

## Heat Shock Protein 유전자를 이용한 오차드그래스의 형질전환

이효신 · 이인애 · 김미혜 · 손대영<sup>1</sup> · 정민섭 · 조진기\*  
경북대학교 농과대학, <sup>1</sup>경상대학교 대학원 응용생명과학부

### Transformation of Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) with Heat Shock Protein Gene

LEE, Hyo Shin · LEE, In Ae · KIM, Mi Hye · SON, Dae Young<sup>1</sup> · CHUNG, Min Sup · JO, Jin ki\*

College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea

<sup>1</sup>Graduate School of Applied Life Sciences, Gyeongsang National University, Chinju, 660-701, Korea

**ABSTRACT** An experiment was carried out to introduce *OsHSP17.9*, a low molecular HSP gene isolated from rice plant to orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) using *Agrobacterium*. Mature seed-derived calli of orchardgrass were co-cultured with *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 harboring the plasmid pIG-HSP17.9 for transformation. Calli selected by hygromycin were transferred to N<sub>6</sub> medium containing 1 mg/L NAA, 5 mg/L kinetin, 250 mg/L cefotaxime and 50 mg/L hygromycin and several hygromycin resistant plants were obtained. Stable incorporation of the introduced *OsHSP17.9* to the genome of the hygromycin resistant plants was confirmed by PCR and Southern blot analysis. Transformation efficiency was variable between cultivars in which it was 16.5% in Potomac and 8.0% in Frontier. Constitutive expression of the transgene in the transformed orchardgrass tissues was identified by Northern blot analysis but transcript levels were different among individual plants.

**Key words:** *Agrobacterium*, heat shock protein, orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.), summer depression, transformation

#### 서 론

오차드그래스 (orchardgrass)는 북방형의 화분과 목초로서 추위와 가뭄에 대한 적응성이 강하고, 재생력이 우수하며 그늘에서도 잘 자라, 현재 우리나라 전역에서 단파 또는 혼파초지 조성시 가장 많이 이용되고 있다 (Seo et al. 1997). 오차드그래스의 생육적온은 15~21°C로, 봄에 기온이 5°C 이상으로 올라가면 자라기 시작하여, 20°C 내외가 되는 5월과 6월에 생육이 가장 왕성하게 되고, 25°C 이상이 되는 7월과 8월에는 생육이 거의 중지하는 하고현상 (summer depression)을 나타낸다 (Kim et al. 1998). 하고현상에 의하여 혼파초지의 밀도가 저하되어 나지 (裸地)가 생기게 되고, 여기에 고온기에

생육이 왕성한 잡초가 침입하게 되면 목초의 식생비율이 낮아지고 단위면적당 목초의 수량과 사료가치가 저하되어, 결국 부실초지로 변하게 된다 (Lee et al. 2000). 이러한 단점을 극복하기 위하여, 1970년대 이후 기존 육종법에 의한 품종육성 연구가 수행되어 소수의 신품종이 육성되어 왔으나 널리 보급되지는 못하였다 (Kim et al. 1998).

한편, 생물은 생육적온보다 5~10°C 이상의 고온에 노출되면 대부분의 정상적인 mRNA와 단백질의 합성이 억제되고, heat shock protein (HSP)이라 불리는 일단의 단백질들이 합성된다 (Lindquist and Craig 1988). 진핵생물 내에서 합성되는 HSP는 분자량에 따라 HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 및 분자량 15~30 kDa의 저분자량 HSP로 분류되는데, 식물에서는 저분자량 HSP가 고온 내성의 획득과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Lindquist and Craig 1988; Vierling 1991). 따라서, 본 연구에서는 식물체 형질전환 기법을 이

\*Corresponding author. Tel 053-950-5756 Fax 053-950-6750  
E-mail jkjo@knu.ac.kr

용하여 고온 내성 식물체를 획득하여 하고현상의 극복을 통한 목초의 생산성 향상을 위하여, 벼에서 분리한 저분자량 HSP 유전자인 *OsHSP17.9*를 오차드그래스에 도입하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 캘러스의 유도

농촌진흥청 축산기술연구소로부터 분양받은 오차드그래스 (*Dactylis glomerata* L.) '프론티어'와 '포토맥'을 사용하였다. 성숙종자의 외영과 내영을 제거하고 70% 에틸알콜에 30초간 표면살균한 다음, 1% sodium hypochlorite 용액에서 30분간 살균하고 멸균수로 3회 수세하였다. 종자는 3 mg/L dicamba, 30 g/L sucrose, 2 g/L casein hydrolysate, 5 g/L gelrite가 첨가된 N<sub>6</sub> 배지 (Chu et al. 1975)에 치상한 다음, 22°C, 암상태에서 4주 동안 캘러스를 유도하였다.

