



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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

들잔디의 효율적인 형질전환 조건
검토 및 환경스트레스 내성유전자를
도입한 GM들잔디의 제조

Improvement of transformation protocol for *Zoysia japonica* Steud. and production of transgenic zoysiagrass introducing abiotic stress-related genes

濟州大學校 大學院

生命工學科

朴美英

2013年 2月

들잔디의 효율적인 형질전환 조건
검토 및 환경스트레스 내성유전자를
도입한 GM들잔디의 제조

Improvement of transformation protocol for *Zoysia japonica* Steud. and production of transgenic zoysiagrass introducing abiotic stress-related genes

指導教授 李 孝 淵

朴 美 英

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2013年 2月

朴美英의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____(印)

委 員 _____(印)

委 員 _____(印)

濟州大學校 大學院

2013年 2月

목 차

Abstract	4
I. 서론	5
II. 재료 및 방법	8
1. 식물재료	8
1) 식물재료	8
2) 캘러스 유도 및 증식	8
2. 형질전환에 사용한 Vector	8
1) E9- <i>Annexin1</i> vector	8
2) IG2- <i>ATHG1</i> , <i>ATPG7</i> , <i>ATPG8</i> vector	10
3. 캘러스의 유도, 선발 및 <i>Agrobacterium</i> 을 이용한 형질전환	10
1) 전배양	10
2) <i>Agrobacterium</i> 배양	10
3) <i>Agrobacterium</i> 감염 및 공동배양	10
4) GUS 활성 분석	13
5) 형질전환 캘러스 선발	13
6) 형질전환 Shoot의 유도 및 선발	13
7) 형질전환 Shoot의 증식 및 Root의 유도	13
4. 형질전환 식물의 선발과 유전자 도입 및 발현 확인	14
1) PAT 단백질의 발현 확인	14
2) 염색체 DNA 추출 및 genomic-PCR	14
3) Southern blot 분석	16
4) RT-PCR 분석	18

5) 들잔디의 형질전환 효율조사	19
5. <i>Annexin1</i>-형질전환 들잔디의 특성조사	20
1. 산화 스트레스 조건하에서의 특성조사	20
2. 건조 스트레스 조건하에서의 특성조사	20
3. 염 스트레스 조건하에서의 특성조사	20
III. 결과 및 고찰	21
1. 들잔디의 조직배양 및 형질전환 조건의 검토	21
1) 캘러스의 유도 및 선발	21
2) 캘러스의 증식 및 유지	21
3) 선발한 캘러스의 재분화 테스트	24
4) <i>Agrobacterium</i> 배양	24
5) 전배양	24
6) <i>Agrobacterium</i> 감염	26
7) 공동배양	28
8) <i>Agrobacterium</i> 제거	28
9) 형질전환 캘러스 선발	29
10) 형질전환 Shoot 유도 및 선발	29
11) 형질전환 Shoot 증식 및 Root 유도	32
2. 형질전환 식물의 선발, 유전자 도입 및 발현 확인	32
1) PAT 단백질의 발현 확인을 통한 형질전환체의 선발	32
2) 염색체 DNA 추출 및 genomic-PCR	37
① <i>Annexin1</i>	37
② <i>ATHG1, ATPG7, ATPG8</i>	37
3) RT-PCR 분석	37
4) Southern blot 분석	43
3. 들잔디의 형질전환 효율조사	43
4. <i>Annexin1</i>-형질전환 들잔디의 특성조사	46

1. 산화 스트레스 조건하에서의 특성조사	46
2. 건조 스트레스 조건하에서의 특성조사	48
3. 염 스트레스 조건하에서의 특성조사	48
IV. 종합고찰	52
V. 인용문헌	54
감사의 글	61

Abstract

Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) is one of the most popular turfgrass species in many countries. According to the use of this turfgrass increases, there is an increase in the demand for genetic improvement of the species. An efficient transformation protocol, using mature seed-derived callus cultures and *Agrobacterium*-mediated transformation, has been developed for the production of transgenic zoysiagrass. In order to optimize transformation conditions, several factors such as cultivars for selecting of embryogenic callus as explant, infection time, concentration of *Agrobacterium* suspension, co-cultivation period, concentration of phosphinothricin when selection, influencing on transformation efficiency of zoysiagrass were evaluated. Embryogenic callus from 'Ducchang' is more suitable than that of from 'Misung' for efficient transformation. An appropriate concentration (O.D600= 0.1-0.2) of *Agrobacterium* and 24 hour of infection time showed a higher level of infection. Continuous selection by combination of high and low concentrations of selection agent produced transgenic plants with low escapes. Using this transformation system, abiotic stress-related genes, *Annexin1*, *ATHG1*, *ATPG7*, and *ATPG8* were introduced into zoysiagrass. Transgenic plants were confirmed by genomic PCR and Southern blot analysis. The transformation efficiencies for *Annexin1*, *ATHG1*, *ATPG7*, or *ATPG8* ranged from 0.24 to 3%. The transgenic plants overexpressing *Annexin1* gene showed enhanced oxidative, salt, and drought tolerance compared to wild type zoysiagrass.

The established transformation system will promote the development of genetic improvement of the zoysiagrass.

I. 서론

잔디는 지피식물로 내한성에 따라 27~35℃의 고온에서 잘 자라는 난지형 잔디와 15~24℃의 조건에서 생육이 좋은 한지형 잔디로 분류되고 있다. 난지형 잔디는 한국잔디(*Zoysiagrass*, Korean lawngrass, Japanese lawngrass), 버뮤다그래스 및 세인트 어거스틴그래스, 카페트그래스류 등이 있으며, 봄부터 생육이 시작되어 여름철 즉 6~8월에 가장 잘 성장한다. 우리나라에 자생하는 한국잔디는 약 100여 종 이상이 보고되어 있다 (Lee et al. 2004). 이들 한국잔디류는 내한성, 내서성 뿐만 아니라 내담압성이 뛰어나며 내병성이 강해 잔디관리가 쉽지만, 온도가 10℃ 이하로 내려가는 10월초부터 휴면을 시작하여 잎 색깔이 황색으로 변하면서 이듬해 4월까지의 휴면상태에 들어가 녹색유지기간이 한지형 잔디에 비해 짧고 그늘에서는 생육이 느린 단점이 있다. 한국잔디류인 들잔디(*Zoysia japonica* steud.)는 우리나라 전국 각지를 포함한 동아시아 지역에 자생하고 있으며 각종 환경에 대한 적응력이 강하고 심근성이어서 묘소, 공원, 골프장, 경사면 녹화 등 여러 가지 목적으로 이용되고 있다 (Kim and Lee 2010; Kim 1995).

