

잔디(*Agrostis stolonifera*)품종 《펜 A-1》에서 *miRNA393a*의 도입과 검증

조충원, 한명훈, 허동수

경애하는 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《부침땅을 제외한 모든 땅에 나무를 심거나 풀판을 조성하며 꽃과 지피식물을 심어 빈땅이나 잡초가 무성한 곳이 하나도 없게 하자는것이 당의 의도입니다. 도시와 농촌의 주민지구와 철길주변, 공원들에는 잔디를 비롯한 지피식물을 많이 심어 생땅이 보이지 않게 하여야 합니다.》

온 나라를 수림화, 원림화하자면 잔디와 같은 지피식물을 많이 심을뿐아니라 그에 대한 육종사업을 잘하여야 한다.

잔디형질을 개선하기 위한 육종목표는 푸르러있는 기간이 길고 온도, 건조와 같은 스트레스에 잘 견딜뿐아니라 밟아도 쉽게 일어서며 재배하기 쉬운 품종을 육종하는것이다.

《펜 A-1》은 세계적으로 널리 리용되는 잔디품종의 하나로서 그것을 우리 나라의 기후풍토에 맞는 좋은 품종으로 개량하는 문제가 중요하게 제기된다.

농작물에서는 이미 *p5CS*, *mtlD*, *BADH*, *DREB*와 같은 삼투보호제, 전사인자와 같은 유전자를 도입하여 여러가지 견딜성품종들을 육종하였으며 최근에는 자체의 표적유전자를 조절하는 *microRNA*가 주목되어 스트레스견딜성에 관여하는 *miRNA*를 과잉발현시켜 견딜성품종을 육성하려는 연구들[1, 2, 4, 6, 10, 11]이 진행되고있다.

잔디에 대해서는 알곡작물에 비하여 유전자전이연구가 비교적 적게 진행[5, 8]되었고 내건조성이 약한 《펜 A-1》에 *miRNA393a* 유전자를 도입한 자료는 없다.

이로부터 우리는 먼저 《펜 A-1》을 우리 나라의 기후조건에서 안전하게 재배하기 위하여 *Agrobacterium*법으로 *miRNA393a*를 도입하여 가물견딜성을 높이기 위한 연구를 하였다.

재료 및 방법

재료로는 잔디(*Agrostis stolonifera*)품종 《펜 A-1》(기본염색체수(X)가 7인 다른질4배체($2n=4X=28$))의 종자와 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105(pCambia1301-miRNA393a)균주를 리용하였다.

방법 《펜 A-1》의 종자를 70% 에틸알콜로 1min, 0.1% HgCl₂용액으로 20min동안 소독하고 멸균수로 4~5회 씻은 후 배지에 접종[8]하였다. 접종한 후 무균조작대안에서 배지를 1~2h동안 충분히 건조시켰다. 그다음 암조건, (26±2)°C에서 배양하였다. 30일만에 계대배양을 진행하여 얻은 유상조직을 분화배지에 접종하여 (26±2)°C, 2 000lx, 16h/d의 빛조건에서 30일동안 배양하여 싹분화를 관찰하였다.

감염재료로는 30일 동안 자란 분별상태가 좋은 2~4mm 크기의 배성유상조직을 리용하였다.

감염 및 공배양배지로는 아세토시링곤(AS)을 100 μ mol/L로 첨가한 AAM배지를 리용하였다. 감염농도는 $A_{600}=0.4\sim0.6$, 감염시간은 3min, 공배양시간은 2일로 하였다. Hyg 50 μ g/mL, Cef(세포탁심) 500 μ g/mL가 첨가된 유상조직유도배지에서 건딜성유상조직을 선발하였다. 선발한 유상조직을 6-BA 2.0mg/L를 포함한 MS배지에서 분화시켰다.

항생제와 함께 알림유전자인 GUS의 조직화학적분석으로 전이유전자를 검증하였다.

결과 및 논의

우리는 먼저 형질전환재료로 리용할수 있도록 《펜 A-1》의 유상조직유도와 유상조직으로부터 식물체분화방법을 확립하기 위하여 여기에 미치는 몇가지 요인들의 영향을 보았다.

