

Agrobacterium 매개에 의한 페레니얼 라이그라스의 형질전환에 영향을 미치는 요인

이기원*,** · 김기용* · 이종경* · 박형수* · 김경희** · 이병현** · 이상훈*

Factors Influencing *Agrobacterium*-Mediated Transformation Efficiency in Perennial Ryegrass

Ki-Won Lee*,**, Ki-Yong Kim*, Joung Kyong Lee*, Hyung Soo Park*, Kyung-Hee Kim**,
Byung-Hyun Lee** and Sang-Hoon Lee*

ABSTRACT

A system for the production of transgenic plants has been developed for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) via *Agrobacterium*-mediated transformation. Included in this study were two factors which may affect the gene transfer efficiency: concentrations of acetosyringone (AS, 0 to 300 μ M), and co-culture period (1 to 7 days). Both factors were very important to achieve high efficiency gene transformation in the perennial ryegrass. The highest transformation efficiency was obtained when embryogenic calli were inoculated with *Agrobacterium* in the presence of 100 μ M AS with the culture medium for 5 days. Phosphinothricin resistant calli were developed with into complete plants. GUS histochemical assay, polymerase chain reaction (PCR) and Northern blot analysis of transgenic plants demonstrated that transgenes were integrated into the genome of perennial ryegrass. Using this protocol, it was possible to obtain transformants efficiently for further study.

(**Key words** : *Agrobacterium*, Acetosyringone, GUS, Perennial ryegrass, Transformation)

I. 서 론

페레니얼 라이그라스는 전세계의 온대지방에 널리 분포되어 목초 및 잔다용용으로 재배되고 있는 다년생 화본과 목초이다 (Altpeter 등, 2000). 페레니얼 라이그라스는 온난한 겨울의 기후를 좋아하고, 여름의 고온, 건조에 약하지만 내한성은 다른 라이그라스보다 강하다. 또한, 방목지용, 생초용, 건초용으로서 적합하고 가축의 기호성이 우수하여 널리 보급되고 있다.

최근 들어 조사료의 중요성과 초지의 공익적인 기능이 강조됨에 따라 페레니얼 라이그라스의 요구가 증대되고 있다. 현재 우리나라에서 이용되고 있는 페레니얼 라이그라스는 도입품종으로 여름철 고온다습한 조건하에서는 생육이 불량하며 병해가 발생되어 고사되기 쉽다. 따라서 국내 기후조건에 적합한 내재해성 품종 개발이 필요하다. 내재해성 작물 개발 연구는 우리나라와 같이 농지면적이 협소하여 식량자급률이 낮은 지역에서는 한계농지에서 작물재

* 농촌진흥청 국립축산과학원 (National Institute of Animal Science, RDA)

** 경상대학교 응용생명과학부 (Division of Applied Life Science (BK21 program), Gyeongsang National University)

Corresponding author : Sang-Hoon Lee, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 330-801, Korea. Tel: +82-41-580-6754, Fax: +82-41-580-6779, E-mail: sanghoon@korea.kr

배지로 확대 할 수 있는 유일한 돌파구라고 생각되어 그 중요성이 더욱 크다. 최근 활발하게 진행되고 있는 분자유종 기술은 전통육종기술의 약점을 보완 할 수 있는 대안으로 대두되고 있다(Altpeper 등, 2000b).

또한 세계 각국은 기술투자를 강화하고 원천 기술을 특허화하는 등 농업에서 세계경쟁력을 확보해 나가고 있는 추세이다.

목초 분자유종 기술의 발달은 기존의 관행육종법으로 기대하기 어려운 제초제 저항성, 해충 저항성, 특수성분강화(Ye 등, 2001) 등의 신품종 개발을 가능하게 했다. 또한 최근에는 유용이차대사 산물을 생산하는 고부가가치 신 기능성 작물의 창출로 식품의약품, 및 백신 개발에도 도입이 되고 있다. 따라서 사료작물의 유용유전자를 육종소재로 이용하여 기존의 전통적인 육종방법과 병행연구를 수행하면 사료작물의 신품종 개발연한을 앞당길 수 있을 것이다.

