



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

ORE7 유전자 도입에 의한
노화지연 크리핑 벤투그라스 개발
Development of long-living creeping bentgrass
(*Agrostis stolonifera* L. cv.penncross)
by using *ORESARA7(ORE7)* gene

濟州大學校 大學院

生命工學科

姜銀廷

2010年 8月

ORE7 유전자 도입에 의한
노화지연 크리핑 벤투그라스 개발
Development of long-living creeping bentgrass
(*Agrostis stolonifera* L. cv.penncross)
by using *ORESARA7(ORE7)* gene

指導教授 李 孝 淵

姜 銀 廷

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2010年 8月

姜銀廷의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 임 평 옥 印

委 員 류 기 중 印

委 員 이 효 연 印

濟州大學校 大學院

2010年 8月

목차

Abstract	2
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	
1. 식물 재료	6
2. 형질전환에 사용한 vector 및 <i>A.tumefaciens</i>	6
3. 크리핑 벤틀그라스의 형질전환	7
4. 형질전환 식물체의 유전자 도입 및 발현 분석	8
5. 형질전환 식물의 특성 분석	11
III. 결과 및 고찰	
1. 크리핑 벤틀그라스의 형질전환	14
2. 형질전환 식물체의 유전자 도입 및 발현 분석	
1) PAT 단백질 확인 및 genomic-PCR	14
2) Southern blot 분석	15
3) RT-PCR	16
3. 형질전환 식물의 특성 분석	
1) 암 조건에서 형질전환 식물의 특성 분석	16
2) 염분 조건에서 형질전환 식물의 특성 분석	17
도표	18
IV. 종합고찰	30
V. 참고문헌	32
감사의 글	39

Abstract

The *ORE7* gene has been known to delay the characteristics of leaf senescence in age-dependent manner in *Arabidopsis thaliana*. To develop the bentgrass with the extended longevity in its leaf organ, we introduced the *ORE7* gene with ubiquitin promoter along with the herbicide resistance (*bar*) gene into the creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L. cv. "Penncross") using pCAMBIA3301 vector. The transgenic plants were selected on the media with 5 mg/L Phosphinothricin (PPT) and identified the insertion of gene by the PCR analysis. In the immunoassay of *bar* gene product from the selected lines, phosphinothricin acetyltransferase (PAT) protein was easily identified in all plants tested. Southern blotting was performed; clearly one mutant line (ORE7-1) with a single copy and the other mutant lines (ORE7-2 and ORE7-3) with two copies, respectively. We then compared the characteristics of leaf senescence using chlorophyll degradation pattern, chlorophyll content, photochemical efficiency (F_v/F_m) from the transgenic lines under dark treatment. During wild-type was under severe stress at 4-day and completely at 10-day in continuous dark treatment, the ORE7-1 (ORE7-ox) was comparably delayed in chlorophyll content. Photochemical efficiency further supported that the ORE7-1 (ORE7-ox) showed still a 90% activity in the same conditions. We also compared the phenotype of leaf senescence between the wild-type and the ORE7-1 (ORE7-ox) transgenic plants under the salt stress; wild-type plant completely was stressed more than 100 mM NaCl at 6-day treatment, whereas the ORE7-1 (ORE7-ox) was slightly affected. The results suggest that the transgenic bentgrass plants were extended the leaf longevity by the introduction of *ORE7* gene and well tolerated both in dark and salt stresses.

I. 서론

잔디는 화본과의 다년생 초본으로 생육 적온에 따라 난지형잔디와 한지형잔디로 나뉜다. 난지형잔디는 생장 적정 온도가 27-35℃로 여름 고온기에 왕성한 생장을 하며, 봄과 가을에는 완만한 생장을 하지만 겨울에는 노화시기에 접어들기 때문에 생육이 정지된 채 휴면상태로 월동을 하게 된다. 대표적인 초종은 국내에 많이 자생하는 들잔디, 금잔디, 갯잔디 등을 포함한 한국 잔디류와 열대·아열대 기후대에 주로 쓰이는 버뮤다그라스 등이다. 한지형 잔디는 생장 적정 온도가 15-24℃로 봄과 가을에 왕성하게 생장을 하며 고온 다습한 여름철에는 생육이 급격히 감소한다. 대표적인 초종은 블루그라스류(Bluegrass), 파인페스큐류 (Fine Fescue), 벤투그라스 (Bentgrass) 등이다.

Agrostis 속에 속하는 벤투그라스는 서유럽이 원산지이며 품질이 가장 좋은 다년생 한지형 잔디로 알려져 있다. 질감이 우수하고 엽폭이 좁으며 짧은 예초에 견디는 힘이 강하기 때문에 골프장이나 축구장 등의 잔디로 주로 사용되고 있다. 벤투그라스는 약 200여 종이 알려져 있고 그 중 크리핑 벤투그라스 (*Agrostis stolonifera* L.)가 상업적으로 가장 많이 이용되고 있다. 크리핑 벤투그라스 (Creeping bentgrass)는 물리적 자극 및 병해충 피해로부터 회복력이 높으며 개체의 균일성이 좋다. 이러한 장점 때문에 골프장에서 가장 중요한 퍼팅그린에 주로 쓰이는 잔디 초종이지만, 고온 건조에 약하여 여름철에는 생육이 부진하고 병해충에 노출될 위험이 높기 때문에 세밀한 관리를 필요로 하는 품종이다. 이와 같은 크리핑 벤투그라스의 단점은 전통 육종 방법에 의해 많은 개량이 이루어졌다. 1954년 펜실베이니아 대학에서 종자번식용 개량품종으로 'Penncross'가 개발된 이후 다수의 신품종이 개발되기 시작하여 내병성과 내건성을 가진 'Pennlinks', 여름에 강한 'Crenshaw', 내서성이 강한 'SR1020', 내한성이 강한 'SR1019', 엽폭이 좁고 밀도가 높은 'Penn-A-4, PennG-2', 내염성이 강한 'Seaside II' 등의 품종이 개발되어 현재 사용되고 있다 (양 2009). 이와 같이 형질이 개선된 신품종들이 개발되었지만, 여전히 다양한 환경 스트레스에 대한 내성이 증진된 우수한 품종의 개발이 요구되고 있다. 따라서 최근에는 개선할 수 있는 형질이 제한적이

고 개발까지 오랜 시간이 소요되는 전통 육종법 대신 식물형질전환 기법을 이용하여 우수한 형질을 부가하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

크리핑 벤투그라스의 형질전환은 particle bombardment법을 이용한 방법이 처음으로 보고되었고 (Zhong et al. 1993; Hartman et al. 1994), 이 후 protoplast를 분리하여 직접 주입하는 방법도 보고되었다 (Asano et al. 1998). Particle bombardment법과 protoplast법은 유전자의 일시 발현과 형질전환 효율이 낮은 식물에 효과적으로 이용될 수 있지만, multi copy 유전자의 도입, 후세대에 gene silencing 유발, 배양 중의 somaclonal variation이 생길 가능성이 높은 등의 문제점이 있다. 따라서 현재 크리핑 벤투그라스의 형질전환식물은 주로 *Agrobacterium*법을 이용해 개발되고 있다. *Agrobacterium*을 매개로 한 형질전환은 2000년에 처음 보고되었으며 (Yu et al. 2000), Penncross (Aswath et al. 2005; Kim et al. 2007), Crenshaw (Fu et al. 2007; Kim et al. 2007), Regent (Chai et al. 2003), Penn-A-4 (Luo et al. 2004) 등 크리핑 벤투그라스의 여러 품종에서 형질전환 효율을 높이기 위한 연구들이 지속적으로 이루어졌다. 도입된 주요 형질로는 제초제 저항성 (Yu et al. 2000; Chai et al. 2003; Luo et al. 2004; Kim et al. 2007) 이 가장 많았고, 내건성 및 내염성 (Aswath et al. 2005), 내병성 (Fu et al. 2005) 등이 있었다. 또, 이와 같은 형질 이외에도 관상용 가치를 높이기 위한 색변이 (Han et al. 2009) 유전자 등 고부가가치 형질을 도입한 연구들이 진행되고 있다. 한지형 잔디인 크리핑 벤투그라스는 여름철 특히 고온 건조한 조건, 고온 다습한 조건, 공기순환이 잘 안되는 그늘진 지역 등에서 생육 쇠퇴현상이 발생하여 잎의 노화가 진행되는데, 이런 복합적인 스트레스 조건하에서도 노화가 지연되는 잔디를 개발한다면 크리핑 벤투그라스의 경제적 가치는 훨씬 더 높아질 것으로 기대되고 있다.

식물의 노화는 내적 또는 외적 요인에 의해 발생하게 된다. 내적 요인으로는 식물 호르몬이 대표적이고 그 중 cytokinin은 노화를 지연시키는 호르몬으로 알려져 있으며 ethylene, salicylic acid, jasmonic acid 등은 노화를 촉진시키는 호르몬으로 알려져 있다. 노화에 영향을 끼치는 외적 요인으로는 건조, 염분, 광, 고온, 영양분 등이 알려져 있고 적절하지 않은 외적 요인은 식물에 스트레스로 작용하여 잎의 노화를 유도하게 된다. 최근, 이와 관련하여 노화가 지연되는 형

질 전환식물을 개발하기 위한 연구들이 활발하게 진행되고 있다. Cytokinin 생합성에 관여하는 *IPT (isopentenyl transferase)* 유전자나 그와 비슷한 기능을 하는 *knotted1* 유전자를 senescence-associated gene 프로모터인 SAG12 하에 발현시켜 노화가 지연된 형질 전환 식물을 획득한 보고들이 있고 (Jordi et al. 2000; McCabe et al. 2001; Lin et al. 2002; Robson et al. 2004; Luo et al. 2006; Xu et al. 2009; Ma et al. 2009), 건조, 염분, 광, 고온, 영양분 등 각종 스트레스와 관련된 유전자를 작물에 형질 전환하여 노화가 지연된 식물을 개발하고자 하는 연구들도 보고되고 있다 (Aswath et al. 2005; Husaini and Abdin. 2008; Hameed et al. 2008; Li et al. 2010). 또한 식물의 잎 노화에 관련된 유전자들이 어떻게 조절되는지를 해명하기 위하여 애기장대의 mutant line을 이용한 연구들이 진행되었으며 그 중 *ore1*, *ore3*, *ore4*, *ore9* 등 잎의 노화가 지연된 mutant들이 선발되었고, Lim (2007) 등은 애기장대의 Activation tagging line들에서 선발한 *oresara7-1D* line이 야생형 애기장대에 비해 잎의 노화가 2배 이상 지연되고 수확 후의 저장성도 개량된다고 보고하였다.