1) 유상조직유도에 미치는 몇가지 요인들의 영향

먼저 잔디종자의 유상조직유도율을 높이기 위하여 종자를 소독하기에 앞서 4 $^{\circ}$ C 물에 담그고 물에 담근 일수가 유상조직유도에 주는 영향을 관찰하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 물에 담그지 않고 에틸알콜과 HgCl₂소독을 진행하면 유상조직유도율이 28.7%로서 낮았지만 물에 담근 시간이 길어질수록 유상조직유도율은 증가하였으며 1일후에는 78.5%에 달하였으며 2일이 지나면서 다시 감소하였다. 이것은 물이 종자에 침투되어 종자외피조직을 연화시키면서 발아율을 높이고 이에 따라 유상조직유도율을 높이기때문이다. 또한 물에 담근 시간이 길어질수록 종자가 무산소숨쉬기상태에 들어가면서 영양물질을 많이 소비하면서 유상조직유도율이 떨어지기때문이라고 보아진다.[9]

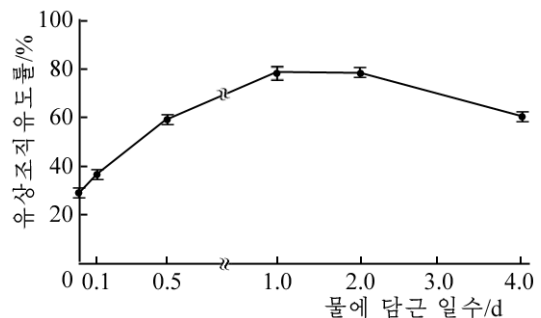


그림 1. 종자를 물에 담근 일수가 유상조직유도에 미치는 영향
배지: MS+2, 4-D 2.0mg/L, 배양일수 30d

이로부터 《펜 A-1》의 종자를 1일동안 4 $^{\circ}$ C 물에 담근 다음 70% 에틸알콜로 1min, 0.1% HgCl₂로 20min동안 소독하고 배지에 접종하여 유상조직을 유도하였다.

형질전환용재료로 리용하기 위하여서는 조직이 치밀하고 연한 노란색을 띠며 흠어짐성이 좋은 배성유상조직[3]을 유도하여야 한다. 그러므로 우리는 생장조절물질들이 배성유상조직유도율을 높인다[3]는데 기초하여 배성유상조직형성에 미치는 생장조절물질들의 영향을 보았다.

먼저 식물조직을 탈분화시키는데 쓰이는 2, 4-D의 영향을 관찰하였다.(표 1)

표 1에서 보는것처럼 2, 4-D농도가 증가함에 따라 유상조직유도율이 증가하였으나 2.0mg/L이상에서는 더이상 증가하지 않았다. 또한 배성유상조직유도율은 2, 4-D 2.0mg/L

에서 11.8%로 제일 높았고 그 이상에서는 급격히 감소하였다. 이것은 2, 4-D농도가 지나치게 높으면 배성유상조직유도에 부정적인 영향을 미친다는것을 보여준다. 이로부터 배성유상조직유도배지에 2, 4-D를 2.0mg/L로 첨가하였다.

표 1. 배성유상조직형성에 미치는 2, 4-D의 영향

2, 4-D농도 (mg·L ⁻¹)	접종한 종자수 /개	유상조직수 /개	유상조직유도률 /%	배성유상조직수 /개	배성유상조직 유도률/%
0.5	205	108	52.7	9	8.3
1.0	211	149	70.6	16	10.7
2.0	195	153	78.5	18	11.8
4.0	168	130	77.4	4	3.1
8.0	236	167	70.7	2	1.2

다음으로 배성유상조직유도에 미치는 6-BA의 영향을 관찰하였다.(표 2)

표 2. 배성유상조직유도에 미치는 6-BA의 영향

6-BA농도 (mg·L ⁻¹)	접종한 종자수 /개	유상조직수 /개	유상조직유도률 /%	배성유상조직수 /개	배성유상조직 유도률/%
0	195	153	78.5	18	11.8
0.05	201	151	75.1	37	24.5
0.10	218	172	78.9	69	40.1
0.20	191	146	76.4	47	32.2
0.30	183	142	77.6	34	23.9

2, 4-D첨가농도 2.0mg/L

표 2에서 보는것처럼 6-BA의 농도가 높아짐에 따라 유상조직유도에서는 거의 변화가 없으나 배성유상조직유도률은 급격히 증가하여 0.10mg/L에서는 40.1%에 달하였으며 그 이상의 농도에서는 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 이로부터 배성유상조직유도배지에 2, 4-D 2.0mg/L와 함께 6-BA를 0.10mg/L 첨가하였다.

