韓草誌(J. Korean Grassl. Sci.) 21(3) : 145~150, 2001

BcHSP17.6 유전자 도입에 의한 버즈풋 트레포일의 형질전환

김기용 · 성병렬 · 임용우 · 최기준 · 임영철 · 장요순 · 정의수 · 김원호 · 김종근

Transformation of Birdsfoot trefoil 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, E. S. Chung, W. H. Kim and J. G. Kim

Abstract

This study was conducted to obtain the transformed birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) plants with *BcHSP17.6* gene using *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and we confirmed transformed gene from the regenerated birdsfoot trefoil plants. The expression vector, pBKH4 vector, harboring *BcHSP17.6* gene was used for production of transgenic birdsfoot trefoil plants. The callus of birdsfoot trefoil was cocultivated with *Agrobacterium tumefaciens* and transformed calli were selected on kanamycin-containing SH-kc medium to regenerate into plants.

The transformed birdsfoot trefoil plants were produced 4 momths after cultivation on BOi2Y medium. The transgenic birdsfoot trefoil plants were analyzed by isolation of genomic DNA and genomic Southern hybridization using α-^{32}P labelled *BcHSP17.6* fragments.

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

Ⅰ. 서 론

버즈풋 트레포일(*Lotus corniculatus* L.)은 우리나라에서 벌노랑이로 알려져 있는 목초로서 내서성과 내한성이 아주 강하고, 비가 많은 다습한 지역에서도 잘 적응한다. 국내에서는 많이 재배하지 않는 목초이지만 배수가 불량한 토양, 건조하고 메마른 땅 또는 산성에서 약알칼리성에 이르는 대부분의 토양에까지 적응하는 능력이 다른 어떤 클로버 종류보다 크기 때문에, 재배 및 이용면에서 좀 더 연구가 이루어진다면 중요한 두과목초로서 충분한 가치가 있을 것으로 판단된다.

지금까지 세계적으로 버즈풋 트레포일의 육종연구는 다른 목초나 사료작물에 비해 대단히 미미한 정도이며, 더욱이 외래의 유용유전자를 도입하여 형질전환을 시도한 연구는 Robbins 등 (1998)이 dihydroflavonol reductase의 역서열(antisense sequences)을 도입해 본 것이 전부이다. 형질전환 식물체를 얻기 위해서는 무엇보다도 식물체 재분화기술이 확립되어야 하는데, 버즈풋 트레포일의 경우 Kim 등 (1999b)이 BOi2Y 배지에서 재분화를 성공한 보고가 있으며, 그 외 콩과식물의 재분화에 관한 연구로는 *Arachis, Glycine, Mellilotus, Vicia* (Phillips 및 Collins, 1980), *Trifolium* (Canpbell 및 Tomas, 1984), *Cajanus* (Kumar 등, 1983), *Caronilla* (Mariotti 및 Arcioni, 1983), *Phaseolus, Stylasanthes*

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

(Meijer, 1982), *Lotus* (Keyes 등, 1980), 그리고 *Medicago* spp. (Kim 등, 1999a; Son 등, 2001) 등에 대한 보고가 있다.

본 연구에서는 버즈풋 트레포일에 외래의 유용 유전자를 도입하여 새로운 형질전환체를 얻는 기술을 확립하기 위해, 버즈풋 트레포일 종자로부터 캘러스를 유도하고, Kim과 Jo(1997)가 분리한 *BcHSP 17.6* 유전자로 버즈풋 트레포일 캘러스를 형질전환시켜 항생제를 첨가한 배지에서 형질전환된 캘러스를 선발, 이들을 재분화배지에서 완전한 식물체로 재분화한 후, *BcHSP17.6* 유전자 단편에 방사능을 표지하여 준비한 probe를 이용, Southern blot 분석을 통해 버즈풋 트레포일의 형질전환 여부를 확인하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 사용배지

버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.) 종자로부터 캘러스 유도 조건 및 식물체 재분화 조건을 확립하기 위한 식물재료로서 Empire 품종을 공시하였다. 버즈풋 트레포일 캘러스를 얻기 위해 Empire 품종의 종자를 70% 에탄올에서 1분, 0.1% SDS/ $HgCl_2$ 용액에서 15분, 1% NaOCl 용액에서 5분간 소독한 다음, 멸균수로 2회 씻어내었다.

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

2. 캘러스 유도 및 발현벡터 준비

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, 1999b), 본 실험에 사용된 모든 조직배양용 배지는 pH 5.8, 0.8% agar 농도로 조절하였고, 유도된 캘러스는 20일 간격으로 계대배양하면서 대량으로 증식하였다.

