 하였다. 공동배양한 캘러스는 500 mg/L cefotaxime이 첨가된 공동배양배지로 세정하여 *Agrobacterium*을 제거한 후, postculture배지 (MS medium, 500 mg/L cefotaxime, 3 mg/L 2,4-D, 1 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)에 7일간 배양하였다.

4. 형질전환체의 선발과 식물체 재분화

공동배양과 post-culture가 끝난 캘러스는 선발배지 (N6 medium, 250 mg/L cefotaxime, 25 mg/L hygromycin, 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 배양하여 hygromycin (Hm) 내성을 보이는 캘러스만을 선발하여 다시 50 mg/L Hm 이 첨가된 선발배지에 옮겨 4주간 배양하여 살아남은 캘러스로부터 식물체를 재분화시켰다. 재분화된 식물체는 50 mg/L Hm이 첨가된 1/2 MS 배지가 들어있는 배양병에 옮겨준 후, 4주간 배양하여 정상적으로 뿌리가 발육되고 살아남는 개체만을 선발하여 pot로 이식하여 온실에서 재배하였다.

5. GUS 분석과 도입유전자의 확인

GUS 활성염색은 Jefferson (1987)의 방법에 따라 5일간 공동배양한 캘러스를 이용하였다. PCR-Southern blot 분석은 톨 페스큐의 신선한 잎 조직으로부터 CTAB법 (Murray와 Thompson, 1980)으로 genomic DNA를 분리하여 분석하였다. PCR 반응은 pIG121Hm의 GUS (β -glucuronidase) 유전자의 sense primer 5'-AATTG-ATCAGCGTTGGTGG-3'와 anti-sense primer 5'-GGTGTAGAGCATTACGCTGC-3'을 사용하였으며, Hm 유전자의 sense primer 5'-AATTG-ATCAGCGTTGGTGG-3'와 anti-sense primer 5'-GGTGTAGAGCATTACGCTGC-3'을 사용하여 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동한 후 nylon membrane (Hybond-XL, Amersham)에 transfer 시킨 다음, GUS 및 Hm 유전자를 primer로 하여 Lee 등 (2004)의 방법에 준하여 hybridization 시켰다.

III. 결과 및 고찰

1. 캘러스 type에 따른 재분화효율의 차이

종자로부터 유도된 캘러스를 증식시킨 후 배양한 결과, 증식된 캘러스로부터 3가지 type의 캘러스가 관찰되었다 (Fig. 1). Type I 캘러스는 조직이 단단하고 갈색을 띠었으며 (Fig. 1A), type II 캘러스는 유백색으로 밝은 녹색을 띠며 조직적으로 치밀한 상태이며 (Fig. 1B), type III 캘러스는 부드러우며 물기가 많은 상태의 캘러스로 각각 분류하였다 (Fig. 1C).

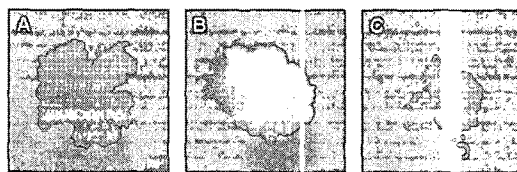


Fig. 1. Three morphological types of callus induction from mature seed culture of tall fescue A, Type I (Yellowish white and friable); B, Type II (yellow-green and compact); C, Type III (Moist and non-compact).

세 가지 type의 캘러스를 각각 재분화 배지에 치상하여 재분화 효율을 조사한 결과, 식물체 재분화 효율이 9.3~52.6%로 캘러스의 type에 따라 큰 차이를 나타내었으며, 그 중 type II 캘러스가 가장 높은 재분화 효율을 나타내었다 (Table 1). 동일한 조건의 배지에서 유도된 캘러스 배양효율의 차이는 종자에서 유래된 캘러스 자체에 여러 가지 형태의 세포가 혼재되어 있거나, 종자 자체의 활력의 차이 또는 기내배양시 변이 등에 기인한 결과로 추측된다. 이러한 유사한 결과가 옥수수 (Carvalho, 1997) 미숙배 배양과 켄터키 블루그래스 (Miki 등, 2003) 종자배양 등에서도 보고된 바 있다.

Table 1. Effect of callus type on plant regeneration from mature seed-derived callus tissues of tall fescue

Callus type	No. of calli transferred	Plant regeneration (%)
Type I	150	35.3
Type II	150	52.6
Type III	150	9.3

2. AgNO₃와 cysteine의 첨가 효과

톨 페스큐의 캘러스 배양에 있어서 AgNO₃와 cysteine의 첨가효과를 조사하기 위하여 재분화 효율이 우수했던 type II 캘러스를 이용하여 캘러스 배양효율 및 재분화효율을 조사한 결과 Table 2와 같다. AgNO₃는 캘러스 유도율에는 영향을 미치지 않았으나, 식물체 재분화율은 10 mg/L AgNO₃ 첨가구의 경우 60%로 무첨가구에 비해 6.7% 정도 증가하였다. Cysteine의 경우에도 캘러스 유도율의 증가 효과는 관찰되지 않았으나, 식물체 재분화율은 40 mg/L cysteine 첨가구의 경우 59.3%로 무첨가구에 비해 6% 정도 증가하였다. 이들을 동시에 첨가해 준 경우 무첨가구에 비해 캘러스 유도율은 6.7%, 식물체 재분화율은 12%가 각각 증가하