### *Agrobacterium*의 배양과 형질전환

식물체 형질전환을 위한 binary vector는 T-DNA 내부에 선발표지로서 항생제 저항성 유전자인 hygromycin phosphotransferase (HPT)와 벼 (*Oryza sativa* L. cv Milyang23)의 저분자량 HSP 유전자인 *OsHSP17.9*를 포함하고 있는 pIG-HSP17.9를 이용하였다 (Figure 1).

pIG-HSP17.9로 형질전환된 *Agrobacterium* EHA101을 AB배지 (Chilton et al. 1974)에 도말하여 28°C에서 3일 동안 배양한 다음, 100 μM의 acetosyringone이 첨가된 AA배지

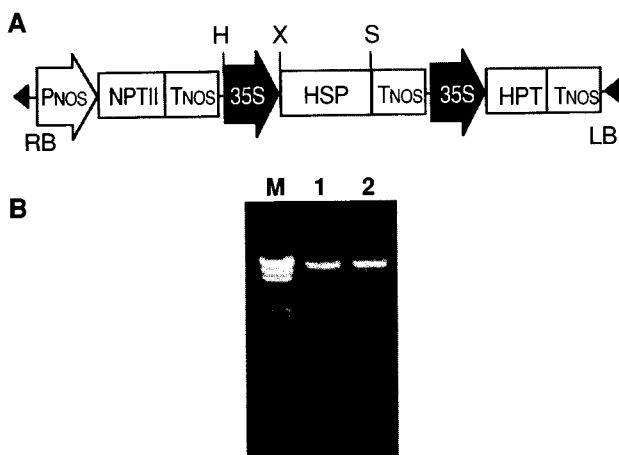
(Toriyama and Hirata 1985)에 접종하여 48시간 동안 진탕배양 (250 rpm)하였다. *Agrobacterium* 배양액에 오차드그래스의 캘러스를 20분 정도 감염시킨 다음, 2 mg/L 2, 4-D, 30 g/L sucrose, 10 g/L glucose, 100 μM acetosyringone, 5 g/L gelrite가 첨가된 N<sub>6</sub> 배지에서 28°C에서 3일 동안 공동배양하였다. 형질전환된 캘러스의 선발을 위하여 2 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, 250 mg/L cefotaxime, 40 mg/L hygromycin, 5 g/L gelrite가 첨가된 N<sub>6</sub> 배지에서 3주 동안 명상태에서 배양한 다음, 선발된 캘러스를 1 mg/L NAA, 5 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose, 250 mg/L cefotaxime, 50 mg/L hygromycin, 5 g/L gelrite가 첨가된 N<sub>6</sub> 배지에서 재분화시켰다.

### PCR 분석

재분화된 식물체의 잎으로부터 Murray와 Thompson의 방법 (1980)에 따라 genomic DNA를 분리하였다. PCR 증폭을 위하여 genomic DNA 2 ng을 template DNA로 이용하였으며, *Taq* DNA polymerase reaction buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin, 0.1% Triton X-100)에 0.2 mM의 dNTP mix, 100 pmol의 정방향 및 역방향 primer, 그리고 2 unit의 *Taq* DNA polymerase를 첨가하였다. PCR 반응은 Personal Cyclor (Biometra, Germany)에서 30 cycle을 실시하였으며, 1 cycle은 denaturation을 94°C에서 1분간, annealing을 55°C에서 1분간, 그리고 extension을 72°C에서 1분간으로 하여 실시하였다. PCR 분석에 사용된 primer는 2중으로 예상되는 증폭산물이 0.3 kbp인 정방향 primer (35Ss1; 5'-TTCAACAAGGGTAA-TATCCGG-3')와 역방향 primer (35Sas1; 5'-CGAAGGATAGTGGGATTGTGC-3') 그리고 0.8 kbp인 정방향 primer (35Ss2; 5'-CCCACCCACGAGGAGCATC-3')와 역방향 primer (HSPas1; 5'-AGAAGGGGTCGAACACGTTG-3')이며, PCR 산물은 1.2 % agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