본 연구에서는 노화가 지연되는 특성을 보인 *oresara7-1D* line에서 분리한 *ORE7* 유전자 (Lim et al. 2007)를 크리핑 벤투그라스에 도입하여 잎의 노화가 지연된 형질 전환 식물의 개발을 목적으로 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료

1) 식물 재료

본 연구에서는 잔디 품종으로 크리핑 벤투그라스 (*Agrostis stolonifera* L. cv. Pennncross)를 사용하였다.

2) Callus 유도 및 증식

크리핑 벤투그라스 완숙종자의 종피를 제거하고, 99% ethanol에서 1분간 교반한 후 10 μ L의 tween20이 첨가된 5% sodium hypochlorite 용액에서 15분간 표면 살균하였다 (Toyama et al. 2003). 표면 살균된 종자를 무균 상태에서 멸균수로 5회 세척한 후 3% sucrose와 2 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에 치상하여 25°C, 암 조건에서 4주간 배양하였다. 종자로부터 유도된 callus는 잎과 뿌리부분을 핀셋으로 제거하고 callus 부분만을 채취하여 상기와 동일한 배지에 계대배양하였다. 2주 후 증식된 callus를 형질전환에 사용하였다 (Figure 3-A, B).

2. Binary vector 및 *Agrobacterium*

형질전환에 사용된 vector는 pCAMBIA3301-ORE7 (Figure 1)으로, binary vector인 pCAMBIA3301(www.cambia.org)을 *Bam*HI과 *Eco*RI으로 소화시킨 후 Ubiquitin promoter하에 *ORESARA7(ORE7)* 유전자를 삽입하여 구축하였다. pCAMBIA3301-ORE7은 T-DNA 내부에 선발 마커로서 비선택성 제초제 내성 유전자인 phosphinothricin acetyltransferase (*bar*) 유전자와 표지 마커인 intron- β -glucuronidase (*intron-gus*) 유전자를 포함하고 있다. *ORE7* 유전자를 삽입한 pCAMBIA3301-ORE7은 *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105에 도입하여 크리핑 벤투그라스의 형질전환에 사용하였다.

3. 크리핑 벤트그라스의 형질전환

형질전환에 사용한 배지조성과 형질전환 과정은 Table 1, 2와 Figure 2와 같다.

1) 전 배양 (Pre-culture)

Callus 증식배지에서 2주간 증식된 callus를 filter paper가 놓여진 전 배양배지에 치상하고 25°C, 암 조건에서 1주일간 배양하였다.

2) *Agrobacterium* 배양

pCAMBIA3301-*ORE7*이 도입되어 있는 *A. tumefaciens* EHA105를 kanamycin 50 mg/L가 첨가된 LB 액체배지에 넣고 OD₆₀₀=0.4-0.6 정도가 되도록 28°C에서 16-24 시간 배양하였다 (Figure 2-A).

3) *Agrobacterium* 감염 및 공동배양

LB 액체배지에서 증식된 *Agrobacterium*은 원심분리 (3000rpm, 15분)를 통하여 수집하였다 (Figure 2-B). 수집된 균을 20 mg/L acetosyringone (3,5-dimethoxy-4-hydroxy-acetophenone, Aldrich) 과 0.02% pluronic F68이 첨가된 감염배지 30 mL에 재현탁한 후 25°C, 110rpm에서 4시간 동안 활성화하였다 (Figure 2-C). 활성화된 *Agrobacterium* 현탁액에 10 g의 callus를 침적시켜 25°C, 110rpm에서 24시간 동안 감염시켰다 (Figure 2-D). 감염한 callus를 멸균된 filter paper에 올려 과잉의 수분을 제거 한 후, filter paper가 깔린 공동배양 배지에 치상하여 25°C, 암 조건에서 3일간 공동배양 하였다 (Figure 2-E).

4) *Agrobacterium* 제거

공동 배양된 callus로부터 *Agrobacterium* 을 제거하기 위하여 그물망에 callus를 올려놓고 멸균수로 투명해질 때까지 세정하였다 (Figure 2-F). 세정 마지막 단계에서는 500 mg/L cefotaxime이 첨가된 멸균수로 1회 세정한 후 filter paper에 놓고 여분의 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 callus는 균제거 배지에 치상하고 25°C, 암 조건에서 7-10일간 배양하였다.

5) 형질전환 식물체 선발

형질전환 식물체는 1차, 2차에 걸쳐 선발하였다. 1차 선발은 3 mg/L phosphinothricin (PPT) 이 첨가된 shoot 유도 배지에 callus를 치상하여 지상부를 유도한 후 25℃, 광 조건에서 8-10주 동안 2-3주 간격으로 계대배양하여 선발하였다. 그 후 선발된 지상부를 5 mg/L phosphinothricin (PPT) 이 첨가된 상기와 동일한 배지에 치상하여 동일한 조건으로 2차 선발하였다. 선발된 지상부는 1 mg/L phosphinothricin (PPT) 이 첨가된 root 유도배지에 치상하여 충분한 신장을 유도하였다. 신장한 식물체는 유전자도입 유무를 확인한 후 토양에 이식하여 온실에서 재배, 증식하였다.

4. 형질전환 식물체의 유전자 도입 및 발현 분석

1) PAT 단백질의 확인

Trait LL Test Strips는 형질전환 식물조직내의 PAT 단백질 존재 유무를 간단하게 확인 할 수 있는 kit로 그 원리는 다음과 같다. Strip membrane의 하부에는 PAT 단백질 특이적인 항체에 붉은색의 색소를 연결시킨 항체-색소 복합체가 결합되어 있다. 이 strip을 PAT 단백질이 발현된 식물조직의 추출물에 넣으면, 항체-색소 복합체의 일부는 PAT 단백질과 결합하여 sandwich를 형성하게 되고 또 다른 일부는 PAT 단백질과 결합하지 않은 형태로 존재하게 된다. Strip membrane의 상부에는 흡수 pad가 있고 그 아랫부분에는 두 개의 capture zone이 있는데, 한 개의 capture zone은 PAT 단백질과 결합하고 다른 capture zone은 색소와 결합하게 된다. 따라서 *bar* 유전자가 도입되지 않은 야생형 잔디에서는 control line에서 한개의 band만 검출되고 *bar* 유전자가 도입된 형질전환 식물체에서는 control line과 PAT test line에서 두개의 band가 검출된다. 1.5 mL 튜브에 약 0.1 g의 야생형 잔디와 형질전환 후보체의 잎을 잘라 넣고, 0.5 mL의 증류수를 첨가한 후 PELLET PESTLE (Sigma, USA)을 이용하여 잎 조직을 파쇄하였다. 각각의 샘플 튜브에 Test Strip을 넣고 5분간 반응시킨 후 PAT 단백질을 확인하였다.

2) Genomic DNA 추출

야생형 잔디 및 형질전환 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 CTAB법 (Murray and Thomson, 1980)에 따라 추출하였다. 잎 조직 약 0.15 g을 액체 질소로 동결 분쇄시킨 후 700 μ L의 추출 buffer (2 \times CTAB buffer)를 넣고 잘 혼합하여 1시간 동안 65 $^{\circ}$ C에 정치하였다. 여기에 700 μ L의 Chloroform/isoamylalcohol (24:1) 용액을 첨가하여 약 10분간 잘 교반한 후, 원심분리 (15000rpm, 20분)하여 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액에 500 μ L의 isopropanol을 첨가하고 -20 $^{\circ}$ C에 30분 이상 정치한 후 원심분리 (15000rpm, 20분)하여 DNA를 침전시켰다. 추출된 DNA를 70% ethanol로 세정한 후 원심분리 (15000rpm, 20분)를 통해 침전물을 회수하였다. DNA pellet은 100 μ L의 멸균된 증류수에 용해한 다음 μ L당 1 μ g이 되도록 농도를 조정한 후 PCR 및 Southern blot 분석에 사용하였다.

3) PCR analysis

Trait LL Test Strips을 이용하여 PAT 단백질이 확인된 형질전환 식물체를 대상으로 목적유전자의 도입유무를 확인하기 위하여 genomic-PCR을 수행하였다. Genomic-PCR 분석에는 *ORE7* 특이적 프라이머 세트 5'-GGATCCATGGAAGGCGGTTACGAG-3' (*ore7* forward), 5'-GAGCTCTTAAAAAGGTGGTCTTGAAGGTG-3' (*ore7* reverse)와 *VirC* 특이적 프라이머 세트 5'-ATCATTTGTAGCGACT-3' (*virC* forward), 5'-AGCTCAAACCTGCTTC-3' (*virC* reverse)를 사용하였다. 2.5 mL dNTP 2 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, 10 pmol primer forward 1 μ L, 10 pmol primer reverse 1 μ L, 5 unit/ μ L의 Ex prime Tag 0.2 μ L (Genethio, Korea), genomic DNA 1 μ L (1 μ g/ μ L), 멸균된 증류수 12.8 μ L를 혼합하여 PCR을 수행하였다. *ORE7* 유전자를 증폭시키기 위한 PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denaturation 후, denaturation 94 $^{\circ}$ C 30초, annealing 58 $^{\circ}$ C 30초, extension 72 $^{\circ}$ C 1분의 조건에서 35 cycle을 수행하였다. 그 후 post elongation은 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 반응시켰다. *VirC* 유전자를 증폭시키기 위한 PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 4분간 pre-denaturation 후, denaturation 94 $^{\circ}$ C 1분, annealing 59 $^{\circ}$ C 1분, extension 72 $^{\circ}$ C 90초에서 30 cycle을 반응시키고

post elongation은 72°C에서 5분간 수행하였다. PCR 산물은 EtBr이 포함된 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