는 높은 배양효율을 나타내었다. AgNO₃의 경우 일반적으로 식물체 재분화 억제작용을 나타내는 ethylene의 생리활성을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Epan와 Goerge, 1997). Cysteine의 경우 캘러스 배양에 있어서 항산화물질로 작용하여 세포사멸을 방지함으로써 재분화능을 높이는 것으로 알려져 있다 (Enriquez-Obregon 등, 1999). 이러한 항산화물질의 첨가에 따른 배양효율의 증가가 조 (Vikrant와 Rashid, 2002), 옥수수 (Songstad 등, 1988) 등에서도 보고된 바 있어서 본 실험의 결과도 이들과 유사한 결과를 나타내었다.

3. 캘러스 type에 따른 형질전환효율의 차이

캘러스 type에 따른 형질전환 효율의 차이를 조사하기 위하여 *Agrobacterium*으로 감염시킨 후 캘러스의 형질전환 여부를 GUS 활성염색으로 확인한 결과 Fig. 2와 같이 나타났다.

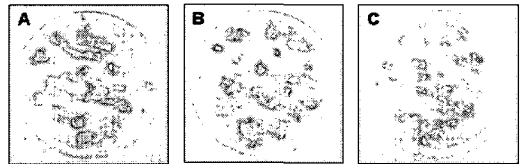


Fig. 2. Transient GUS expression in three types of calli. A, Type I callus; B, Type II callus; C, Type III callus.

Table 2. Effect of antinecrotic compounds on mature seed culture of tall fescue

Antinecrotic compounds	No. of seeds transferred	Callus induction (%)	No. of calli transferred	Plant regeneration (%)
None	150	53.3	150	53.3
AgNO ₃ 5 mg/L	150	54.6	150	56.0
AgNO ₃ 10 mg/L	150	57.3	150	60.0
Cysteine 20 mg/L	150	56.0	150	55.3
Cysteine 40 mg/L	150	58.6	150	59.3
AgNO ₃ 10 mg/L+ Cysteine 40 mg/L	150	60.0	150	65.3

캘러스의 type에 따라 GUS 활성염색되는 비율이 4~58.0%로 나타내어 감염에 이용한 캘러스의 형태에 따라 형질전환 효율에 큰 차이를 나타내었다. Type II 캘러스의 경우 재분화 효율도 우수하였지만 형질전환 효율도 58.0%로 가장 높은 것으로 나타났다(Table. 3). 따라서 톨 페스큐의 캘러스를 이용한 *Agrobacterium* 감염시에 조직적으로 우수하고 재분화 효율이 높은 type II 캘러스를 형질전환 재료로 사용하는 것이 재분화 효율을 높여줄 수 있을 뿐만 아니라 형질전환 효율을 현저히 증가시킬 수 있을 것으로 판단된다.

Table 3. Effect of callus types on GUS expression in infected calli of tall fescue

Callus type	Number of calli tested	No. of calli with GUS stain	Calli with GUS spots (%)
Type I	150	23	15.3
Type II	150	87	58.0
Type III	150	6	4.0

4. 형질전환체의 선발과 도입유전자의 확인

형질전환체의 genome내에 T-DNA 영역이 도입되었는지를 확인하기 위해 잎 조직으로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR 분석을 실시하였다. 비형질전환체에서는 증폭산물을 확인할 수 없었으나, 형질전환식물체에서는 GUS 및 Hm 유전자의 size와 동일한 448 bp와 801 bp의 증폭산물이 관찰되었으며, 이들 증폭산물들을 Southern 분석을 해 본 결과, 비형질전환 식물체에서는 GUS (Fig. 3A) 또는 Hm probe (Fig. 3B)와 결합하는 DNA 단편을 확인할 수 없었으나 (Fig. 3A, B, lane 1), 형질전환식물체에서는 PCR 산물과 동일한 크기의 hybridization band를 보여 (Fig. 3A, B, lanes 2-7) T-DNA가 형질전환 식물체의 genome내로 정상적으로 도입되었음을 확인할 수 있었다.