최근 국내의 경우 잔디의 이용범위가 넓어져서 다양한 용도의 잔디 품종 개발이 요구되고 있으나 외국에 비해 체계적인 육종이 이루어지고 있지 않다. 들잔디의 신품종 개발에는 주로 전통적인 육종방법이 이용되어 왔으나 다른 작물들과 같이 고전육종기술의 한계점들이 나타남에 따라, 최근에는 분자육종에 의한 신품종 개발이 활발하게 진행되고 있다. 분자육종법을 이용하여 신품종 잔디를 개발하기 위해서는 먼저 효율적이고 안정적인 조직배양계 및 형질전환체계가 확립되어야 한다. 잔디는 품종에 따라서 캘러스의 형태 및 식물체 재분화 능력이 다르다는 것이 잘 알려져 있으며 (Toyama et al. 2003; Liu et al. 2009; Song et al. 2010; Sun et al. 2010), 따라서 균일한 형태의 재분화 효율이 높은 캘러스를 선발하는 것이 중요하다. 들잔디의 형질전환에는 재료의 안정적인 확보가 가능하고 배양이 쉬운 성숙종자 유래의 캘러스가 주로 이용되고 있으며 (Toyama et al. 2003; Zhang et al. 2007; Sun et al. 2010), 형질전환 방법으로는 염색체내의 도입유전자의 수가 적은 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환방법 (Hiei et al. 1997)

이 많이 이용되고 있다. 그러나 조직배양 및 형질전환이 까다로운 들잔디의 형질 전환 관련 논문은 제초제 저항성, 해충 저항성, 내음지성 형질전환 들잔디 등 수 편에 불과하다 (Sun et al. 2010). 따라서 전통적 육종법으로는 도입이 어려운 다양한 형질을 가진 신품종 잔디의 개발을 위해서는 지금까지 이용되고 있는 방법 보다 효율적이고 안정적인 조직배양 시스템 및 형질전환체계의 확립이 필요할 것으로 보인다.

모든 살아있는 생물은 일생동안 각종 환경스트레스에 지속적으로 노출되어 있다. 동물은 위험에 노출되어질 경우 피할 수 있지만, 동물과는 달리 고착생물로 이동할 수 없는 식물은 다양한 스트레스에 대해 동물보다 더 많은 영향을 받게 된다. 그러므로 식물은 비생물적 및 생물적 스트레스를 빠르게 인식하고 감지하는 정교한 네트워크와 메카니즘을 가지게 되었다 (Yang 1997). 식물은 건조, 고염, 저온, 고온등의 다양한 비생물적 환경 스트레스에 항상 노출되어 있다. 비생물적 스트레스 중에서도 건조 스트레스는 특히 많은 피해를 입힌다 (Boyer 1992). 환경 스트레스 하에서, 식물은 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)을 증가시키고 그 활성산소는 세포에 있는 많은 물질들을 파괴하지만, 식물체는 스스로를 보호하기 위해 활성산소종을 제거하는 항산화 효소를 유도하기도 한다. 최근 지구 온난화가 급속히 진행되면서 각종 환경 스트레스가 증가함에 따라, 이들 스트레스에 대한 내성을 증가시킨 들잔디의 개발이 요구되고 있으며 이 외에 병해충 저항성, 녹기연장, 내음지성 등 다양한 형질을 가진 GM들잔디의 개발이 요구되고 있다.

애기장대 유래의 *Annexin1* 유전자는 식물에서 건조, 염스트레스에 의해 발현이 유도되며 산화 스트레스에 의해 항산화 효소인 peroxidase 활성이 유도되는 것으로 알려져 있다. 알파파에서 분리된 *annMs2*의 경우 삼투압 스트레스, ABA 그리고 건조 스트레스에 의해 발현이 유도된다고 보고되었다 (Kovacs et al. 1998). 애기장대에서 분리된 *Annexin* 유전자의 경우 저온, 염, 건조에 저항성을 보이는 것으로 보고되었으며 (Kreps et al. 2002; Konopka-Postupolska et al. 2009), 벼(*Oryza sativa*)에서 분리된 '*Nagina 22*'; *Annexin*의 경우 건조에 의해 높게 발현이 유도된다는 것이 알려져 있다 (Gorantla et al. 2005). 또한 Loblolly pine(*pinus taeda*), *Brassica juncea*의 경우에도 건조 스트레스에 의해 *Annexin*

유전자의 발현이 유도된다고 보고되었다 (Watkinson et al. 2003; Jami et al. 2008). 동물 *Annexins*는 세포에서 산화 스트레스 처리에 중요한 역할을 하며 (Rhee et al. 2000; Sacre et al. 2002; Tanaka et al. 2004), *Medicago sativa*, *Arabidopsis thaliana* 등 식물 *Annexins*도 산화 스트레스 반응에 유도된다고 보고되었다 (Kovacs et al. 1998; Lee et al. 2004; Konopka-Postupolska et al. 2009; Jami et al. 2008).

기능성 유전체 연구를 통하여 *AT-hook* domain을 포함하고 있는 애기장대 유래의 *ATHG1*, *ATPG7*, *ATPG8* 유전자는 녹기연장, 생산성 증대, 노화지연 등의 표현형적 특징을 가진다고 보고되었다 (제노마인보고서 2012). 따라서 이들 유전자는 *Annexin1* 유전자와 더불어 환경 스트레스에 대해 중요한 기능을 수행할 것으로 추정된다.

본 연구에서는 형질전환 기술을 이용하여 환경 스트레스 내성 들잔디를 제조하고자 들잔디의 효율적인 형질전환을 위한 조직배양 및 형질전환 조건을 검토하였다. 성숙종자 유래의 캘러스 유도 및 선발방법을 포함하여, *Agrobacterium*의 감염조건 등의 최적화를 ‘덕창’과 ‘미성’ 두 품종의 들잔디를 이용하여 수행하였다. 개량한 형질전환 방법을 이용하여 산화, 건조스트레스 내성 관련 유전자인 *Annexin1* 유전자와 노화지연 및 건조 스트레스 내성에 관련된 유전자로 알려진 *AT-hook* DNA binding family protein 유전자들을 도입한 형질전환 들잔디를 제조하였다. 이 중 *Annexin1* 형질전환 들잔디는 순화/증식하여 산화, 건조 및 염 스트레스에 대한 특성을 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료

1) 식물 재료

형질전환 조건을 확립하기 위한 식물재료로는 들잔디(*Zoysia japonica* Steud.)의 성숙종자 ‘덕창’, ‘미성’ 2품종을 사용하였다.