버즈풋 트레포일의 형질전환을 위해, *BcHSP17.6* 유전자를 가지는 pBKH4를 사용하였다. pBKH4는 양 말단이 *Bam*H Ⅰ을 갖도록 한 *BcHSP17.6* 유전자 단편을 pBKS1-1 벡터 (Kim 등, 1993)의 *Bam*H Ⅰ 제한효소 부위에 subcloning하여 제작한 벡터로서, kanamycin 내성 유전자인 NPT-Ⅱ, 내열성 유전자인 *BcHSP17.6*, 그리고 항상적 발현을 유도하는 35S promoter를 가지고 있다 (Fig. 1).

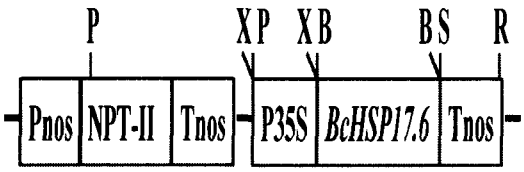

Fig. 1. Restriction map of expression vector pBKH4. P35S, 35S promoter of CaMV; Tnos, Terminator of nopaline synthase; Pnos, Promoter of nopaline synthase; NPTⅡ, Neomycin phosphotransferase TypeⅡ; *BcHSP 17.6*, thermotolerance gene; B, *Bam*H Ⅰ; P, *Pst* Ⅰ; S, *Sal* Ⅰ; R, *Eco*R Ⅰ; X, *Xba* Ⅰ.

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

Used media	Composition of each medium
SH	SH medium (Schenk & Hildebrandt, 1972)
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 (50mg/ℓ) and cefotaxim (500mg/ℓ)
BOi2Y	BOi2Y medium (Bingham *et al.*, 1975)

3. 형질전환 버즈풋 트레포일 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 버즈풋 트레포일 캘러스를 3~10분간 담구었다가 멸균수로 2회 세척한 다음, 항생제가 첨가되지 않은 SH agar plate에서 2일간 co-culture 하므로서 감염을 유도하였다.

형질전환된 캘러스를 선발하기 위해, 100㎍/㎖의 kanamycin과 500㎍/㎖의 cefotaxim을 첨가한 SH-kc 배지에서 감염된 캘러스를 배양하였으며, 20일 간격으로 새로운 배지에 옮겨 주면서 2개월간 배양한 다음, 이들 배지에서 살아남는 캘러스를 형질전환 캘러스로 선발하였다. 형질전환 캘러스는 Kim 등 (1999b)의 방법으로 BOi2Y 배지에서 20일 간격으로 지속적으로 계대배양하여 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. 버즈풋 트레포일 캘러스 유도 및 pBKH4의 확인

2,4-D를 3 mg/ℓ 첨가한 SH-3 배지에 소독한 버즈풋 트레포일 종자 (Empire 품종)를 치상하여 배양했을 때, 약 20일 지난후에 캘러스가 유도되었으며, 캘러스를 동일배지에서 20일 간격으로 2~3회 계대배양하여 증식시켜 *Agrobacterium*으로 감염시킬 재료로 사용하였다. 캘러스유도 조건은 Kim 등 (1999b)이 보고한대로 배지조건을 맞추어 줌으로써 쉽게 많은 양의 캘러스를 유도할 수 있었다.

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

전기영동으로 확인한 pBKH4는 Holster 등 (1978)의 방법으로 *Agrobacterium*에 도입하였으며, plasmid DNA를 분리하여 전기영동으로 확인한 결과, *Bam*H I 제한효소로 절단하였을 때 0.73kb의 *BcHSP 17.6* 단편의 band가 관찰되었다 (Fig. 2의 Lane 2와 Lane 3).

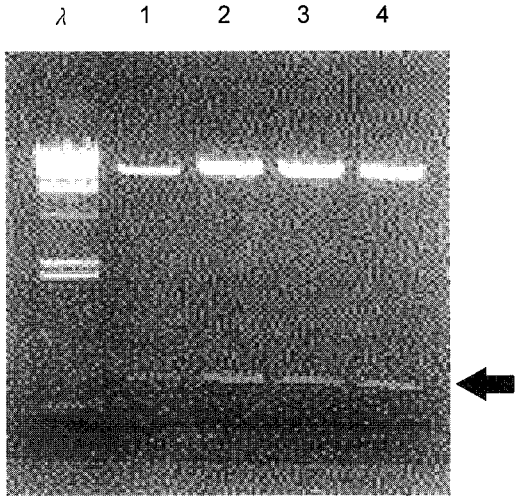

Fig. 2. Restriction pattern of pBKH4. λ, *Hind*Ⅲ digested λ DNA Marker; Lane 1 and Lane 4, *Bam*H I digested pBKH4 isolated from *E. coli*; Lane 2 and Lane 3, *Bam*H I digested pBKH4 isolated from *Agrobacterium tumefacience* LBA4404; ←, The errow indicated 0.73kb of *BcHSP 17.6* fragment.