2) 유상조직으로부터 싹분화에 미치는 몇가지 요인들의 영향

배성유상조직을 형질전환용재료로 리용하자면 형질전환실험을 진행하고 선발된 재료를 분화시킬 때 분화가 잘될수 있는 방법을 미리 확립하여야 한다.

배지에서 유상조직만을 떼내어 생장조절물질의 농도가 같은 배지에 계대하여 유상조직을 증식시킨 다음 이것을 분화배지에 옮겨 싹분화특성을 보았다.

먼저 유상조직으로부터 싹분화에 미치는 6-BA의 영향을 본 결과는 표 3과 같다.

표 3. 유상조직으로부터 싹분화에 미치는 6-BA의 영향

6-BA농도 (mg·L ⁻¹)	접종한 유상 조직수/개	싹분화된 유상 조직수/개	싹분화률/%	유상조직당어리당 싹수/개
0	20	1	5.0	2.0
0.5	22	9	40.9	5.6±0.3
1.0	21	13	61.9	7.2±0.4
2.0	18	15	83.3	8.5±0.5
4.0	24	10	41.7	5.4±0.3

MS배지, 배양일수 30d

표 3에서 보는것처럼 6-BA의 농도가 높아짐에 따라 배성유상조직으로부터 싹분화률과 유상조직덩어리당 분화된 싹수가 증가하였으며 2.0mg/L이상에서는 감소되는 경향이 나타났다. 그러므로 분화배지에 6-BA를 2.0mg/L로 첨가하였다.

다음으로 유상조직의 계대차수에 따르는 싹분화특성을 보았다.(표 4)

표 4에서 보는바와 같

이 계대차수가 늘어날수록 싹분화률과 덩어리당 싹수가 작아지는 경향이 나타났다. 이것은 유상조직의 나이가 많아질수록 싹분화특성이 떨어진다는것을 보여준다. 그러므로 형질전환용재료로 쓰이는 배성유상조직은 2차이상 계대하지 말아야 한다는것을 알수 있다.

표 4. 유상조직의 계대차수에 따르는 싹분화특성

계대차수	접종한 유상조직수/개	싹분화된 유상조직수/개	싹분화률/%	유상조직덩어리당 싹수/개
1차	18	15	83.3	8.5±0.5
2차	22	14	63.6	7.6±0.4
3차	20	11	55.0	6.2±0.3
계대일수 30d, 계대배지=유상조직유도배지, 분화배지 MS+6-BA 2.0mg/L				

그림 2는 《펜 A-1》품종의 종자로부터 유상조직의 유도과 유상조직으로부터 싹분화에 이르는 과정을 보여주고있다.

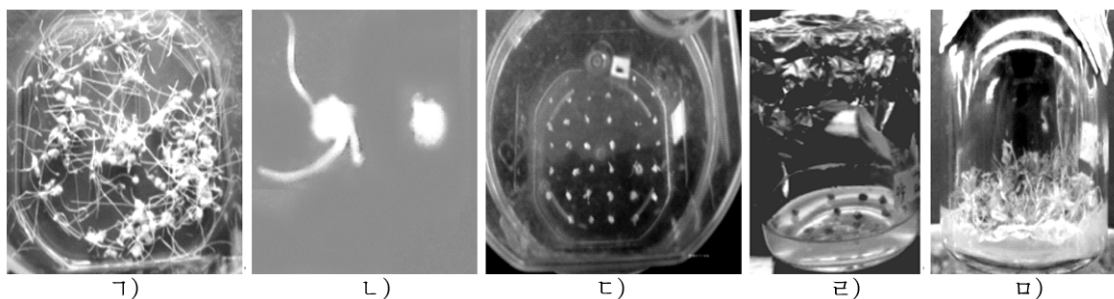


그림 2. 《펜 A-1》유상조직의 유도과 유상조직으로부터 싹분화과정

가) 배지에 접종한 종자로부터 유도된 유상조직, 나) 왼쪽: 1개의 종자로부터 형성된 싹과 배성 유상조직, 오른쪽: 《펜 A-1》의 배성유상조직, 다) 계대배양중의 배성유상조직, 라) 분화배지에 옮겨진 배성유상조직, 마) 유상조직으로부터 분화되는 싹(배양일수 30d)

3) *Agrobacterium*에 의한 *miRNA393a*의 도입과 검증

분별상태가 좋고 연한 노란색을 띠는 2~4mm 크기의 배성유상조직을 OD₆₀₀=0.4~0.6의 균액속에서 3min간 감염시키고 28℃, 암조건에서 2일간 공배양한 다음 합리적인 세척조건을 찾기 위한 실험을 진행하였다.