2) 캘러스 유도 및 증식

들잔디 성숙종자의 종피를 제거하고, 99% ethanol에서 1분간 교반한 후 20 μ l의 tween20이 첨가된 5% sodium hypochlorite 용액에서 15분간 표면 살균하였다. 표면 살균된 종자를 무균 상태에서 멸균수로 3회 이상 세정한 후 3% sucrose와 2 mg/L 2,4-D, 100 mg/L α -ketoglutaric acid, 0.2 mg/L BA, 4 mg/L thiamime-HCL이 첨가된 MS배지에 치상하고, 25 $^{\circ}$ C, 암 조건에서 4주간 배양하였다. 성숙종자로부터 유도된 캘러스로부터 재분화능이 있는 캘러스만을 선발하고, 증식배지에서 2주 간격으로 계대배양한 후 증식한 캘러스를 형질전환 실험재료로 사용하였다. 이하 본 연구에 사용한 식물 조직 배양배지는 Table 1에 제시하였다.

2. 형질전환에 사용한 Vector

1) E9-*Annexin1* vector

애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 *Annexin1*(At1g35720) 유전자는 고려대학교로부터 분양받아 freeze-thaw method (Holsters et al. 1978)를 통해 *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105에 도입하여 들잔디(*Zoysia japonica* Steud.)의 형질전환에 사용하였다. 형질전환에 사용된 E9-*Annexin1* vector는 binary vector인 E9을 *SacI*과 *BamHI*으로 소화시킨 후 Ubiquitin promoter하에 *Annexin1* 유전자를 삽입하여 구축하였다(Fig. 1A). E9-*Annexin1*은 T-DNA 내부에 선발 마커로서 비선택성 제초제 내성 유전자인 *bar* 유전자와 표지 마커인

Table 1. Media used for zoysiagrass transformation

Media	Composition
Callus induction	MS medium containing 2 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L BA, 4 mg/L thiamine-HCl, 100 mg/L α -ketoglutaric acid, 30 g/L sucrose, 3 g/L gelrite, pH 5.8
Callus growth/ maintenance	MS medium containing 2 mg/L 2,4-D, 0.4 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose, 3 g/L gelrite pH 5.8
<i>Agrobacterium</i> culture	Yep medium, 100 mg/L kanamycin, 25 mg/L rifampicin, pH 7.0
Infection	MS medium containing 2 mg/L 2,4-D, 0.4 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose, 50 mg/L acetosyringone, pH 5.8
Co-cultivation	MS medium containing 2 mg/L 2,4-D, 0.4 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose, 50 mg/L acetosyringone, 3 g/L gelrite pH 5.8
Callus selection I	MS medium containing 2 mg/L 2,4-D, 0.4 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose, 1 mg/L PPT, 250 mg/L cefotaxime, 3 g/L gelrite, pH 5.8
Callus selection II	MS medium containing 2 mg/L 2,4-D, 0.4 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose, 5 mg/L PPT, 250 mg/L cefotaxime, 3 g/L gelrite, pH 5.8
Shoot induction I	MS medium containing 1 mg/L BA, 30 g/L maltose, 3 mg/L PPT, 250 mg/L cefotaxime, 3 g/L gelrite, pH 5.8
Shoot induction II	MS medium containing 1 mg/L BA, 30 g/L maltose, 1 mg/L PPT, 250 mg/L cefotaxime, 3 g/L gelrite, pH 5.8
Shoot elongation	MS medium containing 1 mg/L BA, 30 g/L maltose, 1 mg/L PPT, 250 mg/L cefotaxime, 3 g/L gelrite, pH 5.8
Root induction	MS medium containing 30 g/L sucrose, 1 mg/L PPT, 250 mg/L cefotaxime, 3 g/L gelrite, pH 5.8

GFP- β -glucuronidase (GFP-*gus*) 유전자를 포함하고 있다.

2) IG2-*ATHG1*, *ATPG7*, *ATPG8* vector

ATHG1(At4g17800) 유전자는 IG2 vector를 *SmaI*으로, *ATPG7*(At4g22810)과 *ATPG8*(At3g60870) 유전자는 IG2 vector를 *XbaI*과 *SacI*으로 각각 소화시킨 후 Ubiquitin promoter하에 유전자를 삽입하여 구축하였다(Fig. 1B). T-DNA 내부에 선발 마커로서 비선택성 제초제 내성 유전자인 *bar* 유전자와 표지 마커인 β -glucuronidase (*introm-gus*) 유전자를 포함하고 있다. IG2 vector의 다중 클로닝 부위에 유전자가 삽입된 벡터를 freeze-thaw method (Holsters et al. 1978)를 통해 *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105에 도입하여 들잔디(*Zoysia japonica* Steud.)의 형질전환에 사용하였다.

3. 켈러스의 유도, 선발 및 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환

들잔디의 형질전환을 위한 켈러스의 선발 및 형질전환은 Fig. 2와 같은 방법과 순서로 수행하였다.

1) 전 배양

‘덕창’과 ‘미성’ 2품종의 성숙종자에서 유도하여 선발한 켈러스를, 켈러스 증식 배지에서 2~3주간 증식한 후, 전배양배지에 치상하여 25°C, 암조건에서 배양하였다.

2) *Agrobacterium* 배양

목적 유전자를 포함한 binary vector가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105를 25 mg/L rifampicin과 100 mg/L kanamycin이 첨가된 YEP 액체배지에서 28°C, 200rpm으로 24시간 배양하여 사용하였다. 균의 농도는 OD 600 값을 측정하여 계산하였다.