### Southern blot 분석

Genomic DNA 5 μg을 제한효소 *Xba*I과 *Sac*I으로 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동한 다음, capillary transfer 방법 (Southern 1975)으로 nylon membrane에 전이시켰다. Membrane은 5×SSC, 5×Denhardt's solution, 0.1% SDS, 50 mM Na-Pi (pH 6.5), 0.1 mg/ml denatured salmon sperm DNA, 50% dextran sulfate가 첨가된 용액에서 3시간 (42°C) 동안 prehybridization한 다음, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP로 표식된 *OsHSP17.9* DNA를 첨가하여 12시간 이상 hybridization하였다. Membrane은 2×SSC, 0.1% SDS 용액 (50°C)에서 10분간, 그리고 0.2×SSC, 0.1% SDS 용액 (50°C)에서 1시간 동안 세정한 다음, -70°C에서 2~3일간 X-ray film (Kodak)



**Figure 1.** (A) Schematic diagram of the expression vector, pIG-HSP17.9, used for the transformation of orchardgrass. The *OsHSP17.9* gene was placed under the control of the CaMV 35S promoter. Restriction sites of *Hind*III (H), *Xba*I (X), and *Sac*I (S) were shown. (B) Restriction enzyme analysis of the construct, pIG-HSP17.9. Plasmid DNA was digested by *Hind*III and *Xba*I (lane 1), or *Xba*I and *Sac*I (lane 2), and analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis. M,  $\lambda$  DNA digested with *Hind*III, size marker.

에 노출시켰다.

**Northern blot 분석**

형질전환이 확인된 식물체의 잎으로부터 guanidine thiocyanate 법 (McGookin 1984)으로 total RNA를 분리하였다. 분리한 total RNA (10 µg)를 1.2% formaldehyde agarose gel에 전기영동한 다음, capillary transfer 방법으로 nylon membrane에 전이시켰다. Prehybridization 용액에 50% dextran sulfate를 첨가하지 않는 것을 제외하고는 Southern blot 분석에서의 동일한 방법으로 실시하였다.

**결과 및 고찰**

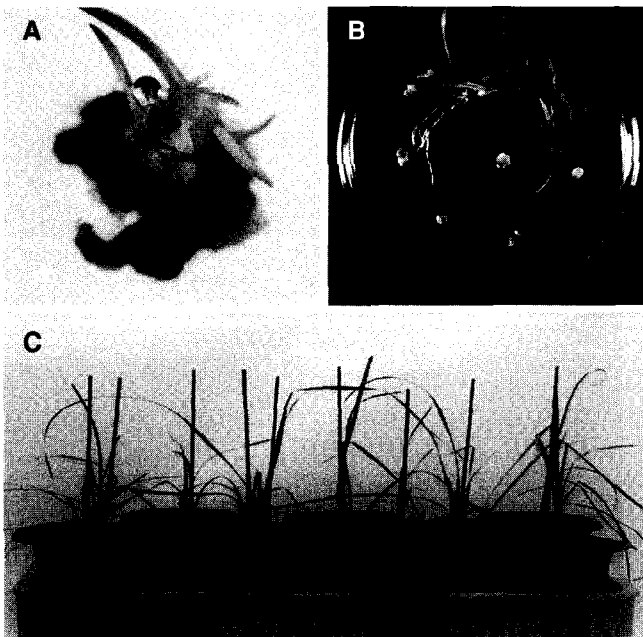
벼의 저분자량 HSP 유전자가 도입된 *Agrobacterium* EHA101과 공동배양한 캘러스를 hygromycin이 첨가된 선발 배지에서 3주간 배양한 결과, 배양초기에는 캘러스의 증식억제와 갈변이 진행되는 현상을 나타내었으나 일부 캘러스의 경우 갈변된 캘러스의 세포로부터 hygromycin에 저항성을 나타내는 새로운 캘러스의 증식이 관찰되었다.