본 연구를 통하여 확립된 톨 페스큐의 성숙 종자로부터 유도된 type II 캘러스는 식물체 재분화 및 형질전환 효율을 높여 고품질 또는 환경스트레스에 대해 강한 내성을 가지는 신품종 형질전환 식물체 개발 등에 있어서 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

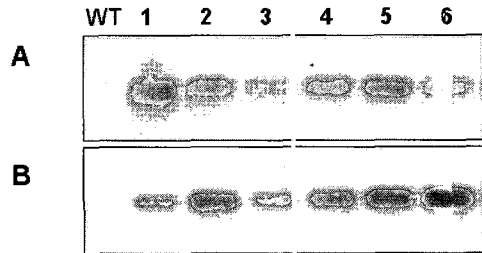


Fig. 3. Southern blot hybridization of PCR-amplified DNA from hygromycin-resistant tall fescue. A, GUS probe; B, Hm probe. PCR products were hybridized with GUS and Hm genes as probe. Lane 1, wild type, lane 2-7, transgenic plant.

IV. 요약

유용유전자 도입을 통한 신품종 톨 페스큐를 개발할 목적으로 *Agrobacterium*을 이용한 효율적인 식물체 재분화 및 형질전환에 미치는 몇 가지 요인을 조사하였다. 성숙종자로부터 유도된 캘러스를 형태에 따라 3가지 type으로 분류하였고 type II 캘러스는 유백색으로 녹색을 띠며 조직적으로 치밀한 상태이며 식물체로의 재분화효율이 52.6%로 가장 높게 나타났다. 또한 재분화 배지에 AgNO₃와 cysteine을 동시에 첨가해 준 경우 무첨가구에 비해 캘러스 유도율은 6.7%, 식물체 재분화율은 12% 씩 각각 증가하였다. 캘러스 type 별 형질전환 효율을 조사한 결과 type II 캘러스는 58.0%로 가장 높은 형질전환효율을 나타내었다. 형질전환체를 PCR 및 PCR-Southern blot 분석을 실시하여 본 결과 발현벡터의 T-DNA 영역이 형질전환 식물체의 genome에 성공적으로 도입되었음을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통하여 확립된 효율적인 형

질전환 시스템은 분자육종을 통한 신품종 톨페스큐의 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

V. 사 사

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

VI. 인용 문헌

- Bettany, A.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.
- Buckner, R.C., J.B. Powell and R.V. Frakes. 1979. Historical development. In: Buckner RC, Bush LP(eds) Tall Fescue. Agronomy 20:1-8.
- Carvalho, C.H.S., N. Bohorova, P.N. Bordallo, L.L. Abreu, F. H. Valicente, W. Bressan and E. Paiva. 1997. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes, Plant Cell Rep. 17:73-76.
- Cho, M.J., C.D. Ha and P.G. Lemaux. 1999. Production of transgenic tall fescue and red fescue plants by particle bombardment of highly regenerated tissues, Plant Cell Rep. 19:1084-1089.
- 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 Sinic. 18:659-668.
- Eapan, S. and L. George. 1997. Plant regeneration from peduncle segments of oil seed Brassica-species: Influence of silver nitrate and silver thio sulfate. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 51:229-232.
- Enriquez-Obregon, G.A., D.L. Prieto-Samsonov, de la Riva, G.A. and R.I. Vanquez-Padron. 1999. *Agrobacterium*-mediated Japonica rice transformation: a procedure assisted by an antinecrotic treatment. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 59:159-168.
- Fieser, B.G. and E.S. Vanzant. 2004. Interactions between supplement energy source and tall fescue hay maturity on forage utilization by beef steers. J. Animal Sci. 82:307-318.
- Ha, S.B, F.S. Wu and T.K. Thorne. 1992. Transgenic turf-type tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb) plants regenerated from protoplasts, Plant Cell Rep. 11:601-604.
- 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.
- Jefferson, R. A. 1987. Assay chimeric genes in plant: the GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-405.
- Lee, S.H, D.G. Lee, H.S. Woo and B.H. Lee. 2004. Development of transgenic tall fescue plants from mature seed-derived callus via *Agrobacterium*-mediated transformation, Asian-Aust. J. Anim. Sci. 17:1390-1394.
- Miki, K., T. Koichi, C.H. Bae and H.Y. Lee. 2003. Plant regeneration and transformation of kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) via the plant tissue culture. Korea J. plant biotech. 30:115-121.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revise medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497.
- Murray, M.G. and P.F. Tompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Res. 8:4321-4325.
- Songstad, D., D. Duncan and I. Witholm. 1988. Effect of 1-aminocyclopropane- 1-carboxylic acid, silver nitrate and norbornadiene on plant regeneration from maize callus cultures. Plant Cell Rep. 7:262-265.
- Spangenberg, G., Z.Y. Wang and I. Potrykus. 1998. Biotechnology in forage and turf grass improvement. In: Frankel et al(Eds), Monographs on theoretical and applied genetics, Vol. 23, Springer Verlag, Heidelberg, p. 192-211.
- Van Wijk, A.J.P., J.G. Boonman, and W. Rumball. 1993. Achievements and prospectives in the breeding of forage grasses and legumes. In: Baker, M. J. (Eds), Grasslands for our world, SIR, Wellington, p. 116-120.
- Vikrant and A. Rashid. 2002. Somatic embryogenesis from immature and mature embryos of a minor millet *Paspalum scrobiculatum* L. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 69:71-77.