4) Southern blot 분석

야생형 잔디 및 형질전환 식물체에서 추출한 genomic DNA 중 20 µg의 genomic DNA를 사용하여 Southern blot 분석을 수행하였다. Genomic DNA를 *Hind*III (Takara, Japan)로 37°C에서 24시간 동안 처리한 후 그 분해산물을 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 (50V, 4시간) 분리하였다. 그 gel을 EtBr 용액에 염색하고 UV light에서 DNA를 확인한 다음, 0.25 M HCl 용액에서 15분, 변성용액 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)에서 15분씩 2회, 중화용액 (0.5 M tris-HCl, pH 7.5, 1.5 M NaCl)에서 15분씩 2회 처리 한 후 20×SSC (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0) 버퍼에서 10분간 평형화하였다. 그 후 20×SSC 버퍼를 사용하여 나일론 membrane (Biodyne A membrane, USA)에 트랜스퍼하였다. 약 15시간 동안 트랜스퍼를 수행한 후 membrane을 baking (80°C, 2시간)하여 DNA를 고정하였다. DNA가 고정된 membrane을 High-SDS buffer (50% formamide, 5×SSC, 50 mM sodium phosphate pH 7.0, 2% blocking reagent, 0.1% N-lauroylsarcosine)에서 pre-hybridization (45°C, 1시간)한 후, hybridization 용액 (High-SDS buffer에 DIG-labeled *ORE7* probe 20 µL를 첨가)을 넣고 45°C에서 약 15시간 동안 반응시켰다. Hybridization 종료 후 membrane은 2×wash buffer (2×SSC, 0.1% SDS)에서 5분씩 2회, 0.1×wash buffer (0.1×SSC, 0.1% SDS)에서 15분씩 2회 세척하였다 (65°C). 그 후 2% blocking solution에서 2시간 blocking하고, blocking buffer에 anti-Digoxigenin-AP를 10,000배 희석한 항체용액에서 30분간 반응시켰다. 항체와 반응시킨 membrane을 washing buffer (0.15 M NaCl, 0.1 M Maleic acid, 0.3% Tween 20, pH 7.5)로 세척 (2×15분)하고 detection buffer (0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, pH 9.5)에서 5분간 평형화하였다. Membrane위에 CDP-star (GE Healthcare RPN3682)가 고루 퍼지게 처리하고, 5분간 반응시켜 LAS-4000 을 사용하여 시그널을 검출하였다.

5) Total RNA 추출

Total RNA의 추출은 야생형 잔디와 형질전환 식물체의 잎을 0.1 g 취하여 잎 조직이 해동되지 않도록 액체 질소로 즉시 동결 건조하여 분쇄한 후, Invitrogen 사 (USA)의 protocol 방법에 따라 수행하였다. 분쇄한 시료에 Trizol 1 mL을 첨가하여 vortex하고 상온에서 10 분간 방치한 후, 원심분리 (12000 g, 4 °C, 10분) 하였다. 상층액을 회수하여 chloroform 200 µL를 첨가하고 상온에서 3 분간 방치한 후, 원심분리 (12000 g, 4 °C, 10분) 하였다. 상층액을 다시 회수하여 Isopropanol 500 µL를 첨가하고 상온에서 10 분간 방치한 후, 원심분리 (12000 g, 4 °C, 10분) 하였다. 상층액을 버리고, 75 % ethanol 1 mL을 첨가한 후, 원심분리(7500 g, 4 °C, 5분)를 하였다. 건조시킨 침전물은 DEPC-water 50 µL에 pellet을 용해하여 각 샘플당 약 20 µg의 RNA를 획득하였다.

6) RT-PCR

추출된 RNA는 1% agarose gel에 1 µg을 전기영동하여 확인하였다. 그리고 2 µg의 total RNA, 0.5 µg primer, M-MLV 5×reaction buffer, 10 mM dNTP, 25 unit Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor, 200 unit M-MLV RT, DEPC solution으로 cDNA (Promega M-MLV Reverse Transcriptase)를 합성하였다. 합성한 cDNA를 template로 *ORE7* 특이적 프라이머 세트를 사용하여 RT-PCR을 수행했다. Standard control로는 벼 유래의 *actin* 프라이머 세트를 사용하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 pre-denaturation 후, denaturation 94°C 30초, annealing 55°C 30초, extension 72°C 1분에서 30 cycle을 수행하였다. PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

5. 형질전환 식물의 특성 분석

ORE7 유전자가 도입된 형질전환 식물이 노화를 유도한 조건에서 어떤 특성을 보이는지를 확인하기 위해, 야생형 잔디와 형질전환 식물의 잎 절편에 암과 염분 스트레스를 처리하고 그 변화를 분석하였다.

1) 암 조건에서 형질전환 식물의 특성 분석

토양에 순화하여 증식한 야생형 잔디와 *ORE7* 형질전환 식물의 잎을 약 2 cm 길이로 잘라 3 mM MES 용액에 담근 후 25°C, 암 조건에 처리하였다. 예비실험을 통해 시간경과에 따른 잎의 형태를 관찰하였고 외형적인 변화가 관찰되는 2, 4, 7, 10, 15일째의 변화를 조사하였으며, 동시에 클로로필 함량 및 광합성 효율을 측정하였다. 클로로필 함량은 Porra (1989)의 방법을 약간 변형하여 측정, 계산하였으며 과정은 다음과 같다. 암 조건에서 외형적인 변화가 관찰되는 시기인 2, 4, 7, 10일째의 잎을 취하여 분쇄한 후 1 mL의 추출버퍼 (2.5 mM sodium phosphate buffer containing 80% acetone)를 넣고 4°C, 암 조건에서 이틀간 처리하였다. 처리한 샘플을 원심분리하여 상층액을 회수한 후, 647 nm와 664 nm에서의 흡광도를 측정하여 클로로필 함량을 계산하였다. 광합성 효율은 암조건 처리 후 0, 4, 8일째의 샘플을 Plant Efficiency Analyzer (Hansatech Instruments, England-원리)를 사용하여 측정하였다. 엽록소의 형광 (chlorophyll fluorescence)은 각 광합성 기작이나 물질에 따라 그 방출량이 다르므로 광합성과정의 지표로서의 기능을 가진다. 빛에너지를 받아들이는 색소인 엽록소들은 빛 에너지를 흡수하면서 불안정한 상태가 되고, 열을 방출하거나 형광을 내는 방법으로 에너지를 전달한다. 엽록소의 색소들이 발할 수 있는 총 형광량의 최대값을 F_m (fluorescence maximum)이라 하고, 암순응에 의해 모든 광화학시스템II 반응센터와 전자 어셉터분자가 완전히 산화되어 광화학반응에 사용될 수 있는 상태가 되었을 때의 형광수량을 F_o (fluorescence origin)라 할 때 이 값을 이용하여 광합성 효율을 측정하게 된다. 암 처리한 잎 절편의 광합성 효율은 다음과 같은 원리에 의해 측정하여 계산하였다. 먼저 잎 절편을 암상태에 두어 (암순응, 30 min) 모든 광에 의한 반응을 멈추게 한 후 F_o 값을 측정하고, 이 샘플을 강한 포화 펄스 광에 노출시킨 후 F_m 값을 측정하였다. 강한 광에 노출시키면, 모든 광화학 시스템II 전자어셉터가 환원되어 그 샘플에서 최대의 형광이 나오게 된다. F_o 와 F_m 형광수량의 차는 그 샘플이 소비하는 광화학에너지에 대한 최대능력에 비례하고 가변형광 (F_v , variable fluorescence)으로 정의된다. 광합성 효율은 F_v/F_m 의 식을 이용하여 계산하였다 (Alberdi et al. 2009).

2) 엽분 스트레스 조건에서 형질전환 식물의 특성 분석

토양에 순화하여 증식한 야생형 잔디와 ORE7 형질전환 식물체의 잎을 약 1.5 cm 잘라 각각 0, 100, 200, 300 mM의 NaCl이 첨가된 증류수에 침지시킨 후 25°C, 장일조건 (16 h light/8 h dark)하에서 하루 간격으로 잎의 변화를 관찰하였다.



III. 결과 및 고찰

1. 크리핑 벤트그라스의 형질전환

감염, 공동배양, 균제거 과정을 거친 callus를 3 mg/L PPT가 포함된 재분화 배지에서 선발한 결과, 약 5주 후에 PPT에 저항성을 보이는 callus가 관찰되었고 (Figure 3-C) 이러한 callus로부터 지상부가 형성되었다. 3 cm 이상 성장한 지상부 (Figure 3-D)를 5 mg/L PPT가 포함된 재분화 배지로 옮겨 배양한 후, 이 배지에서 왕성한 성장을 보이는 지상부를 1 mg/L PPT가 첨가된 root 유도배지로 옮겨 형질전환 후보체를 선발하였다 (Figure 3-E). 선발된 형질전환 후보체는 순화 후 포트에 심어 증식시켰다 (Figure 3-F).

2. 형질전환 식물체의 유전자 도입 및 발현 분석

선발한 형질전환 후보체에서 total soluble 단백질 및 genomic DNA를 추출하여 유전자의 도입여부를 확인하였다. 먼저, Trait LL Test Strips (Strategic Diagnostics Inc.) 을 이용하여 선발마커로 사용된 *bar* gene의 발현산물인 PAT 단백질의 발현여부를 평가하여 형질전환 식물체를 screening한 후 genomic-PCR을 통해 *ORE7* 유전자의 삽입여부를 확인하였다. 유전자의 도입이 확인된 형질전환 식물체는 목적유전자의 copy 수와 발현확인을 위해 Southern blot과 RT-PCR 분석을 수행하였다.

1) PAT 단백질 확인 및 genomic-PCR

야생형 잔디와 형질전환 후보체를 Trait LL Test Strip을 이용하여 분석한 결과, 형질전환 후보체들에서 각각 두 개의 band가 검출되었고 야생형 잔디에서는 한 개의 band만 검출되었다 (Figure 4-A). 이 결과에서 분석에 이용한 형질전환 식물체들은 형질전환시 선발마커로 사용된 *bar* 유전자가 단백질 수준에서 성공적으로 발현하고 있음을 확인할 수 있었다. *Bar* 유전자가 도입된 형질전환 식물체에서 Trait LL Test Strip을 이용한 PAT 단백질의 검출은 이미 벤트그라스에

서 보고된 것과 같이 (Watrud et al. 2004; Zapiola et al. 2008) 형질전환체의 빠른 판별에 효과적임을 알 수 있었다.