선발된 캘러스를 N<sub>6</sub> 재분화 배지에 치상하여 배양한 결과, 배양 2주 후부터 녹점 (부정배)의 생성이 관찰되었으며, 배양 3~5주 경부터 신초의 분화가 관찰되었다 (Figure 2A). 기내에서 지상부와 지하부가 정상적으로 전개된 식물체를 (Figure 2B) 일주일 동안 수경재배하여 순화시킨 다음, 화분

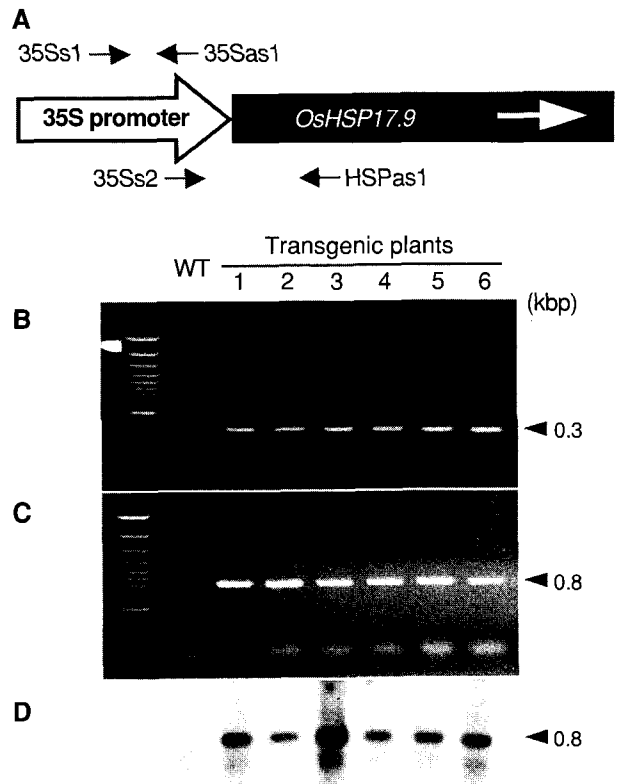
으로 옮겨 성장상에서 생육시켰다 (Figure 2C). 이때 재분화된 식물체는 모품종과 같이 정상적으로 생육하였으며 형태적으로 차이를 나타내지 않았다.

재분화된 식물체의 genome에 외래의 DNA가 정상적으로 삽입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 PCR 분석을 실시한 결과, hygromycin 50 mg/L가 첨가된 배지에서 재분화된 식물체에서 예상크기와 동일한 0.3 및 0.8 kbp의 PCR 산물의 증폭을 확인하였다 (Figure 3B and C). 그러나, 형질전환하지 않은 식물체에서는 특이적인 증폭산물이 존재하지 않았다. 또한 형질전환 식물체로부터 분리한 genomic DNA를 제한효소 *Xba*I과 *Sac*I으로 절단하여 Southern blot 분석을 실시한 결과에서도 PCR 분석에서의 동일한 결과를 나타내었다 (Figure 3D).

*Agrobacterium*을 이용한 식물의 형질전환 효율에는 모식물의 genotype, 배양 조직, 배지 조성 및 *Agrobacterium* strain 등의 요인들이 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 이들 요인 중에서 단자엽 식물의 형질전환 효율에는 모식물의 genotype이 가장 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Hiei et al. 1997). 본 연구에서는 오차드그래스의 형질전환



**Figure 2.** Plant regeneration from seed-derived callus of orchardgrass transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. (A) Shoots induced in regeneration medium containing hygromycin after 3 weeks of culture. (B) Hygromycin-resistant plantlets with roots and shoots. (C) Transgenic orchardgrass cultivated in pot for 6 weeks.



**Figure 3.** PCR and Southern blot analysis of transgenic orchardgrass. (A) Schematic diagram for PCR amplification of 35S promoter and *OsHSP17.9* DNA fragments. (B) PCR amplification with 35Ss1 and 35Sas1 primers. (C) PCR amplification with 35Ss2 and HSPas1 primers. (D) Southern blot analysis. Genomic DNA from wild-type (WT) and transgenic plants was digested with *Xba*I and *Sac*I and was hybridized with the <sup>32</sup>P-labeled *OsHSP17.9* DNA. Numbers indicate independent transgenic lines.

효율에 영향을 미치는 품종 간 차이를 조사한 결과, 캘러스 선발배지에서 hygromycin에 저항성을 갖는 캘러스 비율은 '프론티어'의 경우 46.5%, '포토맥'의 경우 58.0%를 나타내었다 (Table 1). Hygromycin에 저항성을 갖는 캘러스를 재분화배지에 이식하여 얻은 형질전환 식물체의 비율은 '프론티어'의 경우 8.0%, '포토맥'의 경우 16.5%를 나타내어 품종 간의 차이가 크다는 것을 보여주었다 (Table 1).