3) *Agrobacterium* 감염 및 공동배양

YEP 액체배지에서 배양한 *Agrobacterium*은 원심분리(5000rpm, 5분)를 통하

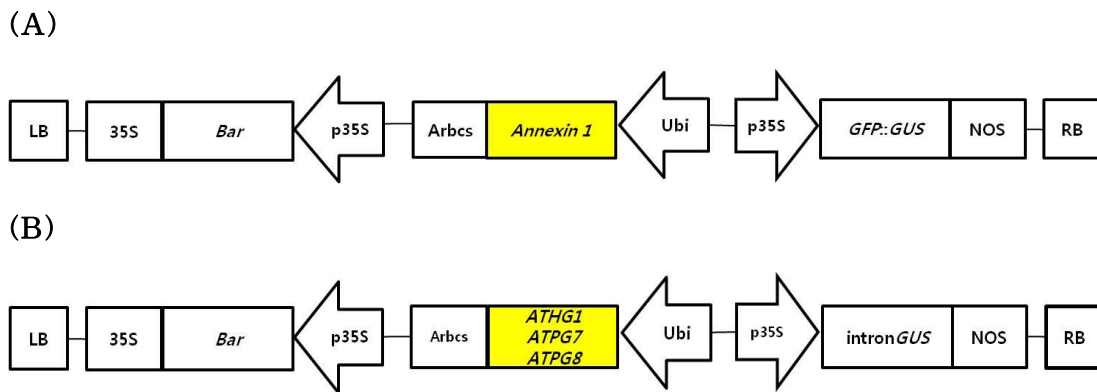


Fig. 1. Map of the T-DNA region of the binary vector, *E9-Annexin1* (A) and the map of the T-DNA region of the binary vectors, *IG2-ATHG1*, *ATPG7* and *ATPG8* (B).

LB, left border of T-DNA; P35S and 35S poly-A, CaMV 35S Promoter and Terminator; Bar, *Phosphinotricin acetyltransferase* gene; Ubi and ArbcS, Ubiquitin promoter and *ArbcS* gene terminator; P35S and Nos poly-A, CaMV 35S Promoter and nopaline synthase terminator; GFP::GUS, Green fluorescent protein and β -glucuronidase gene; intron/GUS, GUS coding region with a catalase intron insertion; RB, right border of T-DNA.

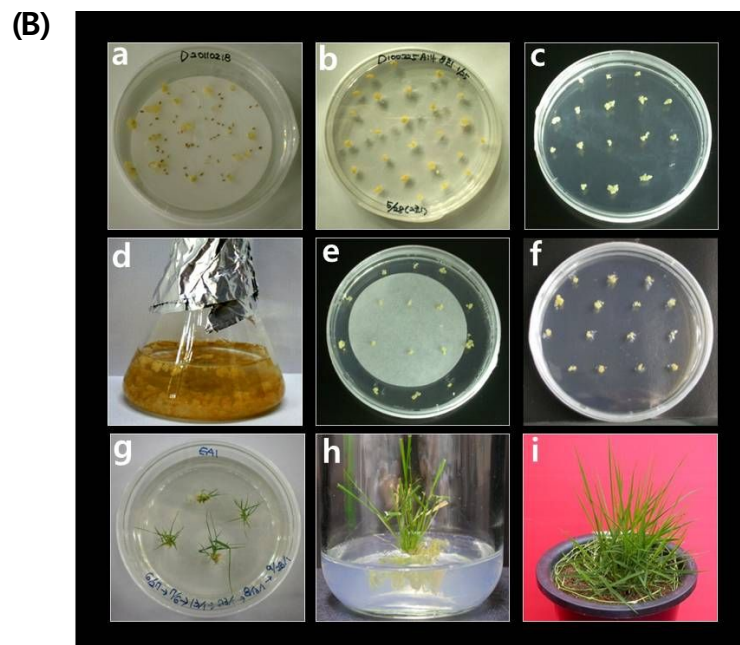
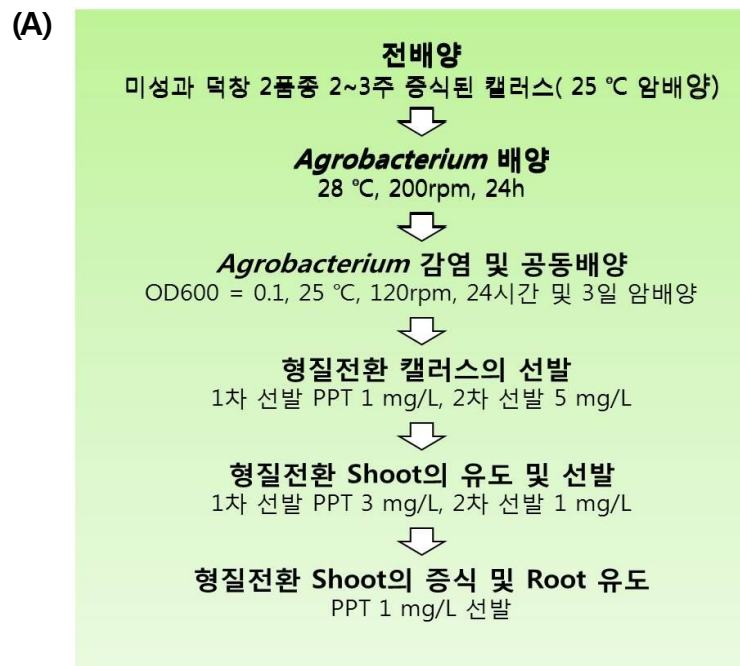


Fig. 2. Procedure of *Agrobacterium*-mediated transformation for zoysiagrass. (A) Flow chart illustrating the steps of transformation. (B) a, Callus induction; b, Callus selection; c, Pre-culture; d, *Agrobacterium* infection; e, Co-cultivation; f, Selection of transgenic callus; g, Shoot selection; h, Root selection; i, Transgenic plant.

여 수집하였다. 수집한 균을 50 mg/L acetosyringone (3,5-dimethoxy-4-hydroxy-acetophenone, Aldrich)이 첨가된 (Toyama et al. 2003; Seo et al. 2002) 감염배지에 $OD_{600nm}=0.1$ 이 되도록 재현탁하여, 고체배지에서 유기된 캘러스를 넣은 다음, 25°C, 120rpm 에서 24시간동안 감염시켰다. 감염한 캘러스를 멸균된 여과지에 올려 과잉의 수분을 제거 한 후, 여과지가 깔린 공동배양배지에 치상하여 25°C±2°C의 조건에서 3일간 암배양하였다.