II. 재료 및 방법

1. 종자살균 및 캘러스 유도

형질전환을 위한 식물재료로는 페레니얼 라이그라스의 'Accent' 품종을 사용하였다. 성숙 종자의 종피를 제거하기 위해 50% sulfuric acid (H₂SO₄)에서 30분간 처리한 다음 70% ethanol에 5분간 살균한 후, 10% (v/v) sodium hypochlorite 용액에서 30분간 교반하면서 표면 살균 하였다. 살균한 종자를 MS (Murashige와 Skoog, 1962) 배지를 기본으로 하는 캘러스 유도배지 (MS medium, 9 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BA, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 3 g/L gelrite)에 치상하여 8주간 배양하여, 형성된 배발생 캘러스를 *Agrobacterium* 감염에 이용하였다.

2. *Agrobacterium* 배양 및 감염

형질전환을 위한 발현벡터는 pCAMBIA3301

벡터 (Fig. 1)를 *Agrobacterium* strain EHA105에 형질전환한 후, 단일 colony를 선발하여 100 mg/L kanamycin이 첨가된 YEP 액체배지에 접종하여 pre-culture 한 후, 다시 50 ml/L YEP 액체배지에서 28℃에서 2일 배양하여 3,600 rpm에서 10분간 원심분리하여 *Agrobacterium*을 회수한 후 O.D600 값이 0.8-1.0 정도의 농도가 되도록 현탁한 다음 캘러스의 감염에 이용하였다. 성숙종자로부터 유도된 캘러스를 *Agrobacterium*을 현탁시킨 접종배지에 1시간 침지시켜 감염시킨 다음 여분의 *Agrobacterium*을 멸균된 filter paper 위에서 제거하였다. 감염시킨 캘러스를 공동배양배지 (MS medium, 2 mg/L 2,4-D, 100 μM AS, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L gelrite)에 계대한 후 25℃에서 5일간 암상태로 공동배양 하였다.



Fig. 1. Linear map of the T-DNA of the pCAMBIA3301 construct for perennial ryegrass transformation. 35S, Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter; T35S, CaMV35S terminator; TNOS, Nopaline synthase terminator; bar, bialaphos resistance gene; Intron-GUS, β-glucuronidase.

3. 형질전환체의 선발과 식물체 재분화

공동배양이 끝난 캘러스는 선발배지는 N6 (Chu 등, 1975) 배지를 기본으로 하는 선발배지 (N6 medium, 250 mg/L cefotaxime, 5 mg/L phosphinothricin (PPT), 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L gelrite)에서 3주간 배양하여 PPT 내성을 보이는 캘러스만을 선발하여 다시 10 mg/L PPT가 첨가된 선발배지에 옮겨 4주간 배양하여 살아남은 식물체는 10 mg/L PPT가 첨가된 Rooting 배지 (1/2 MS medium,

30 g/L sucrose, 2 g/L gelrite)에 옮겨준 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. 캘러스에 있어서 GUS 발현조사는 5일간 공동 배양한 캘러스를 이용하였으며, 재분화된 형질전환 식물체의 잎을 이용한 GUS 활성염색은 선발배지에서 재분화된 식물체의 잎 조직을 재료로 하여 GUS 활성염색을 실시한 후 형질전환 여부를 판단하였다.