2. 형질전환 캘러스의 선발 및 버즈풋 트레포일 재분화

BcHSP17.6 유전자가 도입된 *Agrobacterium*을 배양하여 준비한 *Agrobacterium* 현탁액에 담구어 감염시킨 캘러스를 100㎍/㎖의 kanamycin과 500㎍/㎖의 cefotaxim을 첨가한 SH-3-kc 배지에 치상하여 2개월 동안 약 20일 간격으로 계대배양하였을 때, 항생제 첨가 배지에서 살아남는 형질전환 캘러스를 선발할 수 있었다 (Fig. 3A). 이에 반해 *Agrobacterium* 현탁액으로 감염시키지 않은 캘러스의

생존은 관찰할 수 없었다. 따라서 SH-3-kc 배지에서 선발한 캘러스는 pBKH4 plasmid로 형질전환된 것으로 예상되었고, 선발한 캘러스를 SH-3-c 배지에 옮기고 약 20일 간격으로 계대배양하며 충분히 증식시켰다.

항생제 첨가배지에서 선발한 캘러스로부터 버즈풋 트레포일 식물체를 재분화하기 위해, 광조건하에서 BOi2Y 배지에서 2개월 이상 배양하여 재분화를 완성하였다. Fig. 3은 캘러스 선발부터 재분화까지의 과정을 나타내는 것으로서, 100㎍/㎖의 kanamycin과 500㎍/㎖의 cefotaxim을 첨가한 SH-3-kc 배지에서 캘러스의 생존 (A), shoot의 형성 (B), 뿌리의 유도 (C), 그리고 정상적인 성체식물 (D)을 보여 준다.

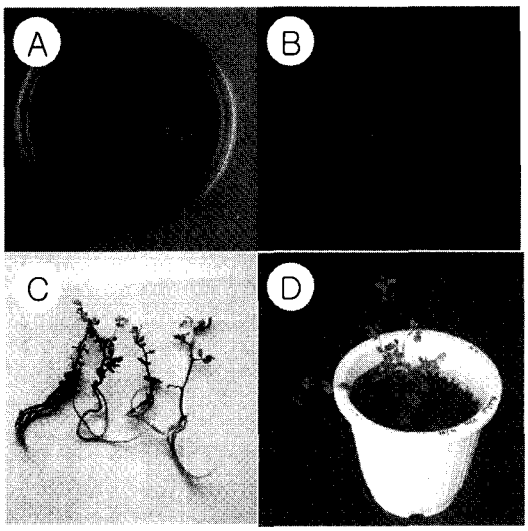

Fig. 3. Selection of transformed callus and plant regeneration of Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L. cv. Empire). A, Selected Birdsfoot trefoil callus in antibiotic addited medium; B, Stage of shoot formation; C, Stage of root formation; D, Regenerated Birdsfoot trefoil plant.

3. 형질전환 확인

버즈풋 트레포일의 형질전환 여부는 재분화된 버즈풋 트레포일의 잎조직에서 genomic DNA를 분리하여 PCR 분석 및 Southern blot 분석을 실시하므로서 확인하였다. Genomic DNA는 형질전환 버즈풋 트레포일로부터 추출하였으며, 추출한 genomic DNA를 *Bam*H I 제한효소를 이용하여 완전히 절단 후 전기영동을 실시한 다음, membrane에 transfer하여 Southern blot 분석을 실시하였다. α-^{32}P 방사능으로 표지한 *BcHSP17.6* cDNA 단편을 probe로 해서 분석한 결과, 형질전환 버즈풋 트레포일 모두에서 약 0.7kb 위치에 band가 나타난 것으로 보아서 PCR 분석에서 확인된 band는 *BcHSP17.6* 유전자 단편이 확실하며, 재분화된 버즈풋 트레포일는 *BcHSP17.6* 유전자로 형질전환되었음이 확인되었다. (Fig. 4).

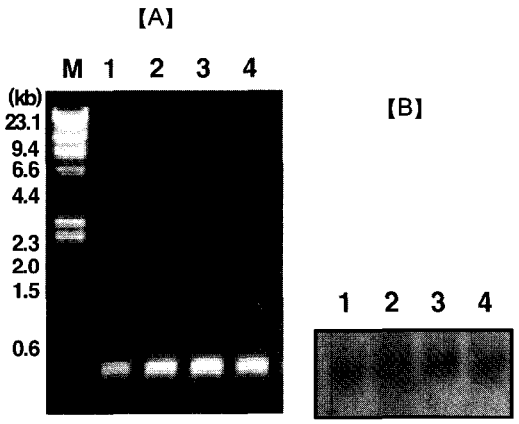

Fig. 4. PCR (left) and Southern blot analysis (right) of transgenic Birdsfoot trefoil plants. Lane 1~4, *Bam*H I digested genomic DNA from transgenic Birdsfoot trefoil plants (Empire).