4) GUS 활성 분석

GUS 활성은 ‘미성’ 품종에서 유도/선발한 캘러스를 *Agrobacterium*에 감염하여 분석하였다. GUS 활성의 분석은 Jefferson 등 (1987)의 방법에 따라 실시하였다. *Agrobacterium* 감염 후, 3일간 공동배양한 캘러스를 캘러스 선발배지에 치상하여 1주간 배양한 다음, GUS 염색액에 침지 후 37°C에서 24시간 반응시켜 GUS의 발현여부를 확인하였다.

5) 형질전환 캘러스의 선발

캘러스 선발은 1차 및 2차 선발로 나누어 수행하였다. 250 mg/L cefotaxime과 1 mg/L PPT 항생제가 첨가된 캘러스 선발배지에서 25°C, 암 조건에서 1주간 배양(1차 선발)한 다음, 250 mg/L cefotaxime과 5 mg/L PPT 항생제가 첨가된 캘러스 선발배지(2차선발)로 계대배양하여 25°C±2°C, 암 조건에서 2주간 배양하였다.

6) 형질전환 Shoot의 유도 및 선발

형질전환 식물체의 선발은 두 단계로 나누어 수행하였다. 1차 선발은 3 mg/L의 PPT가 첨가된 shoot 유도 배지에 캘러스를 치상하여 25°C±2°C, 16 h light/8 h 조건에서 수행하였고, 여기에서 유도된 shoot를 선발하여 1 mg/L의 PPT가 포함된 선발배지로 계대배양하여 2차 선발을 수행하였다.

7) 형질전환 Shoot의 증식 및 Root 유도

유도/선발된 shoot는 빠른 증식을 위해 PPT 1 mg/L가 포함된 shoot 증식배지로 옮겨 배양하였고, 여기서 고사하지 않고 2~3 cm이상 성장한 shoot를 root 선

발배지로 옮겨 배양하였다. Root가 정상적으로 유도된 형질전환 식물체들을 대상으로 PAT test strip을 이용하여 형질전환체를 선발한 후, GM온실에서 순화/증식 하였으며, 이들 식물체를 이용하여 유전자의 도입 및 발현을 확인하였다.

4. 형질전환 식물의 선발과 유전자 도입 및 발현확인

1) PAT 단백질의 발현 확인

1.5 mL 튜브에 약 0.2 g의 야생형 잔디와 형질전환 후보체의 잎을 잘라 넣고, 0.2 mL의 증류수를 첨가한 후 PELLET PESTLE (Sigma, USA)을 이용하여 잎 조직을 분쇄하였다. 각 샘플 튜브에 PAT test strip을 넣고 2분간 반응시킨 후 PAT 단백질의 발현을 확인하였다.

2) 염색체 DNA 추출 및 PCR

CTAB법 (Murray and Thomson 1980)을 이용하여 야생형과 형질전환 식물의 잎 조직에서 염색체 DNA를 추출하였다. 잎 조직 약 0.1 g을 액체질소로 동결 분쇄하였다. 이 분쇄한 잎 조직에 CTAB buffer [1.4 M NaCl, 100 mM Tris HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 3% CTAB]를 넣고 잘 혼합하여 20분 동안 65°C에 정치하였다. 이 혼합물에 동량의 Chloroform:isoamylalcohol(24:1)를 넣고 잘 혼합한 후 원심분리한 다음, DNA를 isopropanol로 침전시켰다. 침전시킨 DNA는 70% 에탄올로 세정한 다음 멸균된 증류수에 용해하였다. 이 염색체 DNA를 이용하여 목적유전자의 도입확인을 위한 genomic-PCR을 수행하였다.

Annexin1 유전자의 도입을 확인하기 위해 Fig. 3과 같은 반응액 조성과 PCR 조건에서 genomic-PCR을 수행하였다. 954bp 크기의 *Annexin1* 유전자를 증폭하기 위한 primer로는 forward primer(5'-GGA TGG GGT ACG AAC GAG GAC TT-3')와 reverse primer(5'-CTG TTC CTG CGC TGG TAC TCC TC-3')를 사용하였다.

PCR 반응액	PCR 조건
genomic DNA 25ng	95℃ 5분
10× buffer(TakaRa) 2 μ l	pre-denaturation 후
25mM dNTP(TakaRa) 1 μ l	95℃ 60초
forward primer 0.2 μ l	62℃ 30초
reverse primer 0.2 μ l	72℃ 60초
Ex Taq polymerase(TakaRa) 0.2 μ l	의 조건으로 35cycles 수행후
+ SDW to 20 μ l	72℃ 10분

Fig. 3. PCR reaction solution and condition for *Annexin1* gene.

ATHG1 유전자의 도입을 확인하기 위해 Fig. 4와 같은 반응액 조성과 PCR조건에서 genomic-PCR을 수행하였다. 879bp 크기의 *ATHG1* 유전자를 증폭하기 위한 primer로는 forward primer(5'-ATG GCT GGT CTT GAT CTA GGC A-3')와 reverse primer(5'-TCA GAA AGG ACC TCT TCC ACC G-3')를 사용하였다.

PCR 반응액	PCR 조건
genomic DNA 25ng	95℃ 5분
10× buffer(TakaRa) 2 μ l	pre-denaturation 후
25mM dNTP(TakaRa) 1 μ l	95℃ 60초
forward primer 0.2 μ l	62℃ 30초
reverse primer 0.2 μ l	72℃ 60초
Ex Taq polymerase(TakaRa) 0.2 μ l	의 조건으로 37cycles 수행후
+ SDW to 20 μ l	72℃ 10분

Fig. 4. PCR reaction solution and condition for *ATHG1* gene.

ATPG7 유전자의 도입을 확인하기 위해 Fig. 5와 같은 반응액 조성과 PCR조건에서 genomic-PCR을 수행하였다. 975bp 크기의 *ATPG7* 유전자를 증폭하기 위한 primer로는 forward primer(5'-AAA TGG ATC CAG TAC AAT CTC ATG G-3')와 reverse primer(5'-TCA ATA CGG TGG TCG TCC CGT-3')를 사용하였다.