선행연구에 의하면 많은 경우 500μg/mL Cef로 3~5차 세척하였다. 때로 멸균수를 함께 리용하거나 건조시킨 자료도 있[5, 7, 8]으나 구체적인 방법은 소개되지 않았다. 우리는 공배양한 유상조직을 표 5와 같이 4가지 방법으로 세척하였다.

표 5에서 보는바와 같이 멸균수로만 세척하는 경우 배양 3일부터 *Agrobacterium*의 오염이 나타났으며 Cef로 한번 더 세척하여도 빈도는 좀 낮지만 역시 오염되었다. 그러나 멸균수로 세척하고 Cef로 한번 더 세

표 5. 각이한 세척방법에 따르는 *Agrobacterium*의 출현

방법	균출현정도
멸균수	+++
멸균수+Cef	++
멸균수+Cef+건조	—
멸균수+건조	—
건조시간 2h	

척한 다음 유상조직이 러지상에서 자유롭게 움직일 정도로 건조시켰을 때에는 균이 나타나지 않았다. 멸균수로만 세척하고 건조시켰을 때에도 균이 나타나지 않았다. 이것은 멸균수로 세척하고 건조만 잘하면 항생제를 쓰지 않아도 균을 철저히 없앨수 있다는것을 보여준다.

다음으로 외식체선발을 위한 Hyg농도를 결정하였다.(표 6)

Hyg의 농도가 $40\mu\text{g/mL}$ 까지는 유상조직의 생육상태에서 변화가 없었으나 $50\mu\text{g/mL}$ 이상에서는 갈색으로 변화되면서 살아남지 못하였다. 이것은 Hyg $50\mu\text{g/mL}$ 가 첨가된 배지에서 Hyg저항성유상조직을 선발할수 있다는것을 보여준다.

세척과 건조를 진행한 유상조직을 Hyg $50\mu\text{g/mL}$ 첨가된 유상조직유도배지에 접종하여 1차선발률을 평가하였다.(표 7)

표 6. Hyg농도에 따르는 유상조직의 생육상태

농도 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	총수 /개	색갈	증식 상태	생존수 /개	생존률 /%
0	50	노란색	++	50	100
40	80	노란색	++	75	94
50	80	갈색	—	0	0
60	50	갈색	—	0	0

표 7. Hyg저항성외식체의 선발률과 분화률

구분	총수 /개	선발된 수/개	선발률 /%	분화된 수/개	분화률 /%
대조구	80	0	0	0	0
처리구	84	23	27.4	17	73.9
배양기일 30d					

표 7에서 보는바와 같이 Hyg를 $50\mu\text{g/mL}$ 로 첨가하여 선발하는 경우 Hyg저항성유상조직의 선발률은 27.4%였다. Hyg저항성유상조직을 6-BA 2.0mg/L 가 첨가된 MS배지(분화배지)에 옮겨 분화시킨 결과 분화률은 73.9%였다.

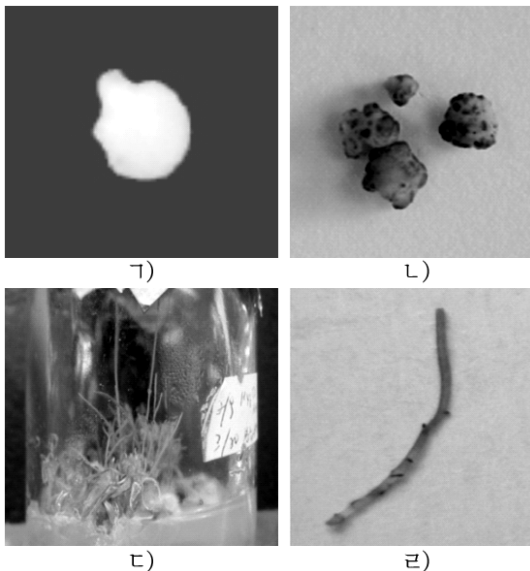


그림 3. 각이한 유전자전이단계의

《펜 A-1》과 GUS발현

1) 30d 배양후 유상조직, 2) 선발 7d후 유상조직에서의 GUS발현, 3) Hyg저항성유상조직으로부터 분화된 싹, 4) 식물체뿌리에서의 GUS발현

유상조직과 순화단계를 거친 식물체의 뿌리에서 GUS검정을 한 결과는 그림 3과 같다.