PAT 단백질의 발현이 확인된 식물체에 목적유전자가 도입되었는지를 확인하기 위해 genomic-PCR을 수행하였다. *ORE7* 특이적 프라이머를 이용하여 PCR 분석을 실시한 결과, 야생형 잔디에서는 band가 확인되지 않았으나, 형질전환 식물체들에서는 0.9kb 크기의 *ORE7* band를 확인 할 수 있었다 (Figure 4-B). *Agrobacterium*법에 의해 제작된 형질전환 식물체의 경우 목적유전자가 식물염색체에 도입되지 않았더라도 PCR에서 목적유전자의 band가 검출되기도 하는데 (Ogawa and Mii. 2007) 이는 형질전환시 사용한 *Agrobacterium*의 잔존에 의한 영향으로 알려져 있다. 따라서 본 실험의 genomic-PCR 결과가 *Agrobacterium*의 잔존에 의한 것이라는 가능성을 배제하기 위해 *VirC* 특이적 프라이머를 이용하여 PCR 분석을 실시하였다. 그 결과 positive control인 *Agrobacterium*에서는 0.73kb 크기의 band가 확인되었으나, 야생형 잔디와 형질전환 식물체에서는 아무런 band도 확인되지 않았다.

이들 결과로부터 형질전환 벤투그라스에는 목적유전자가 안정적으로 도입되었다는 것을 확인할 수 있었으며, Trait LL Test Strip을 이용한 형질전환 식물체의 screening은 *bar*유전자를 선발마커로 한 형질전환에서 매우 유용하게 사용될 수 있음을 확인 할 수 있었다.

2) Southern blot 분석

HindIII 로 소화한 20 µg의 genomic DNA를 *ORE7* probe로 hybridization하여 Southern blot 분석을 수행한 결과, 야생형 잔디에서는 band가 검출되지 않았으나 형질전환 식물체 line들에서는 1개 이상의 band가 검출되었다 (Figure 5). 형질전환 식물체 line 1은 약 9kb 크기에서 한 개의 band가 검출되어 1 copy의 유전자가 도입된 것으로 확인되었고, 형질전환 식물체 line 2와 line 3은 9kb 이상의 서로 다른 위치에서 두 개의 band가 검출된 것으로 보아 이들 line은 2 copy의 유전자가 도입된 것으로 판단된다. 이들 결과에서, 유전자가 도입된 위치와 도입 유전자의 copy수가 다른 3개체의 독립된 형질전환 식물체 계통이 확보되었음이 확인되었다. 1 copy의 유전자가 도입된 형질전환 식물체를 *ORE7*-1, 2

copy의 유전자가 도입된 형질전환 식물체들을 각각 ORE7-2, ORE7-3 이라 명명하였고 이후의 분석에 사용하였다.

3) RT-PCR

Southern blot 분석에서 유전자의 도입이 확인된 두 개의 독립된의 형질전환 식물체에서 *ORE7* 유전자의 발현 여부를 조사하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 야생형 잔디에서는 *ORE7* 유전자가 발현되지 않았으며 ORE7-1, ORE7-2에서는 *ORE7* 유전자가 발현되고 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 6). RT-PCR 결과의 band intensity에서 ORE7-1 이 ORE7-2 보다 강한 발현을 하고 있는 것으로 생각되며 발현량의 정량적인 비교를 위해서는 Real-time PCR을 통한 분석 등이 필요할 것으로 판단된다.

3. 형질전환 식물의 특성 분석

1) 암 조건에서 형질전환 식물의 특성 분석

암 조건은 수확 후 식물의 노화를 촉진시키는 환경자극의 하나로 (Weaver and Amasino. 2001; Mishev et al. 2009) 알려져 있기 때문에, 식물의 노화연구에서 생리적 특성을 검증하는데 많이 이용되고 있다. 따라서, 본 실험에서는 형질전환 크리핑 벤투그라스의 잎 절편을 암 조건에 처리하고 그 변화를 관찰하였다. 그 결과, 야생형 식물은 처리 후 4일째부터 잎 절편의 노화가 관찰되었으며, 10일째에 잎 절편 전체가 노화되었다. 이와 대조적으로 형질전환 식물은 처리 후 10일째에 약간의 노화가 관찰되기는 하였으나 잎 절편의 대부분에서 녹기를 유지하고 있었으며, 20일째에 완전한 노화가 관찰 되었다 (Figure 7). 형질전환 식물이 야생형 식물에 비해 약 2배정도 노화가 지연된 것으로 나타난 이 결과는 애기장대의 *ORE7/ore7-1D* mutant가 보인 노화지연 효과와 비슷하였고 (Lim et al. 2007) 'stay green' 유전자가 도입된 벼 (Jiang et al. 2007) 의 녹기연장 효과와도 비슷하였다.

형질전환 크리핑 벤투그라스가 나타낸 외형적인 변화를 보다 정량적으로 분석하기 위하여, 클로로필 함량과 광합성 효율을 측정하였다. 클로로필 함량을 관찰

한 결과, 야생형 식물의 경우 처리 후 10일째에 20% 수준으로 감소하였으나 형질전환 식물에 있어서는 약 70% 수준의 클로로필이 남아 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 8). 광합성 효율을 측정된 결과, 야생형 식물에서는 4일째에 광합성 효율이 20% 정도로 급감하였으며 8일째에는 20% 이하의 효율을 나타냈다. 그러나 형질전환 식물의 경우 4일째에 90%의 효율을 보였으며 8일째에도 90%에 가까운 광합성 효율을 유지하고 있었다 (Figure 9). 이들 결과에서, *ORE7* 유전자가 도입된 형질전환 크리핑 벤토그라스는 야생형 식물에 비해 최소 2배 이상 노화가 지연되었음을 확인할 수 있었다.

2) 염분 스트레스 조건에서 형질전환 식물의 특성 분석

다양한 농도의 염분 스트레스 조건에서 야생형 식물과 형질전환 식물의 변화를 분석한 결과, 야생형 식물은 처리 후 3일째에 100, 200, 300 mM의 NaCl 처리구에서 노화가 시작되었으며, 6일째에는 모든 처리구에서 완전히 노화되었다 (Figure 10). 반면, 형질전환 식물에서는 처리 후 3일째까지 변화가 없었고, 6일째에 100, 200, 300 mM NaCl 농도에서 노화가 시작되었다. 또한 처리 후 8일째에도 녹기가 남아 있는 잎 절편이 관찰되었다 (Figure 10). 이 결과들로부터, *ORE7* 유전자를 도입한 형질전환 식물은 야생형 식물에 비해 염분 스트레스 조건에서도 노화가 지연됨이 확인되었다. 염이 잎 노화에 영향을 주는 외부적 요인이라는 것은 딸기 (Husaini and Abdin 2008), 밀 (Hameed et al. 2008), 벼 (Lutts et al. 1996), 벤토그라스 (Aswath et al. 2005; Li et al. 2010) 등 다양한 식물 종에서 확인되었고, 매년 일정 비율의 토양이 염분에 노출되고 있는 현상 때문에 내염성 식물의 개발은 전 세계적으로 중요한 이슈가 되고 있다 (Munns. 2002). 따라서 염분에 저항성을 지니는 잔디를 개발한다면 염분 피해가 확산되고 있는 지역의 녹화에 도움이 될 것으로 기대된다.

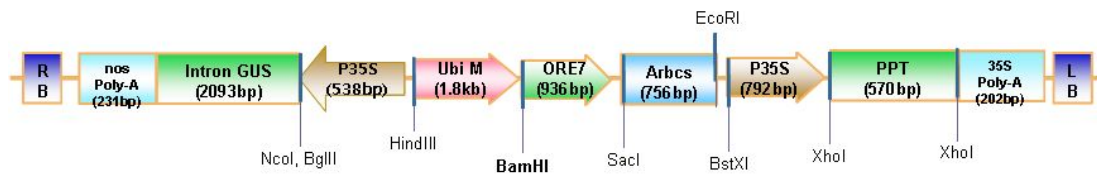


Figure 1. Map of the T-DNA region of the binary vector pCAMBIA 3301-*ORE7*. RB, right border of T-DNA; LB, left border of T-DNA; P35S, CaMV 35S promoter; UbiM, Ubiquitin promoter; GUS, β -glucuronidase gene; PPT, phosphinotricin acetyltransferase gene; 35S poly-A, CaMV 35S terminator; nos poly-A, nopaline synthase gene terminator; Arbcs, *Arbcs* gene terminator.

Table 1. Media used in the genetic transformation of creeping bentgrass

캘러스 유도배지 (Callus induction)	MS salts and vitamins (MS), 3% sucrose, 2 mg/L 2,4-D, 0.3% gellan gum, pH 5.8
캘러스 증식배지 (Callus growth)	MS, 3% sucrose, 2 mg/L 2,4-D, 0.3% gellan gum, pH 5.8
전 배양배지 (Pre-culture)	MS, 3% sucrose, 2 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L kinetin, 0.3% gellan gum, pH 5.8
균 배양배지 (LB)	NaCl 10 g/L, Tryptone 10 g/L, Yeast extract 5 g/L, pH 7
균 현탁배지 (<i>Agrobacterium</i> resuspension)	1/2MS, 2% sucrose, 1% glucose, 1 g/L MES, 20 mg/L acetosyringone, 0.02% pluronic F68, pH 5.2
공동배양배지 (Co-culture)	1/2MS, 2% sucrose, 1% glucose, 1 g/L MES, 50 mg/L acetosyringone, 0.3% gellan gum, pH 5.8
균 제거배지 (<i>Agrobacterium</i> elimination)	Callus induction media, 250 mg/L cefotaxime
Shoot 유도배지 (Shoot induction)	MS, 3% maltose, 1 mg/L BA, 0.3% gellan gum, pH 5.8, 3-5 mg/L PPT, 250 mg/L cefotaxime
Root 유도배지 (Root induction)	1/2MS, 1.5% sucrose, 0.3% gellan gum, pH 5.8 1 mg/L PPT, 250 mg/L cefotaxime

Table 2. Optimum conditions for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of creeping bentgrass.