PCR 반응액	PCR 조건
genomic DNA 25ng	95℃ 5분
10× buffer(TakaRa) 2 μ l	pre-denaturation 후
25mM dNTP(TakaRa) 1 μ l	95℃ 60초
forward primer 0.2 μ l	65℃ 30초
reverse primer 0.2 μ l	72℃ 60초
Ex Taq polymerase(TakaRa) 0.2 μ l	의 조건으로 37cycles 수행후
+ SDW to 20 μ l	72℃ 10분

Fig. 5. PCR reaction solution and condition for *ATPG7* gene.

ATPG8 유전자의 도입을 확인하기 위해 Fig. 6과 같은 반응액 조성과 PCR 조건에서 genomic-PCR을 수행하였다. 798bp 크기의 *ATPG8* 유전자를 증폭하기 위한 primer로는 forward primer(5'-ATG GAT GAG GTA TCT CGT TCT CA-3')와 reverse primer(5'-TTA GAA AGA CGG TCG TTG CGT TC-3')를 사용하였다.

PCR 반응액	PCR 조건
genomic DNA 25ng	95℃ 5분
10× buffer(TakaRa) 2 μ l	pre-denaturation 후
25mM dNTP(TakaRa) 1 μ l	95℃ 60초
forward primer 0.2 μ l	65℃ 30초
reverse primer 0.2 μ l	72℃ 60초
Ex Taq polymerase(TakaRa) 0.2 μ l	의 조건으로 37cycles 수행후
+ SDW to 20 μ l	72℃ 10분

Fig. 6. PCR reaction solution and condition for *ATPG8* gene.

PCR 산물은 EtBr을 첨가한 1% Agarose gel에 loading하여 전기영동한 후 band를 확인하였다.

3) Southern blot 분석

PCR 분석을 통해 유전자 도입이 확인된 *Annexin1* 형질전환식물을 대상으로 Southern blot 분석을 실시하였다(Fig. 7). 야생형과 형질전환 식물의 염색체

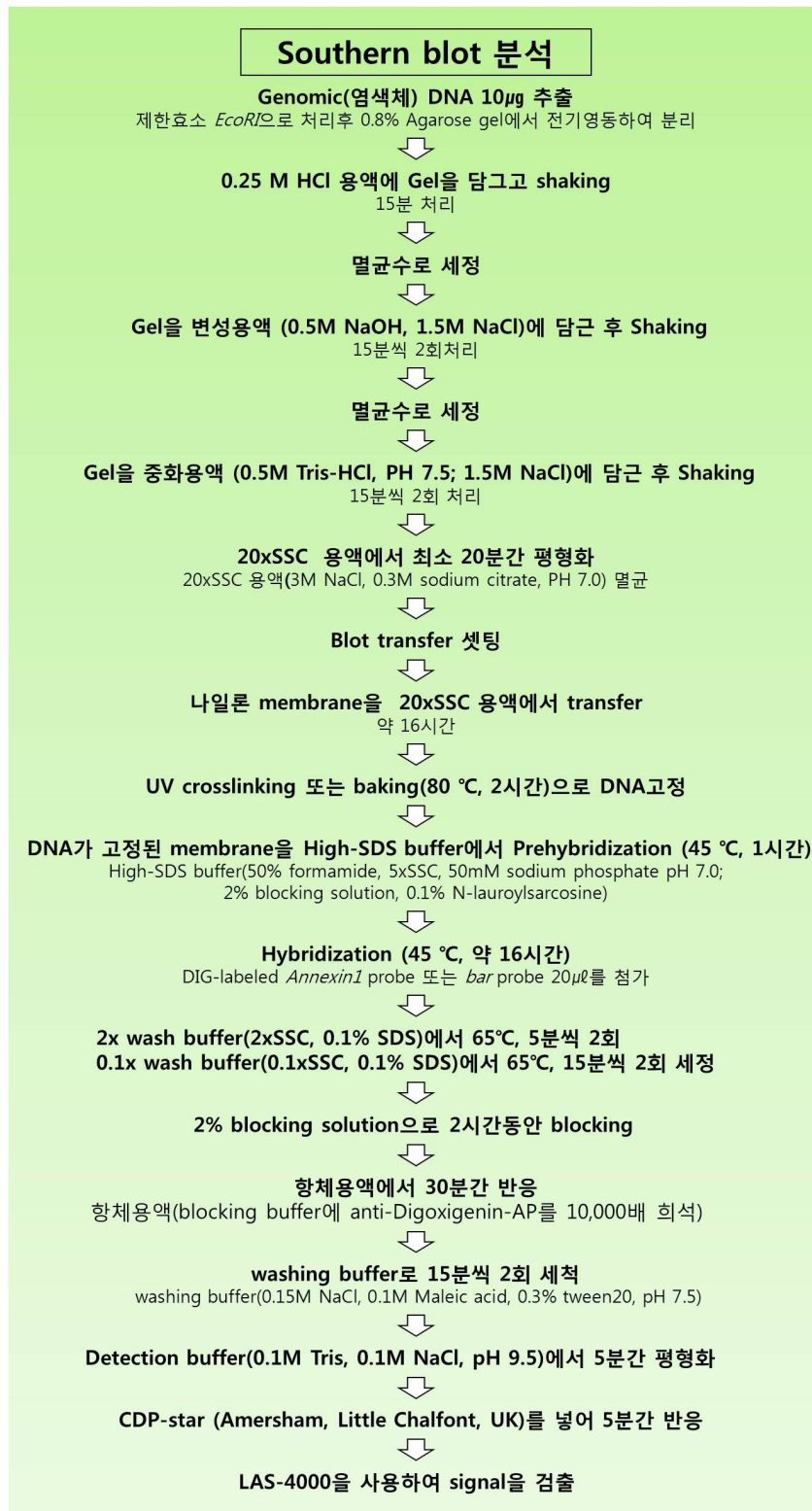


Fig. 7. Flow chart illustrating the steps of Southern blot analysis.

DNA는 CTAB법 (Murray and Thomson 1980)을 사용하여 추출하였다.

Annexin1 유전자 probe와 *bar* 유전자 probe는 PCR DIG labelling mix kit (Roche)를 이용하여 제조한 후, DNA가 고정된 membrane을 hybridization 용액에 반응시켰다.