5. 도입유전자의 확인 및 발현

온실에서 재배한 형질전환 식물체로부터 genomic DNA를 분리한 후, Lee 등 (2006)의 방법에 준하여 PCR 분석을 실시 하였다. pCAMBIA 3301 벡터의 GUS 유전자를 sense primer 5'-AATTGA TCAGCGTTGGTGG-3'와 anti-sense primer 5'-GGTGTAGAGCATTACGCTGC-3'을 사용하여 증폭시킨 후 1% agarose gel 전기영동으로 유전자의 도입여부를 확인하였다. 또한, PCR로 확인 된 형질전환체의 유전자 발현 양상을 확인하기 위하여 형질전환 페레니얼 라이그라스 식물체의 잎으로부터 total RNA를 분리한 후 Lee 등 (2007)의 방법에 준하여 Northern blot 분석을 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Acetosyringone 농도별에 따른 형질전환 효율의 차이

*Agrobacterium*을 이용한 페레니얼 라이그라스를 형질전환 함에 있어 최적 조건을 조사하기 위하여 *Agrobacterium*의 감염효율에 가장 큰 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있는 acetosyringone (AS)의 첨가에 따른 효과를 조사하였다.

페레니얼 라이그라스의 'Accent' 품종에 AS를 *Agrobacterium* 현탁배지와 공동배양배지에 동시에 첨가해 주었을 때의 GUS 활성염색이 되는 캘러스의 비율로 조사한 결과 Table 1과 같았다.

AS 100 μ M 첨가구에서 감염시킨 전체 캘러스 중에서 GUS 활성염색이 되는 캘러스가 33.3%로 가장 높은 형질전환 효율을 확인할 수 있었다. 이보다 높은 200 및 300 μ M AS 첨가구에서는 무첨가구에 비해 높은 형질전환 효율을 보였으나 100 μ M 이상의 농도에서는 AS 첨가농도가 증가될수록 형질전환 효율이 감소하는 경향을 보였다.

AS는 *Agrobacterium*이 식물세포의 감염과 관련된 *vir* 유전자를 활성화시키는 페놀성 화합물로 (Usami 등, 1987), 대부분의 화본과 식물조직에서는 이 물질이 합성되지 않아서 *Agrobacterium*에 의한 형질전환의 장애요인으로 작용해 왔다. 따라서 최적의 AS 첨가 농도 조사는 화본과

Table 1. Effect of acetosyringone concentration on transient GUS expression in seed-derived calli of perennial ryegrass

Acetosyringone (μ M)	No. of calli infected	No. of calli with GUS stain*	Proportion of calli with GUS stain (%)
0	44	8	18.2
100	60	20	33.3
200	60	19	27.9
300	60	13	21.6

* Histochemical GUS activity in scutellum-derived embryogenic callus 5 days after co-cultivation.

식물의 형질전환을 위한 중요한 요인이다.

이와 같이 화분과 식물의 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 있어서 AS를 첨가함으로써 형질전환효율을 증가시킨 예는 톨 페스큐(Lee 등, 2004)와 오차드그라스(Lee 등, 2006) 등과 같은 화분과 작물에서도 보고된 바 있다.

2. 공동배양 기간에 따른 형질전환 효율의 차이

페레니얼 라이그라스의 종자유래 캘러스에 *Agrobacterium*을 접종한 후 공동배양 기간에 따른 형질전환 효율의 차이를 조사한 결과는 Table 2와 같다. *Agrobacterium*으로 감염시킨 다음 1일간 공동배양한 후 캘러스의 GUS 염색 정도로 관찰한 형질전환효율은 18.3%였으며, 3일간 공동배양한 경우 31.7%의 효율을, 5일간 공동배양 했을 때는 41.7%로 가장 높은 형질전환 효율을 나타내었다. 그러나 7일간 공동배양한 경우는 20%의 효율을 나타내었다. 즉, 공동배양 기간이 5일째 까지는 기간이 길어질수록 형질전환 효율이 증가하였으나, 그 이상의 기간에서는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. 공동배양기간이 7일 이상인 경우에는 캘러스의 갈변현상이 심하여 괴사되는 세포의 비율이 높았으며 이로 인하여 GUS 활성염색정도가 저하된 것으로 사료되었다.

이와 같이 공동배양기간이 4~5일까지 증가 시킬수록 형질전환 효율이 증가된다는 예가 톨 페스큐(Kim 등, 2004), 콩(Santarem 등, 1998) 등에서도 보고된 바 있다.