전 배양 (Pre-cultivation)	새로운 배지에 Embryogenic Callus 배양 25°C, 암배양, 1주일
감염 및 공동배양 (Infection & Co-cultivation)	<i>Agrobacterium</i> Final OD ₆₀₀ =0.4-0.6 균을 AS 20 mg/L, F68 0.02% 첨가된 감염배지에 현탁 후 활성화 (4h) +callus 1d, 110rpm shaking 25°C ->공동배양, 암배양, 3일
균 제거 (Elimination)	멸균수로 세정, 마지막 세정은 500 mg/L Cefotaxime, 25°C, 암배양, 7-10일
Shoot 유도 (Shoot induction)	3-5 mg/L PPT가 포함된 Shoot 유도배지에서 8-10주간 2주 간격으로 계대배양, 명배양
Root 유도 (Root induction)	1 mg/L PPT가 포함된 Root 유도배지에서 충분히 신장, 명배양

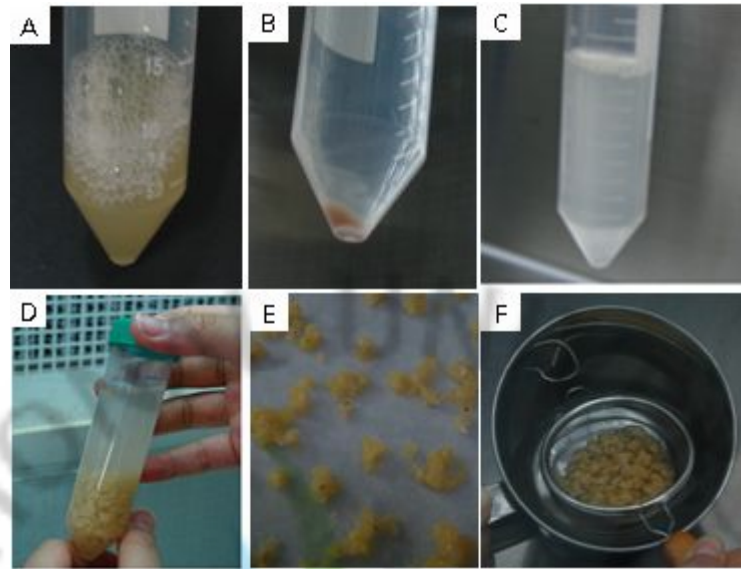


Figure 2. Procedure of *Agrobacterium*-infection to creeping bentgrass.

A, Cultured *Agrobacterium*; B, Sedimented *Agrobacterium* cells by centrifugation; C, Mixing of *Agrobacterium* resuspension media after pre-incubation for 4 hours; D, Co-cultivated with calli 1 day in dark condition; E, Transfer to solid co-culture media 3 days in dark condition; F, *Agrobacterium* elimination

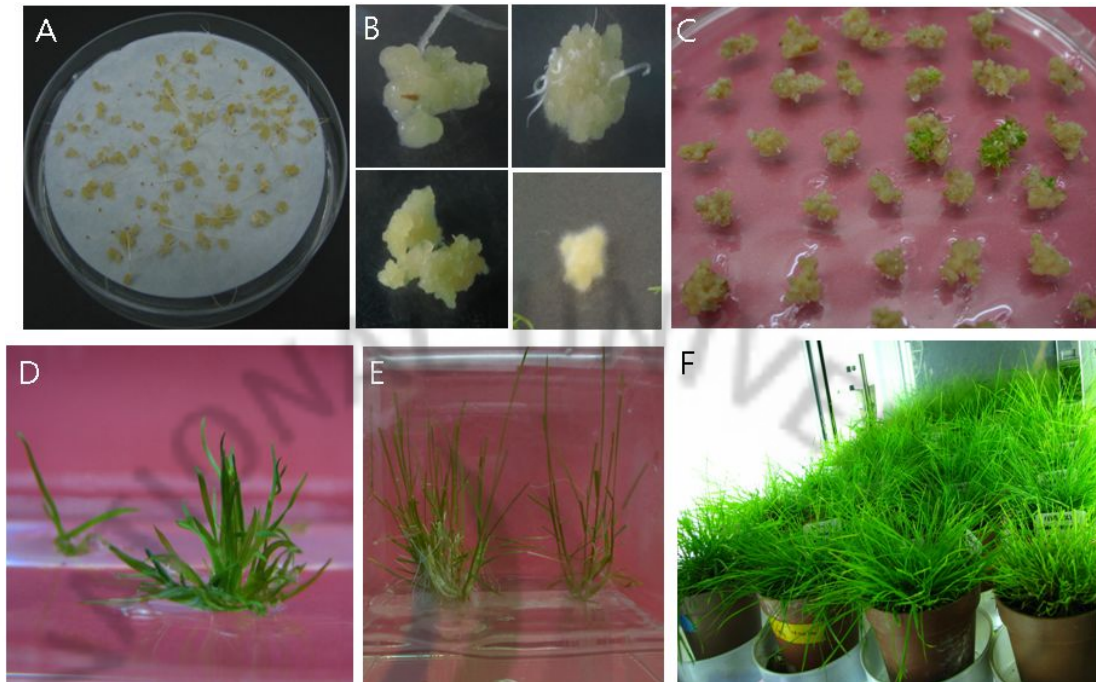


Figure 3. Production of transgenic creeping bentgrass.

A-B, Embryogenic callus induced from mature seeds on callus induction media; C, PPT-resistant calli during selection with 3 mg/L PPT; D, Shoot formation of PPT-resistant calli during selection with 5 mg/L PPT; E, Rooted transgenic plantlets selected with 1 mg/L PPT; F, Potted transgenic creeping bentgrass grown in the soil.

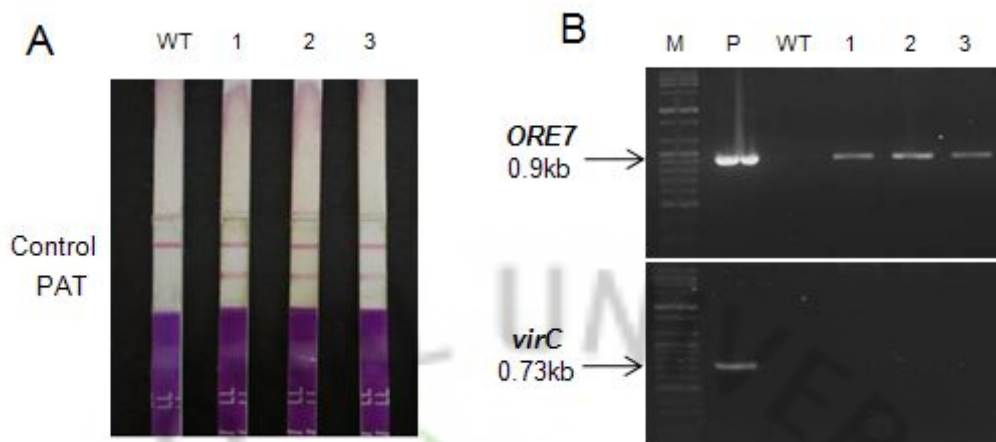


Figure 4. Screening of putative transgenic plants by PAT protein detection and genomic-PCR.

A, PAT protein detection of 3 selected PPT resistant plants; B, PCR analysis of putative transgenic bentgrass. P, pCAMBIA3301-*ORE7*; WT, untransformed plant; 1-3, selected regenerated creeping bentgrass. Arrows indicate the expected *ORE7* and *VirC* bands.

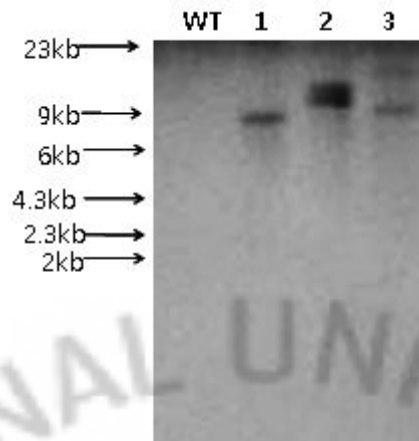


Figure 5. Southern blot analysis of transgenic bentgrass with *ORE7* probe.

DNA samples (20 μ g) from transformants 1-3 and an wild type plant (WT) were digested with *Hind*III, fractionated by electrophoresis in 0.8% agarose gel, transferred to a nylon membrane, and hybridized with DIG-labeled *ORE7* probe. The size markers are indicated at left.

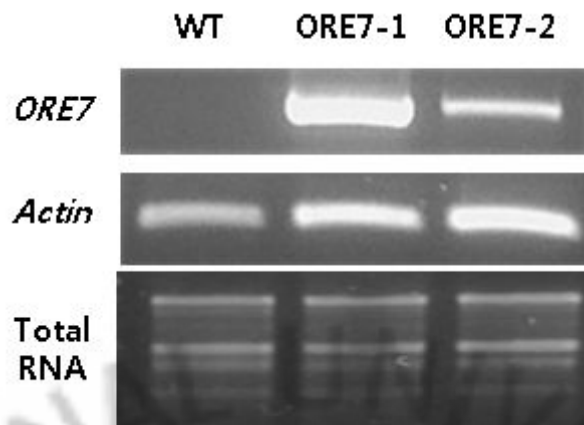


Figure 6. Expression of the *ORE7* gene

Expression of the gene was assayed by RT-PCR using total RNA isolated from leaf. WT, Wild type plant; ORE7-1, ORE7-2, transgenic plants.