4) RT-PCR 분석

야생형과 *Annexin1* 형질전환 식물의 잎을 약 0.1g씩 채취하여 액체질소에 급속 냉각 시킨후, 미리 냉각 시킨 막자사발에 넣고 액체 질소를 부어가며 완전한 분말형태가 될 때까지 분쇄시켰다. 미리 냉각 시킨 2 ml micro tube (Axygen)에 분쇄된 시료를 넣어 제조사에서 제공된 실험방법에 따라 Trizol reagent (Invitrogen, USA) 1 ml과 혼합하여 vortex한 후 상온에서 10분간 정치하였다. 10분 정치후 chloroform 0.2 ml을 넣고 vortex하고 원심분리(15000rpm, 4°C, 15min) 하였다. 상층액을 회수하여 isopropanol을 0.8배량 넣고 잘 섞은 후 12000rpm, 4°C, 15min 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 80% EtOH을 첨가하여 원심분리(12000rpm, 4°C, 5min)한 후, 건조시킨 pellet을 DEPC dH₂O 50 μ l로 용해하였다. 추출한 RNA를 1% Agarose gel에 1 μ g을 전기영동하여 확인하고 spectrophotometer를 이용하여 정량하였다. cDNA합성은 확인된 1 μ g의 RNA를 0.5 μ g의 oligo dT primer와 혼합하여 70°C에서 5분간 수행한 후 얼음에 정치해 M-MLV 10x reaction buffer, 10mM dNTP (TakaRa), 200unit M-MLV reverse transcriptase (Promega), DEPC dH₂O를 혼합한 후 42°C에서 70분간 반응시켜 합성하였다. 합성한 cDNA에서 *Annexin1* 유전자의 발현을 확인하기 위해 Fig. 8 과 같은 반응액 조성과 PCR조건에서 RT-PCR을 수행하였다. *Annexin1* 유전자 특이적 primer인 forward primer 5'-GGA TGG GGT ACG AAC GAG GAC TT-3'와 reverse primer 5'-CTG TTC CTG CGC TGG TAC TCC TC-3'를 사용하여 954bp의 PCR 산물을 얻었다.

RT-PCR 반응액	RT-PCR 조건
cDNA 1 μ g	95 $^{\circ}$ C 5분
10 \times buffer(TakaRa) 2 μ l	pre-denaturation 후
25mM dNTP(TakaRa) 1 μ l	95 $^{\circ}$ C 60초
forward primer 0.2 μ l	60 $^{\circ}$ C 30초
reverse primer 0.2 μ l	72 $^{\circ}$ C 60초
Ex Taq polymerase(TakaRa) 0.2 μ l	의 조건으로 36cycles 수행후
+ SDW to 20 μ l	72 $^{\circ}$ C 10분

Fig. 8. RT-PCR reaction solution and condition for *Annexin1* gene.

합성한 cDNA에서 18s rRNA의 발현을 확인하기 위해 Fig. 9와 같은 반응액 조성과 PCR조건에서 RT-PCR을 수행하였다. 조직 특이적인 유전자 발현 마커인 18s rRNA는 forward primer 5'-ATG ATA ACT CGA CGG ATC GC-3'와 reverse primer 5'-CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA-3'를 사용하여 303 bp 크기의 PCR 산물을 얻었다.

RT-PCR 반응액	RT-PCR 조건
genomic DNA 25ng	95 $^{\circ}$ C 5분
10 \times buffer(TakaRa) 2 μ l	pre-denaturation 후
25mM dNTP(TakaRa) 1 μ l	95 $^{\circ}$ C 60초
forward primer 0.2 μ l	60 $^{\circ}$ C 30초
reverse primer 0.2 μ l	72 $^{\circ}$ C 30초
Ex Taq polymerase(TakaRa) 0.2 μ l	의 조건으로 30cycles 수행후
+ SDW to 20 μ l	72 $^{\circ}$ C 10분

Fig. 9. RT-PCR reaction solution and condition for 18s rRNA.

증폭된 산물은 1% Agarose gel에 loading하여 전기영동한 후 확인하였다.

4) 들잔디의 형질전환 효율조사

들잔디의 형질전환 효율은 형질전환에 사용한 캘러스 수로부터 얻어진 형질전환 식물의 수를 백분율로 나타내었다.

5. *Annexin1*-형질전환 들잔디의 특성조사

1) 산화 스트레스 조건하에서의 특성조사

산화스트레스 처리는 3 mM MES 및 10 mM H₂O₂를 포함하는 용액에 형질전환 잔디 및 야생형 잔디 잎절편을 약 3 cm 길이로 침지하여 25±2°C, 암조건에 처리하고 시간경과에 따른 phenotype 변화를 측정하여 분석하였다.

2) 건조 스트레스 조건하에서의 특성조사

내건성 검증을 위해 25±2°C, 상대습도 60±10%, 16h light/8h dark으로 조절되는 조건에서 토양에 순화하여 증식한 야생형 잔디와 *Annexin1* 형질전환 식물에 물 공급을 중단한 후, 시간경과에 따른 phenotype의 변화 및 수분함량의 변화를 측정하여 분석하였다. 수분함량 측정은 3일에 1번씩 각 식물체로부터 약 0.1g 씩 잎을 채취하여 중량을 측정하고, 각 샘플을 65°C에서 72시간 건조한 후 건조 중량을 측정하여 수분함량을 조사하였다.

3) 염 스트레스 조건하에서의 특성조사

내염성 검증을 위해서 토양에 순화하여 증식한 야생형 잔디와 *Annexin1* 형질전환 식물에 300 mM의 NaCl을 처리하여 (25±2°C, 상대습도 60±10%, 장일조건) 시간경과에 따른 phenotype의 변화 및 클로로필 함량의 변화를 측정하여 분석하였다. 들잔디의 엽록소 함량은 휴대용 측정기 SPAD-502 (Minolta, Japan)를 이용하여 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 들잔디의 조직배양 및 형질전환 조건의 검토

1) 캘러스의 유도 및 선발

형질전환에 사용할 캘러스는 재료의 안정적인 확보가 가능하고 비교적 배양이 쉬운 들잔디의 성숙종자에서 유도하였다. 품종 차이에 따른 캘러스 유도율, 형질전환 효율 등을 비교 평가하기 위해 ‘덕창’과 ‘미성’ 두 품종의 성숙종자를 구입하여 사용하였다. 들잔디의 성숙종자를 캘러스 유도배지(Table 1)에 치상하고(Fig. 10a), 약 4~6주 후에 유도된 캘러스에서 밝고 노란색을 띤 캘러스 부분만을 선발하여(Fig. 10c), 캘러스 증식배지(Table 1)로 계대배양 하였다. 매 4주마다 계대배양하며 밝고 노란색이며 compact한 형태의 재분화능이 좋은 캘러스만이 증식될 때까지 선발을 수행하였다(Fig. 10).