PCR 분석 및 Southern blot 분석을 통하여 형질전환이 확인된 식물체 내에서 벼의 저분자량 HSP 유전자가 정상적으로 발현되는지의 여부를 확인하기 위하여, 식물체의 잎으로부터 total RNA를 분리하여 Northern blot 분석을 실시하였다. 그 결과, 형질전환된 모든 식물체에서 예상크기와 동일한 0.7 kbp의 전사체의 축적이 관찰되어 도입된 유전자가 항상적으로 발현된다는 것을 나타내었다 (Figure 4). 또한, 도입된 유전자의 발현량이 형질전환 식물체 사이에 차이가 있는 것으로 나타났는데, 이는 도입된 유전자의 copy number와 삽입된 위치 및 somaclonal variation 등에 의한 차이에 기인한다고 보고되었다 (Kuhlemeier et al. 1987; Larkin and Scowcroft 1981).

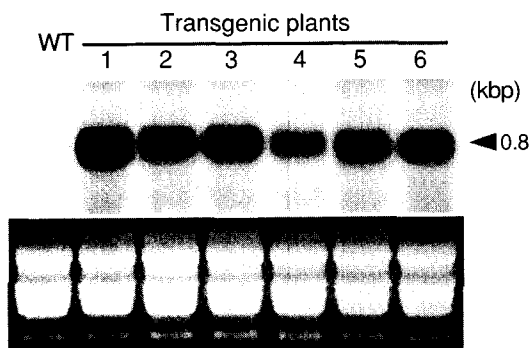
식물체를 고온에 의한 손상으로부터 보호하는 데 필요한 최소한의 저분자량 HSP의 양은 아직 보고된 바는 없지만, 고등식물에서 저분자량 HSP는 고온환경에서 전체 단백질의 1%까지 축적이 되는 것으로 알려져 있으며, 이는 세포의 열 손상을 방지하는 과정에서 저분자량 HSP가 중요한 역할을

할 뿐 아니라 많은 양의 저분자량 HSP가 요구된다는 것을 의미한다 (Lin et al. 1984; Kimpel et al. 1990; Vierling 1991). 축적된 저분자량 HSP는 고온에 의해 야기되는 단백질의 부적절한 상호작용을 억제할 뿐만 아니라 변성된 단백질의 refolding을 촉진하고 단백질의 막 투과시 unfolding 상태를 유지시키거나 변성된 단백질의 응집을 억제함으로써 세포의 열 손상을 최소화하여 세포 내 단백질을 안정화시키는 등의 분자 샤페론으로서의 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다 (De Jong et al. 1993; Waters et al. 1996; Garrette et al. 1997). 식물체의 고온 내성의 획득에 있어 저분자량 HSP의 기능에 관한 직접적인 증거로서, 최근 형질전환 식물체를 이용하여 저분자량 HSP의 축적에 의한 고온 내성의 획득이 보고되고 있다 (Park et al. 1996; Banzet et al. 1998; Lee 2000). 따라서, 본 연구에서 벼 유래의 저분자량 HSP 유전자 (*OsHSP17.9*)가 강하게 발현하는 것으로 나타난 1, 3 및 6 등의 형질전환 오차드그래스 개체를 이용하여 (Figure 4), 고온 내성의 획득 여부를 현재 조사중에 있다.

이상의 결과를 통하여 단자엽 식물인 오차드그래스의 종자유래의 캘러스를 이용하여 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 방법을 확립하였다. 그러나, 오차드그래스의 식물체 재분화 기간의 단축과 형질전환 효율의 향상 등에 관한 연구가 지속적으로 필요하며, 이를 통하여 형질전환기법을 이용한 화분과 목초의 개량에 기여할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 본 연구를 통해 얻은 형질전환 오차드그래스 계통은 고온 내성 목초의 개발을 위한 연구재료로서 중요하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

**Table 1.** The variation of transformation efficiency in orchardgrass mediated by *Agrobacterium tumefaciens* EHA101.

| Cultivars | No. of calli co-cultivated (A) | No. of calli with HygR (%) | No. of transgenic plants (B) | B/A (%) |
|-----------|--------------------------------|----------------------------|------------------------------|---------|
| Potomac   | 200                            | 116 (58.0)                 | 33                           | 16.5    |
| Frontier  | 200                            | 93 (46.5)                  | 16                           | 8.0     |



**Figure 4.** Northern blot analysis of transgenic orchardgrass. Total RNA was isolated from the leaves of wild-type (WT) and transgenic orchardgrass. Numbers indicate independent transgenic lines. The lower part of each panel shows an ethidium bromide-stained gel.