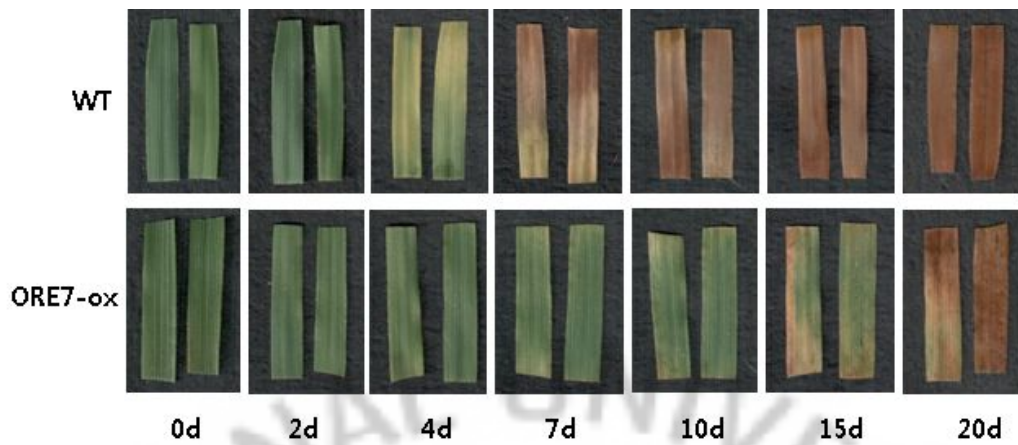
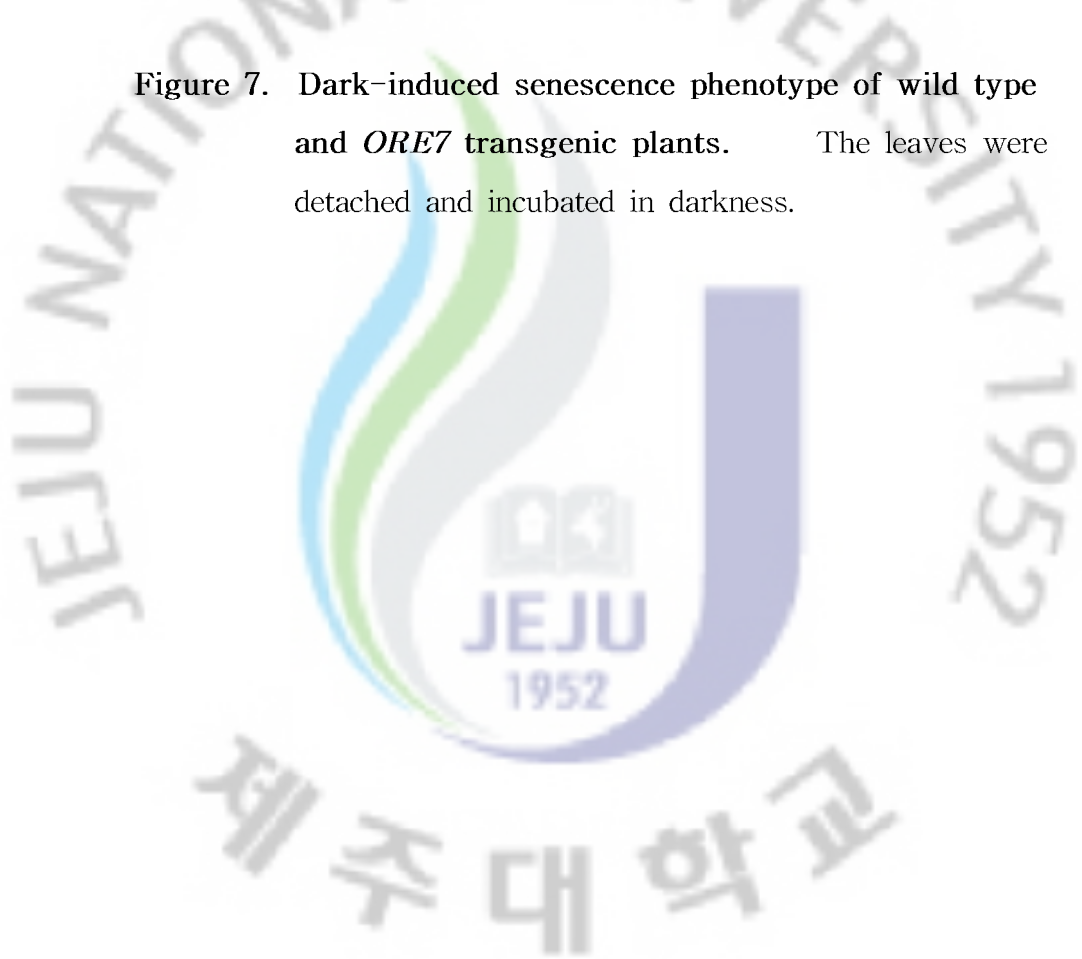


Figure 7. Dark-induced senescence phenotype of wild type and *ORE7* transgenic plants. The leaves were detached and incubated in darkness.



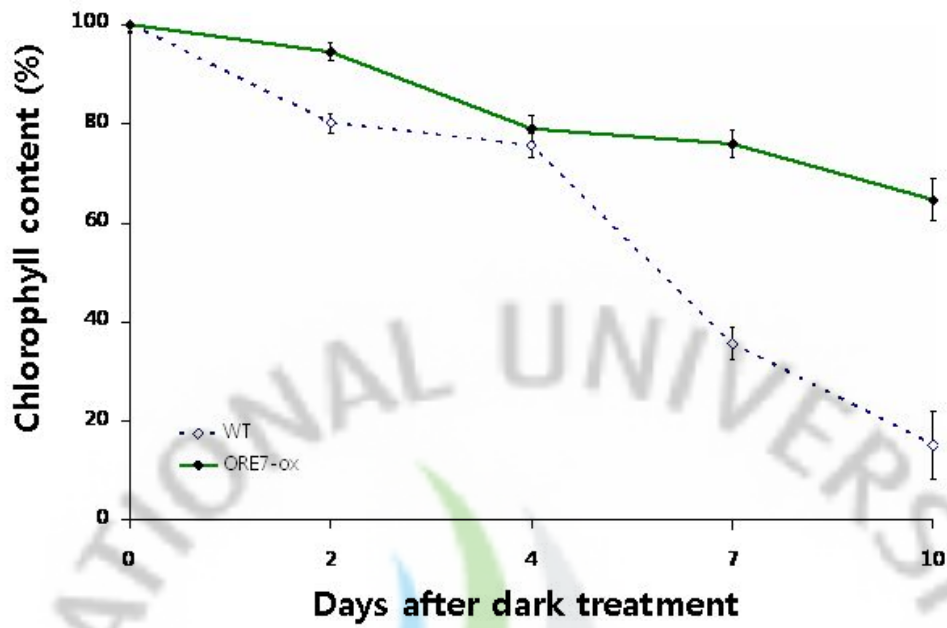


Figure 8. The chlorophyll contents were measured during the dark induced leaf senescence of wild type and *ORE7* transgenic plant.

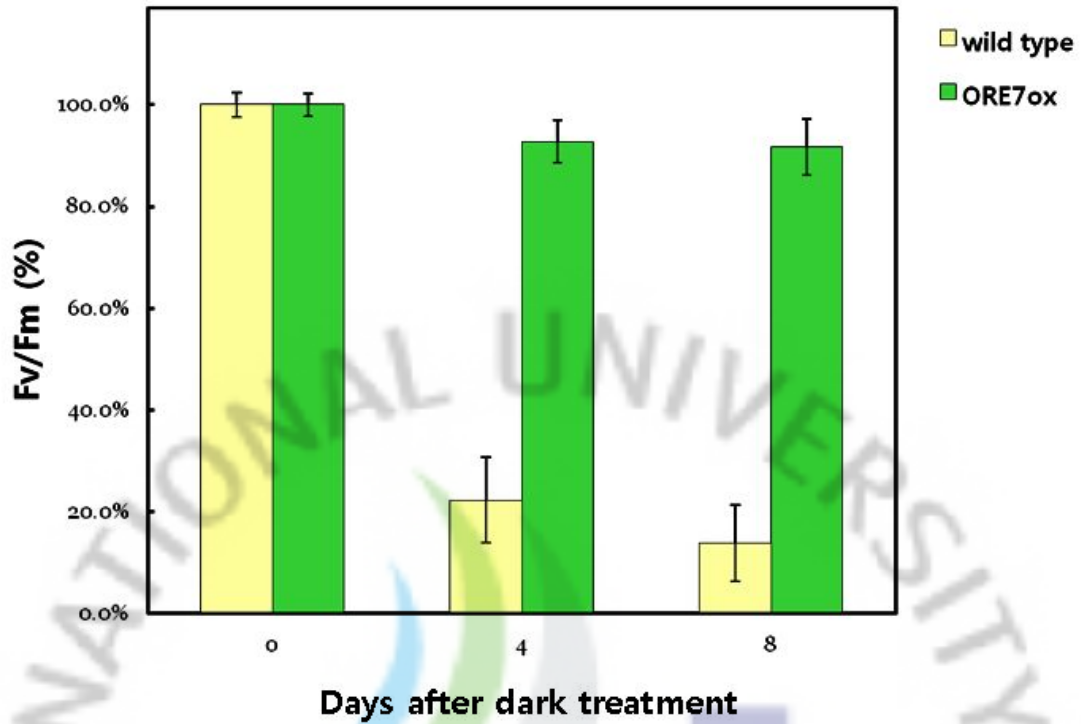


Figure 9. The photochemical efficiency were measured during the dark-induced leaf senescence of wild type and *ORE7* transgenic plant.

Photochemical efficiency (F_v/F_m) of PSII was examined every four days.

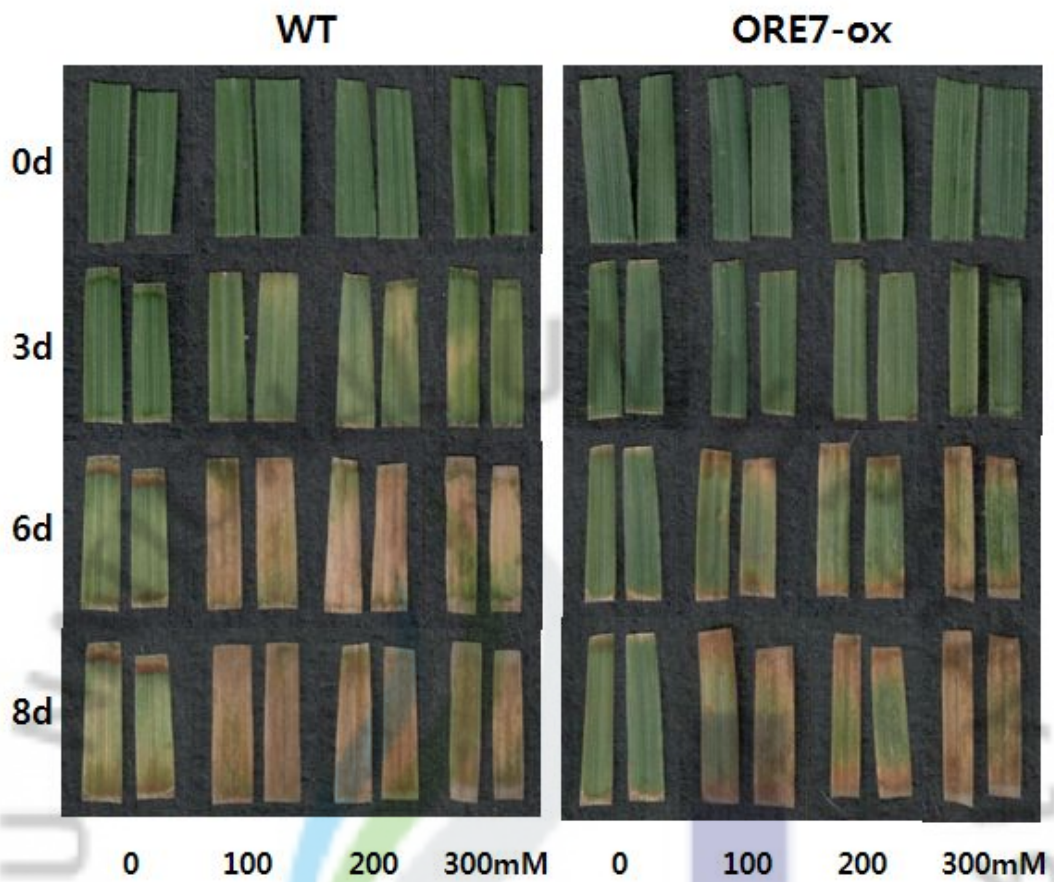


Figure 10. Salt-induced senescence phenotype of wild type and *ORE7* transgenic plant.