따라서 본실험에서 *BcHSP17.6* 유전자의 도입에 의해 형질전환된 버즈풋 트레포일는 35S promoter에 의해 식물체내에서 항상적으로 발현하므로, 형질전환되지 않은 버즈풋 트레포일에 비해 하고에 견디는 힘이 더 강할 것으로 예상된다. *BcHSP17.6*의 발현으로 생산되는 단백질이 E. coli (Kim 등, 1998) 및 모델식물로서 담배 (Kim 등, 1997)의 내열성을 향상시킨다는 것은 이미 보고되었다. 우리는 이후의 연구에서 형질전환 버즈풋 트레포일의

내하고성을 조사하고, 이들이 내하고성이 강한 우량품종으로 육성할 가치가 있는지를 확인하는 실험을 계속적으로 수행할 계획이며, 재생관련 유전자를 비롯하여 다른 유용유전자가 확보 되는대로 버즈풋 트레포일에 도입함으로써, 형질전환 우량 목초를 개발하고자 한다.

Ⅳ. 적 요

내열성 유전자인 *BcHSP17.6*를 갖도록 제작한 발현벡터 pBKH4를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404에 도입후, *Agrobacterium*과 버즈풋 트레포일 캘러스의 공배양을 통해 감염시킨 캘러스를 100㎍/㎖의 kanamycin과 500㎍/㎖의 cefotaxim을 첨가한 SH-3-kc 배지에서 배양하며 형질전환된 캘러스를 선발하였다. 식물체 재분화는 BOi2Y 배지에서 2개월 이상 배양하며 재분화를 완성하였으며, 재분화된 버즈풋 트레포일의 genomic DNA를 분리한 후, PCR 분석 및 Southern blot 분석을 실시하여 버즈풋 트레포일의 형질전환을 확인하였다.

Ⅴ. 인 용 문 헌

1. Canpbell, C.T. and D.T. Tomas. 1984. Establishment and multiplication of red clover plants by in vitro shoot tip culture. Plant Cell Tissue Organ Culture 3:49-57.
2. 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.
3. Keyes, G.J., G.B. Collins and N.L. Taylor. 1980. Genetic variation in tissue culture of red clover. Theor Appl. Genet. 58:265-271.
4. Kim, K.Y. and J. Jo. 1997. *BcHSP17.6* (Thermotolerance Gene). GenBank Accession Number AF022217.
5. 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.
6. Kim, K.Y., J.S. Shin, Y.W. Rim, K.J. Choi, Y.S. Jang, W.H. Kim, B.H. Lee and J. Jo. 1999a. Callus formation from alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed and plant regeneration from alfalfa calli. J. Korean Grassl. Sci. 19(1):23-30.
7. 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.
8. Kim, K.Y., Y.S. Jang, B.H. Lee and J. Jo. 1998. Expression and Accumulation of LMW HSPs Under Various Heat Shock Conditions. J. Korean Grassl. Sci. 18(4): 303-310.
9. Kim, K.Y., Y.W. Rim, K.J. Choi and B.R. Sung. 1999b. Callus Induction from Seeds of Birdsfoot trefoil and Plant Regeneration on BOi2Y Medium. J. Korean Grassl. Sci. 19(4): 303-308.
10. Kumar, A.S., T.P. Reddy and G.M. Reddy. 1983. Plantlet regeneration from different callus cultures of pigeon pea. Plant Sci. Lett. 32: 271-278.
11. Mariotti, D. and S. Arcioni. 1983. Callus cultures of *Coronilla varia* L. plant regeneration through embryogenesis. Plant Cell Tissue Organ Culture 2:103-110.
12. Meijer, E.G.M. 1982. Shoot formation in tissue cultures of three cultivars of the tropical pasture legume *Stylosanthes guyanensis*. Pflanzenzuchty 89:169-172.
13. Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321-4325.
14. Phillips, G.C. and G.B. Collins. 1980. Somatic embryogenesis from cell suspension cultures of red clover. Crop Sci. 20:323-326.
15. Robbins, M.P., A.D. Bavage, C. Strudwicke and P. Morris. 1998. Genetic manipulation of condensed tannins in higher plants. Ii. Analysis of birdsfoot trefoil plants harboring antisense

dihydroflavonol reductase constructs. Plant Physiol. 116(3):1133-1144.

16. 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.
17. 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.
18. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.