그림 3의 2)에서 보는바와 같이 선발개체의 뿌리에서 GUS가 발현되어 푸른색반점이 나타났다. *miRNA393a*와 편쇄된 GUS가 발현된것은 목적하는 유전자가 삽입되었다는 간접적인 증거로 된다.

이미 많은 작물에서 유전자전이기술로 저항성유전자를 유상조직이나 원형질체에 도입하여 병저항성, 염저항성, 금속저항성 등 여러가지 변이체를 육성하였다. 잔디의 조직배양과 전이에 대한 자료는 알곡작물에 비해볼 때 비교적 적다. 일반적으로 추운 계절형잔디가 더운 계절형잔디보다 유상조직의 유도 및 재생이 어렵다.[5, 7, 8]

온도, 건조, 염과 같은 비생물스트레스에 대한 건딜성육종에 삼투보호제, 전사인자와 같은 유전자와 함께 최근에는 자체의 표적유

전자를 조절하는 *microRNA*가 주목되고있다.

이미 많은 생물에서 견딜성에 관여하는 유전자로 알려진 *microRNA393a*, *microRNA397*, *microRNA396*을 과잉발현시켜 스트레스견딜성품종을 육성하려고 시도하고있다.[2, 6-8, 11] 푸르러있는 기간도 역시 온도, 가물, 빛과 관련되어있는 환경스트레스견딜성육종에 귀착된다고 볼수 있다.

앞으로 잔디들의 특성을 잘 알고 육종목표에 맞게 합리적인 방법을 적용하면 새로운 특성을 가진 품종들을 더 많이 만들어낼수 있게 될것이다.

맺 는 말

1) 《펜 A-1》의 종자를 소독하기에 앞서 1일동안 물에 담그면 유상조직유도률은 78.5%에 달한다.

2) 유상조직유도배지는 MS+2, 4-D 2.0mg/L+6-BA 0.10mg/L(배성유상조직유도률 40.1%), 분화배지는 MS+6-BA 2.0mg/L이며 이때 싹분화률은 83.3%이고 유상조직덩어리당 싹수는 8.5개이다.

3) 공배양후 멸균수로 세척하고 충분히 건조하면 항생제를 쓰지 않고도 균을 완전히 없앨수 있다.

4) 유상조직을 선발하기 위한 Hyg농도는 50 μ g/mL, 저항성유상조직의 선발률은 27.4%이다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 51, 6, 137, 주체94(2005).
- [2] 허동수 등; 전국과학토론회 논문집(생명과학), 김일성종합대학출판사, 251~252, 주체100(2011).
- [3] 박학일 등; 생물학, 4, 4, 주체90(2001).
- [4] Botao Zhao; Biochemical and Biophysical Research Communications, 354, 585, 2007.
- [5] Caixia Gao et al.; Plant Cell Rep., 27, 1601, 2008.
- [6] J. Gregory; Phytochemistry, 71, 404, 2010.
- [7] Jun Liu et al.; The Open Biotechnology Journal, 4, 18, 2010.
- [8] M. L. Chai et al.; Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 77, 165, 2004.
- [9] Qi Chun Hui et al.; Acta Agrestia Sinica, 13, 3, 257, 2005.
- [10] Séverine Lacombe et al.; BMC Plant Biology, 123, 1, 2008.
- [11] Yan-du Lu et al.; Plant Cell Rep., 27, 1571, 2008.

주체104(2015)년 4월 5일 원고접수

The Introduction of *miRNA393a* and Its Identification on “Penn A-1”(*Agrostis stolonifera*)

Jo Chung Won, Han Myong Hun and Ho Tong Su

The fundamental studies had been done to increase “Penn A-1” tolerant abilities for high temperature, drought and salt stress through transformation of *miRNA393a* into “Penn A-1”. From the results of our experiments, we have concluded that some hypha could be completely removed without using antibiotics when sterile water had been used and dried tubes after co-culture, and Hyg concentration for selecting callus was 50 μ g/mL and a selecting ratio on tolerant callus was about 27.4%.

Key words: *Agrostis stolonifera*, “Penn A-1”, transformation, *Agrobacterium*, *miRNA393a*