3. 형질전환체의 확인

페레니얼 라이그라스 성숙종자로부터 유래된 캘러스(Fig. 2A)를 *Agrobacterium*으로 감염시켜 공동배양한 후 형질전환 여부를 GUS (β -glucuronidase) 활성염색으로 확인한 결과 형질전환된 캘러스는 푸른색으로 염색되었다(Fig. 2B). 또한 10 mg/L의 PPT가 첨가된 선발배지에서 선발되어 재분화된 형질전환 식물체를 GUS

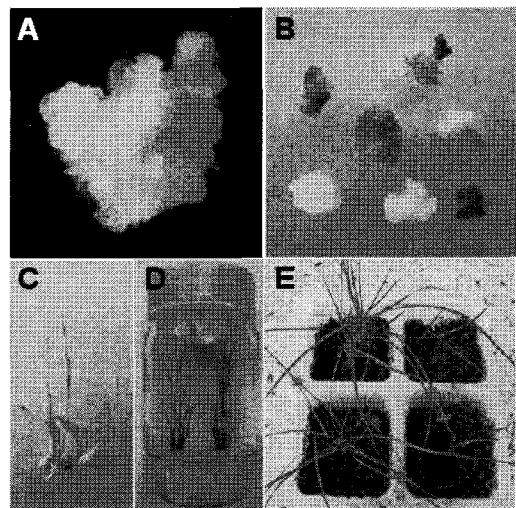


Fig. 2. Transformation of perennial ryegrass by *Agrobacterium tumefaciens*. A. Embryonic callus induced from mature seed culture; B. Transient GUS expression in perennial ryegrass callus after 5 days of co-cultivation with *Agrobacterium*; C. Regeneration of plants stably expressing GUS after 4 weeks of selection; D. Rooting of regenerated plants; E. Transgenic plants growing in the greenhouse.

Table 2. Effect of co-culture period on GUS expression in seed-derived callus of perennial ryegrass

Co-culture (days)	No. of calli infected	No. of calli with GUS stain	Proportion of calli with GUS stain (%)*
1	60	11	18.3
3	60	19	31.7
5	60	25	41.7
7	60	12	20.0

유전자의 발현 여부를 활성염색으로 조사하여 본 결과 식물체의 거의 모든 조직부위에서 청색으로 염색되어 *Agrobacterium*법에 의해 성공적으로 형질전환 되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2C, D). 이렇게 PPT 내성을 가지는 식물체는 pot로 이식하여 온실에서 재배하였다(Fig. 2E).

4. 형질전환체의 도입유전자 확인 및 발현

형질전환 식물체의 genome내에 삽입된 pCAMBIA3301 발현벡터가 가지는 GUS 유전자가 도입되었는지를 확인하기 위해 PPT가 첨가된 배지에서 선발된 형질전환 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR 분석을 실시하였다. 그 결과 비형질전환 식물체에서는 증폭된 단편을 확인할 수 없었으나 형질전환식물체에서는 약 0.4 kb의 PCR 증폭산물이 관찰되었다(Fig. 3).

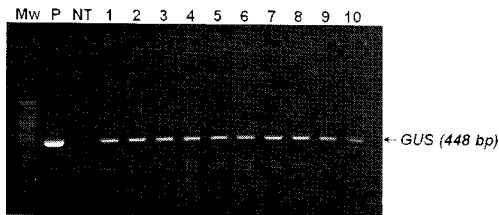


Fig. 3. PCR analysis of transgenic and wild-type perennial ryegrass. The expected fragment was 448 bp in size. Mw: 1 kb molecular markers; P: pCAMBIA 3301 vector DNA as positive; NT; DNA from wild-type; 1-10: DNA from independent transgenic lines 1-10.

또한, Northern 분석을 통해 도입유전자의 발현을 조사한 결과 (Fig. 4) 비형질전환 식물체에서는 도입 유전자의 발현을 확인할 수 없었으나, 형질전환 식물체에서는 개체간 발현양의 차이는 있으나 도입한 GUS 유전자가 안정적으로 발현되고 있음을 관찰하였다.