## 적 요

벼에서 분리한 저분자량 HSP 유전자 (*OsHSP17.9*)를 오차드그래스 (orchardgrass)에 도입하기 위하여 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환을 실시하여 다음의 결과를 얻었다. 오차드그래스의 종자유래의 캘러스를 *OsHSP17.9* 유전자가 도입된 *Agrobacterium* EHA101과 공동배양한 다음, hygromycin 선발된 캘러스로부터 hygromycin 저항성 식물체를 얻었다. PCR 및 Southern blot 분석 결과, 벼의 저분자량 HSP 유전자가 재분화된 식물체에 안정적으로 도입되었음을 확인하였으며, 품종 간의 형질전환 효율은 '포토맥'의 경우 16.5%, '프론티어'의 경우 8.0%를 나타내었다. 또한 Northern blot 분석 결과, 도입된 유전자가 형질전환체에서 정상적으로 발현된다는 것을 확인하였으며, 형질전환체의 계통 간에 발현량의 차이를 나타내었다.

사사 - 본 연구는 농림기술개발사업 (19970398) 및 2000년도 경북대학교 Post-Doc. 연수지원에 의하여 수행되었음.

## 인용문헌

- Banzet N, Richaud C, Deveaux Y, Kazumaier M, Gagnon J, Triantaphylides C (1998) Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. *Plant J* **13**:519-527
- Chilton MD, Currier TC, Farrand SK, Bandich AJ, Gordon MP, Nester EW (1974) *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**:3672-3676
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sinica* **18**:659-668
- De Jong, WW, Leunissen, JA, Voorter, CE (1993) Evolution of the alpha-crystallin /small heat-shock protein family. *Mol Biol Evol* **10**:103-126
- Garrette J, Lee GJ, Alan M, Helen R, Vierling E (1997) Small HSP stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding competent state. *EMBO J* **16**:659-671
- Hiei Y, Komari T, Kubo T (1997) Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* **35**:205-218
- Kim KY, Rim YW, Choi GJ, Shin JS, Kim GK, Jo JK (1998) Rapid regeneration of plants on N<sub>6</sub> medium from orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) calli. *J Kor Grassl Sci* **18**:267-272
- Kimpel JA, Nagao RT, Goekjian V, Key JL (1990) Regulation of the heat shock response in soybean seedling. *Plant Physiol* **94**:988-995
- Kuhlemeier C, Green PJ, Chua NH (1987) Regulation of gene expression in the higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* **38**:221-257
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* **60**:197-214
- Lee BH (2000) Constitutive expression of small heat shock protein increases thermotolerance in transgenic plant. *Kor J Plant Tiss Cult* **27**:13-18
- Lee ID, Lee HS, Kim SK (2000) Comparative studies on the DM yield and quality before and after pasture renovation of summer depression damaged pasture. *J Kor Grassl Sci* **20**:215-220
- Lin CY, Roberts JK, Key JL (1984) Acquisition of thermo-tolerance in soybean seedlings. *Plant Physiol* **74**:152-160
- Lindquist S, Craig EA (1988) The heat shock proteins. *Annu Rev Genet* **22**:631-77
- McGookin R (1984) RNA extraction by the guanidine thiocyanate procedure. In: Walker JM (ed), *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2, Humana Press, New Jersey, pp. 113-116
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**:4321-4325
- Park S, Shivaji R, Krans JV, Luthe DS (1996) Heat-shock response in heat-tolerant and nontolerant variants of *Agrostis palustris* Huds. *Plant Physiol* **111**:515-524
- Seo S, Shin DE, Chung ES, Kang WS, Yang JS (1997) Growth characteristics, yield, and nutritive value of early and late maruting cultivars of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *J Kor Grassl Sci* **17**:27-34
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments. *J Mol Biol* **98**:503-517
- Toriyama K, Hirata K (1985) Cell suspensin and protoplast culture in rice. *Plant Sci* **41**:179-183
- Vierling E (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol* **42**:579-620
- Waters ER, Lee GJ, Vierling E (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J Exp Bot* **47**:325-338

(접수일자 2001년 3월 9일)