IV. 종합고찰

벤트그라스의 형질전환 식물체는 particle bombardment법을 이용하여 최초로 성공하였다 (Zhong et al. 1993). 그 후, 페레니얼 그라스, 들잔디, 라이그라스 등 여러 잔디 품종에서 protoplast법, *Agrobacterium*법을 이용하여 형질전환체가 개발되었다.

본 연구에서는 *Agrobacterium*을 매개로 크리핑 벤트그라스에 *ORE7* 유전자를 도입하여 노화가 지연되는 형질전환 잔디를 개발하였다. Independent가 확인되지 않은 총 17개의 형질전환 후보체를 선발하였으며 Southern blot 분석을 통해 independent인 3개의 형질전환 식물체를 획득하였다. 이는 실제 크리핑 벤트그라스의 callus에서 shoot를 유도하면 multiple shoot가 유도가 되며, 또한 형질전환 과정 중 부스러지기 쉬운 embryogenic callus에 의한 영향일 것이라고 판단된다. 본 연구에서 개발된 크리핑 벤트그라스는 제초제 저항성 (*bar*) 유전자와 노화지연 유전자 (*ORE7*)가 도입되어 있기 때문에, 비선택성 제초제에 저항성을 가짐과 동시에 암 조건과 염분 스트레스 조건에서 노화가 지연되는 특성을 보여주었다. *ORE7* 형질전환 식물은 노화를 촉진하는 암 조건에서 야생형 식물에 비해 두배 이상 녹기를 유지하였고, 염분 스트레스 조건에서 야생형 식물에 비해 염분에 저항성을 지니는 것으로 확인되었다. 이들 결과로부터 *ORE7* 유전자가 도입된 형질전환 벤트그라스는 무생물적 스트레스 하에서 야생형 식물보다 긴 수명을 가질 수 있음이 시사되었다. 벤트그라스의 노화지연에 관련된 연구에는 건조 (Aswath et al. 2005; Fu et al. 2007)나 염분 (Aswath et al. 2005; Li et al. 2010) 스트레스 조건하에서 노화를 지연시키기 위한 연구들이 보고되어 있으며, 이외에도 노화 억제와 유사한 개념의 stay greening을 통해 노화를 지연시켜 농업 생산량을 증가시키기 위한 연구들이 다수 수행되고 있다 (Fang et al. 1998; Spano et al. 2003; Cha et al. 2002). 본 연구에서 개발된 형질전환 벤트그라스는 노화 촉진 조건하에서도 녹기를 유지하는 수명 연장의 특성을 가지고 있다는 점에서, 기존 크리핑 벤트그라스에 비해 상업적 가치를 높이는데 기여할 수 있을

것으로 기대된다.

환경스트레스 조건에서 노화가 지연되는 잔디 개발은 실용적인 면에서도 중요한 의미를 갖는다. 크리핑 벤투그라스의 품종 중 'Penncross'가 국내 잔디 시장에서 가지는 점유율 (양, 2009)을 볼 때 빠른 시간 내에 'Penncross'를 대체할 품종을 찾기 어려우며, 수요가 많은 수입 잔디 종자에 대한 개런티가 증가하는 문제점이 발생하게 된다. 따라서, 여름철 생육억제에 의한 노화를 지연할 수 있는 형질을 지닌 크리핑 벤투그라스의 개발이 요구되어 왔다. 본 연구에서 유전공학 기법을 이용하여 개발한 노화지연 크리핑 벤투그라스는 국내뿐만 아니라 국외 잔디 시장에서도 충분한 경쟁력이 있을 것으로 생각되지만, 더 나은 형질을 부여하기 위한 노력이 필요할 것으로 보여진다. 예를 들어, 본 연구에서 *ORE7* 유전자의 발현에 사용한 구조적 프로모터 (ubiquitin promoter) 대신 노화지연 잔디 개발에 사용한 노화 특이적 프로모터 SAG12 (Xu et al. 2009)나 각종 스트레스에 의해 유도되는 프로모터 등을 사용한다면 보다 엄밀하게 유전자의 발현이 제어되어, 보다 우수한 형질의 노화지연 잔디가 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

지금까지 웅성불임 잔디나 각종 생물적 스트레스에 대한 복합적인 저항성을 가지는 잔디, 그 외에도 미적 가치를 높이기 위한 다양한 색의 잔디 등 여러 가지 형질을 부가한 형질전환 잔디가 개발되어왔다. 앞으로는 알려지지 않는 잔디, 향기를 내는 잔디, 깎지 않아도 되는 잔디 등 고부가가치 잔디 개발을 위한 연구를 지속적으로 수행하여 새로운 잔디 품종을 기대하는 수요에 부응해 나가야 될 것이다. 이러한 잔디 개발은 인류의 건강과 복지 증진에 이바지 할 것으로 판단되지만, 개발된 GM 잔디가 실용화되기 위해서는 환경위해성평가를 통해 생태계 및 인체에 대한 안전성이 확보되어야 할 것이다.

V. 참고문헌

Alberdi M, Reyes-Diaz M, Zuniga R, Hess S, Bravo LA, Corcuera LJ (2009) Photochemical efficiency of PSII and photoprotective pigments in seedlings and adults of two Proteaceae with shade tolerance from the Chilean temperate rain forest. *Revista Chilena de Historia Natural* 82: 387-402

Asano Y, Ito Y, Fukami M, Sugiura K, Fujiie A (1998) Herbicide-resistant transgenic creeping bentgrass plants obtained by electroporation using an altered buffer. *Plant Cell Rep* 17: 963-967

Aswath CR, Kim SH, Mo SY, Kim DW (2005) Transgenic plants of creeping bent grass harboring the stress inducible gene, 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, are highly tolerant to drought and NaCl stress. *Plant Growth Regul* 47: 129-139

Bettany AJE, Dalton SJ, Timms E, Manderyck B, Dhanoa MS, Morris P (2003) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Festuca arundinacea* (Schreb.) and *Lolium multiflorum* (Lam.). *Plant Cell Rep* 21: 437-444

Calderini O, Bovone T, Scotti C, Pupilli F, Piano E, Arcioni S (2007) Delay of leaf senescence in *Medicago sativa* transformed with the *ipt* gene controlled by the senescence-specific promoter SAG12. *Plant Cell Rep* 26: 611-615

Cha KW, Lee YJ, Koh HJ, Lee BM, Nam YW, Paek NC (2002) Isolation, characterization, and mapping of the stay green mutant in rice. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 104: 526-532

Chai ML, Senthil KK, Kim DH (2004) Transgenic plants of colonial bentgrass from embryogenic callus via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 77: 165-171

Chai ML, Wang BL, Kim JY, Lee JM, Kim DH (2003) *Agrobacterium*-mediated transformation of herbicide resistance in creeping bentgrass and colonial bentgrass. *J Zhejiang Univ Sci* 4: 346-351

Dai S, Zheng P, Marmey P, Zhang S, Tian W, Chen S, Beachy RN, Fauquet C (2001) Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Mol Breed* 7: 25-33

Fang Z, Bouwkamp JC, Solomos T (1998) Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in the nonyellowing mutant and the wild-type of *Phaseolus vulgaris* L. *J Exp Bot* 49: 503-510

Fu D, Huang B, Xiao Y, Muthukrishnan S, Liang GH (2007) Overexpression of barley *hva1* gene in creeping bentgrass for improving drought tolerance. *Plant Cell Rep* 26: 467-477

Hameed A, Naseer S, Iqbal T, Syed H, Haq MA (2008) Effects of NaCl salinity on seedling growth, senescence, catalase and protease activities in two wheat genotypes differing in salt tolerance. *Pak J Bot* 40(3): 1043-1051

Han YJ, Kim YM, Lee JY, Kim SJ, Cho KC, Chandrasekhar Thummala, Song PS, Woo YM, Kim JI (2009) Production of purple-colored creeping bentgrass using maize transcription factor genes *P1* and *Lc* through *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 28: 397-406

Hartman CL, Lee L, Day RR, Tumer NE (1994) Herbicide resistant turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) by biolistic transformation. *BioTechnology* 12: 919-923

Husaini AM, Abdin MZ (2008) Development of transgenic strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plants tolerant to salt stress. *Plant Science* 174: 446-455

Jiang H, Li M, Liang N, Yan H, Wei Y, Xu X, Liu J, Xu Z, Chen F, Wu G (2007) Molecular cloning and function analysis of the stay green gene in rice. *The Plant Journal* 52: 197-209

Jordi W, Schapendonk A, Davelaar E, Stoopen GM, Pot CS, De Visser R, Van Rhijn JA, Gan S, Amasino RM (2000) Increased cytokinin levels in transgenic P_{SAG12}-IPT tobacco plants have large direct and indirect effects on leaf senescence, photosynthesis and N partitioning. *Plant Cell Environ* 23: 279-289

Kim SJ, Lee JY, Kim YM, Yang SS, Hwang OJ, Hong NJ, Kim KM, Lee H Y, Song PS, Kim JI (2007) *Agrobacterium*-mediated high efficiency transformation of creeping bentgrass with herbicide resistance. *J Plant Biol* 50: 577-585

Li Q, Robson PR, Bettany AJ, Donnison IS, Thomas H, Scott IM (2004) Modification of senescence in ryegrass transformed with *IPT* under the control of a monocot senescence-enhanced promoter. *Plant Cell Rep* 22(11): 816-821