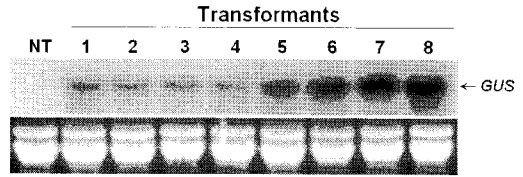


Fig. 4. Northern analysis of transgenic and non-transgenic perennial ryegrass. NT: RNA from wild-type; 1-8: independent transgenic lines 1-8.

IV. 요약

신품종 페레니얼 라이그라스를 개발할 목적으로 *Agrobacterium*을 이용한 효율적인 형질전환 체계를 확립하였다. 페레니얼 라이그라스 성숙종자 유래의 캘러스를 pCAMBIA 3301을 가지는 *Agrobacterium* EHA105를 이용하여 감염시킨 후 형질전환을 실시하였다. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 있어서 중요한 인자로 작용하는 몇 가지 요인에 대한 형질전환 효율을 GUS 유전자의 발현정도로 조사하였다. *Agrobacterium* 감염시에 현탁배지와 공동배양 배지에 100 μM의 acetosyringone (AS)을 첨가해 주었을 때 형질전환 효율이 증가되었으며, 공동배양기간을 5일까지 증가시켰을 때 형질전환 효율이 증가되었다. 10 mg/L의 phosphinothricin (PPT)이 첨가된 선발배지에서 살아남은 캘러스로부터 정상적인 식물체가 재분화 되었으며 이들 형질전환체를 GUS 염색과 PCR 분석을 실시하여 본 결과 발현벡터의 GUS 유전자가 형질전환 식물체의 genome에 성공적으로 도입되었음을 확인할 수 있었다. 또한 RNA 수준에서 도입 유전자의 발현을 확인한 결과 도입 유전자가 안정적으로 발현하는 것을 확인하였다.

V. 인용 문헌

1. Altpeter, F., J.P. Xu and S. Ahmed. 2000a. Generation of large number of independently

- transformed fertile perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) plants of forage and turf-type cultivars. *Mol. Breed.* 6:519-528.
2. Altpeter, F. and J. Xu. 2000b. Rapid production of transgenic turfgrass (*Festuca rubra* L.) plants. *Plant Physiol.* 157:441-448.
 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 Sinic.* 18:659-666.
 4. Jefferson, R.A. 1987. Assay chimeric genes in plant: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405.
 5. Kim J.-S., S.-H. Lee and B.-H. Lee. 2004. Several factors affecting transformation efficiency of tall fescue. *Korean J. Crop Sci.* 49(3):237-242.
 6. Lee, S.-H., D.-G. Lee, H.-S. Woo, K.-W. Lee, D.-H. Kim, S.S. Kwak, J.-S. Kim, H.G. Kim, N. 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 Sci.* 171:408-414.
 7. Lee, S.-H., N. Ahsan, K.-W. Lee, D.-H. Kim, D.-G. Lee, S.S. Kwak, S.-Y. Kwon, T.-H. Kim and B.-H. Lee. 2007. Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *J. Plant Physiol.* 164:1626-1638.
 8. 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.
 9. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revise medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15:473-497.
 10. Santarem, E.R., H.N. Trick and J.J. Finer. 1998. Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Rep.* 17:752-759.
 11. 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.
 12. Ye, X.D., X.L. Wu, H. Zhao, M. Frehner, J. Nösberger, I. Potrykus and G. Spangenberg. 2001. Altered fructan accumulation in transgenic *Lolium multiflorum* plants expressing a *Bacillus subtilis sacB* gene. *Plant Cell Rep.* 20:205-212.
- (접수일: 2009년 9월 2일, 수정일 1차: 2009년 9월 14일, 수정일 2차: 2009년 9월 18일, 게재확정일: 2009년 9월 21일)