Li Z, Baldwin CM, Hu Q, Liu H, Luo H (2010) Heterologous expression of *Arabidopsis* H⁺-pyrophosphatase enhances salt tolerance in transgenic creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) *Plant, Cell and Environment* 33: 272-289

Lim PO, Kim Y, Breeze E, Koo JC, Woo HR, Ryu JS, Park DH, Beynon J, Tabrett A, Wollaston VB, Nam HG (2007) Overexpression of a chromatin architecture-controlling AT-hook protein extends leaf longevity and increases the post-harvest storage life of plants. *The Plant Journal* 52: 1140-1153

Lin YJ, Cao ML, Xu CG, Chen H, Wei J, Zhang QF (2002) Cultivating rice with delaying leaf-senescence by P_{SAG12}-*IPT* gene transformation. *Acta Bot Sin* 44: 1333-1338

Luo H, Hu Q, Nelson K, Longo C, Kausch AP, Chandlee JM, Wipff JK, Fricker CR (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) transformation using phosphinothricin selection results in a high frequency of single-copy transgene integration. *Plant Cell Rep* 22: 645-652

Luo K, Deng W, Xiao Y, Zheng X, Li Y, Pei Y (2006) Leaf senescence is delayed in tobacco plants expressing the maize *knotted1* gene under the control of a wound-inducible promoter. *Plant Cell Rep* 25: 1246-1254

Lutts S, Kinet JM, Bouharmont J (1996) NaCl-induced Senescence in Leaves of Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars Differing in Salinity Resistance. *Annals of Botany* 78: 389-398

Ma QH, Liu YC (2009) Expression of isopentenyl transferase gene (*ipt*) in

leaf and stem delayed leaf senescence without affecting root growth. *Plant Cell Rep* (2009) 28: 1759–1765

Mishev K, Stefanov D, Ananieva K, Slavov C, Ananiev ED (2009) Different effects of dark treatment on pigment composition and photosystem I and II activities in intact cotyledons and primary leaves of *Cucurbita pepo* (zucchini). *Plant Growth Regul* 58: 61–71

McCabe MS, Garratt LC, Scepers F, Jordi WJ, Stoopen GM, Davelaar E, van Rhijn JH, Power JB, Davey MR (2001) Effects of *PSAG12-IPT* gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiol* 127(2): 505–516

Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 239–250

Murray MG and Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321–4325

Ogawa Y, Mii M (2007) Meropenem and moxalactam: Novel β -lactam antibiotics for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Science* 172: 564–572

Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 975: 384–394

Robson PRH, Donnison IS, Wang K, Frame B, Pegg SE, Thomas A, Thomas H (2004) Leaf senescence is delayed in maize expressing the *Agrobacterium IPT* gene under the control of a novel maize senescence-enhanced promoter. *Plant Biotechnol J* 2: 101-112

Spano G, Di Fonzo N, Perrotta C, Platani C, Ronga G, Lawlor DW, Napier JA, Shewry PR (2003) Physiological characterization of 'stay green' mutants in durum wheat. *J Exp Bot* 54: 1415-1420

Toyama K, Bae CH, Kang JG, Lim YP, Adachi T, Rui KZ, Song PS, Lee HY (2003) Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol Cell* 16: 19-27

Travella S, Ross SM, Harden J, Everett C, Snape JW, Harwood WA (2005) A comparison of transgenic barley lines produced particle bombardment and *Agrobacterium* mediated techniques. *Plant Cell Rep* 23: 780-789

Walulu RS, Rosenow D, Wester DB, Nguyen HT (1994) Inheritance of the stay-green trait in sorghum. *Crop Sci* 34: 970-972

Watrud LS, Lee EH, Fairbrother A, Burdick C, Reichman JR, Bollman M, Storm M, King G, and Van de Water PK (2004) Evidence for landscape-level, pollen-mediated gene flow from genetically modified creeping bentgrass with *CP4 EPSPS* as a marker. *PNAS* 101(40): 14533-14538

Weaver LM, Amasino RM (2001) Senescence is induced in individually darkened *Arabidopsis* leaves, but inhibited in whole darkened plants. *Plant Physiol* 127: 876-886

Xu Y, Tian J, Gianfagna T, Huang B (2009) Effects of SAG12-*ipt* expression on cytokinin production, growth and senescence of creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) under heat stress. *Plant Growth Regul* 57: 281-291

Yu TT, Skinner DZ, Liang GH, Trick HN, Huang B, Muthukrishnan S (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation of creeping bentgrass using *GFP* as a reporter gene. *Hereditas* 133: 229-233

Zapiola ML, Campbell CK, Butler MD, Smith CA (2008) Escape and establishment of transgenic glyphosate resistant creeping bentgrass *Agrostis stolonifera* in Oregon, USA: a 4-year study. *Journal of Applied Ecology* 45: 486-494

Zhong H, Boyland MG, Srinivasan C, Sticklen MB (1993) Transgenic plants of turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. *Plant Cell Rep* 13: 1-6

양근모 (2009) 염해지에서 크리핑 벤투그라스의 생육. Korea Turfgrass Research Institute 28-36

감사의 글

대학 시절부터 지금까지의 시간을 되돌아보면 로버트 프로스트의 ‘가지 않는 길’이 떠오릅니다. 문득 문득 공부를 계속 했더라면 내가 어떻게 살고 있을까 라는 생각을 했었습니다. 후회 없는 삶은 없다고 하지만 학위 과정을 마치면서 그런 생각에서 이제는 벗어날 수 있게 되었습니다.

또 다른 삶을 제시해주신 이효연 교수님, 감사드립니다. 저 같이 못난 제자 이끌어주시느라 속 많이 상하셨을 텐데 교수님은 예전이나 지금이나 저를 그 자체로 믿어주셨습니다. 교수님 믿음에 만족할 만한 사람이 되지 못해 죄송스러울 따름입니다.

여성과학자의 본보기가 되어주신 임평옥 교수님, 교수님의 격려가 제겐 큰 도움이 되었습니다. 칭찬은 고래도 춤추게 하는 것처럼 부족한 제가 교수님의 말씀 한마디, 한마디로 용기를 낼 수 있었던 것 같습니다.

제겐 대나무와 같은 선현진 교수님, 어떻게 말씀을 드려야 할지 모르겠습니다. 그저 감사드리고 죄송합니다. 앞으로도 한번 더 생각하고 실천하도록 하겠습니다.

송인자 박사님, 사적으로 인생을 통틀어 가장 친한 언니이자 공적으로는 실험실의 든든한 박사님. 따뜻한 송박사님이 계셨기에 이곳에서의 생활을 견딜 수 있었습니다.

언제나 초연한 배태웅 박사님, 철 없는 제 이야기 들어주셔서 감사드립니다.

고창효 박사님, 툭툭 쏘는 박사님의 그 말투를 언젠가는 못 들을 것이라고 각하니 눈물이 앞을... 논문 작업 때 옆에서 이것저것 정말 ‘kindly’하게 알려주신 거나중에도 굉장히 재미있는 기억으로 남을 것 같습니다.

언제나 유머러스함을 잃지 않으셨던 강홍규 교수님, 실험실 생활에 활력소가 되어주신 분. 고석민 교수님, 저의 지금은 그때의 “마음을 비우라”는 말씀이 계기가 된 것 같습니다. 류기중 교수님, 실험이 잘 되지 않아 답답할 때 일침을 가해주시던 교수님 말씀 잊지 않고 있습니다.

우리 식물생명공학 실험실 식구들에게 지면으로 감사의 말을 전합니다.

뽀뽀한 대화언니, 아마 언니라면 뭐든 잘 할거라 믿어요.

미영언니, 민재언니, 앞으로 많은 일이 있겠지만, 그럴 때 여러 가지 생각하지 말고 언니들에게 주어진 것에만 최선을 다하면 돼요.

내 동기 준영, 울곧이 박사과정 진학하는 친구. 준영이가 연구도 생활도 열심히 해서 한국에서 좋은 추억 만들길 바래.

제일 어려서 부러운 선영, 현재에 충실하며 나중에도 후회없게 열심히 했으면 좋겠다.

나랑 내 친구를 보는 듯 한 수연과 성년. 열심히 노력하는 경애언니. 툭툭 쏘아대는 내 말투에 무덤덤한 강적, 태진오빠. 2시는 켈투쇼가 진리입니다.

언제나 자신의 일에 최선을 다해서 때때로 존경스러운 현숙이.

어리게만 보았던 보화, 어떤 일이든 충분히 고민을 해야지 나중에 후회가 없어. 그리고 마지막 선택에 대한 책임은 자신에게 있다는 걸 잊지 말구.

옥철, 실험실에서 성격이 제일 비슷한 너. 논문 도와준 거 고맙다.

실험실 식구들을 챙겨주시는 행정실 큰 선생님 최수정 선생님, 작은 선생님 강효순 선생님. 가족도 없는 제가 아플 때 제일 먼저 달려와 챙겨주시는 수정 선생님, 감사해요. 효순 선생님, 꿈 이루시길 바래요. 선생님들이 계셔서 저희들이 마음 편히 연구에만 집중할 수 있었던 것 같아요.

나의 평생 친구이자 지지자가 되어준 류정임양. 어쩌다 내가 너 같은 친구를 얻게 되었는지, 정말 알쏭달쏭하다. 아마도 이건 신의 장난이 아닐까

그리고, 내 사랑하는 가족들. 엄마 박영자씨, 아빠 강충구씨, 동생 철. 가족이라도 가끔은 울고 싶을 때도 있고, 미울 때도 있지만, 그래도 끊을 수 없는 내 가족들. 앞으로도 죽을 때까지 사랑하겠지만, 어쩌다 드는 그 마음들에 지지 않을 수 있게 내가 더 강해질 수 있었으면 좋겠다.

감사의 글을 쓰며 되돌아보니 제가 인복이 많은 사람이라는 것을 느꼈습니다. 저의 능력보다는 교수님들, 박사님들, 실험실 식구들, 사랑하는 가족과 친구의 도움, 지지와 격려, 질책이 없었더라면 이 논문은 나오지 못했을 것입니다. 부족한 부분이 많지만 진심으로 감사의 말씀을 드리고픈 많은 분들께 이 논문을 올립니다.