2) 캘러스의 증식 및 유지

캘러스 증식배지에서 매 4~5주 간격으로 계대배양하며 재분화가 잘되는 형태의 캘러스, 즉 밝고 노란색을 띠며, compact하고, 부서지기 쉬운 형태의 캘러스만이 증식할 때까지 선발하였다. Fig. 11a는 캘러스 유도 후 약 3개월간 선발/증식한 캘러스의 사진이다. 재분화가 잘되는 형태의 캘러스만 분리하여 배양하여도 다른 형태의 캘러스가 생성되고 있는 것을 알 수 있다. 이렇게 재분화능이 좋은 캘러스 이외의 캘러스가 혼합된 캘러스는 형질전환에 적합하지 않다. 따라서 균일한 형태의 캘러스(Fig. 11b)만이 증식할 때까지 지속적인 선발을 수행할 필요가 있었다. 균일한 형태의 재분화가 잘되는 캘러스의 선발에는 약 6-12개월이 소요되었다. Toyama 등 (2003)은 들잔디의 성숙종자로부터 유도된 캘러스를 4 type으로 분류하였다. 노란색을 띠며 분화가 진전된 조직 구조를 보이는 Type I 캘러스, 희고 치밀하며 표면이 단단한 Type II 캘러스, 노랗고 치밀한 조직이지만 부서지기 쉬운 Type III 캘러스, 부드럽고 물기가 있는 Type IV 캘러스로 분류하였다.

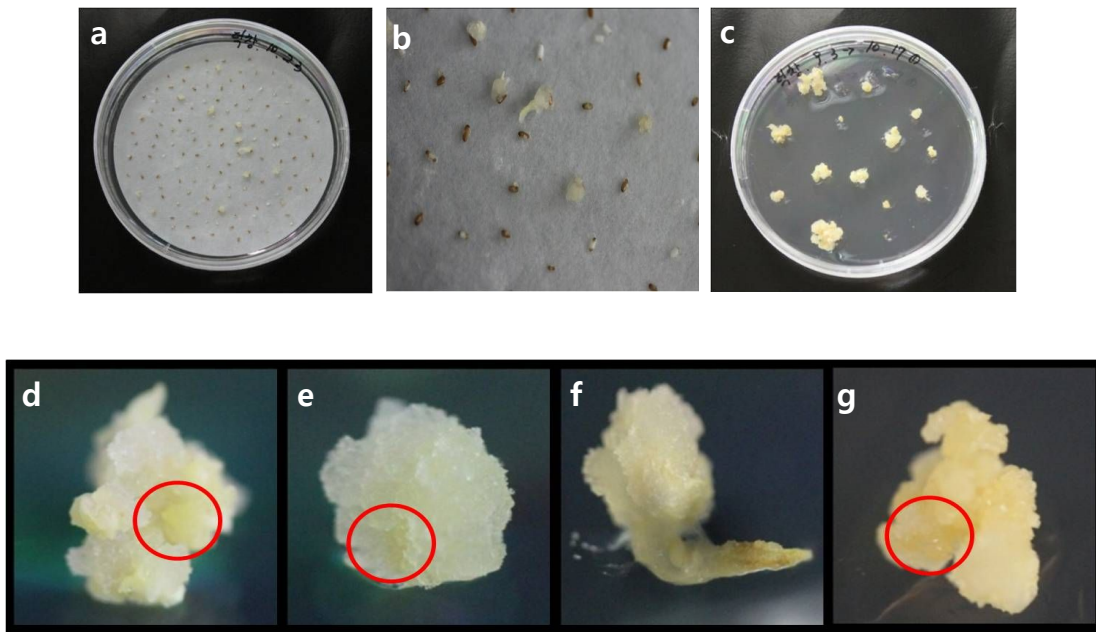


Fig. 10. Photographic representation of callus induction from mature seeds of zoysiagrass. a, Callus induction from mature seed; b, Callus after 2 weeks of induction; c, Callus after 4~6 weeks from mature seed; d-g, Callusing responses of caryopsis after 4~6 weeks from mature seed.



Fig. 11. Photographic representation of zoysiagrass callus selection. a, Callus growth and selection after about 3 months after induction. b, Yellow colored calli selected for this study.

본 연구에서는 주로 노랑고 치밀한 조직이지만 부스러지기 쉬운 Type III 켈러스를 확보할 수 있었고, 희고 치밀하며 표면이 단단한 Type II 켈러스도 얻을 수 있었다. 두 타입 모두 높은 재분화 능력을 보여주었고, 이러한 결과는 Bae 등 (2001)과 Toyama 등 (2003)의 결과와 일치한다. 그러나 Type II 켈러스는 감염 후, *Agrobacterium*의 증식이 심해 신초가 나오기 전에 갈변이 되어 들잔디 형질 전환에는 적합하지 않았기 때문에, 노랑고 치밀한 조직이지만 부스러지기 쉬운 Type III 켈러스를 선발하여 증식하였다. 들잔디의 효율적인 형질전환을 위해서는 증식이 빠르고 재분화가 잘 되는 형태의 켈러스 계통을 선발하여, 균일한 형태로 유지 및 증식하는 것이 매우 중요할 것으로 보인다.

3) 선발한 켈러스의 재분화 테스트

들잔디 성숙종자 유래의 켈러스로부터 균일한 형태의 켈러스만이 증식할 때까지 지속적으로 선발한 후, 선발한 켈러스 계통들의 재분화 효율을 평가하였다 (Fig. 12a-g). 여기서 재분화 효율이 90% 이상인 계통만을 유지/증식하면서 형질 전환에 사용하였다. 이 연구에서는 ‘미성’과 ‘덕창’ 두 품종의 성숙종자를 이용하여 켈러스 계통을 선발하였고(Fig. 12), 재분화 테스트를 거쳐 재분화 효율이 90% 이상이었던 4개 계통(‘미성’ 두 계통, ‘덕창’ 두 계통)(Fig. 12h-i)을 이용하여 형질 전환을 수행하였다.

4) *Agrobacterium* 배양

목적 유전자를 삽입한 binary vector를 형질전환한 *Agrobacterium* strain EHA105의 stock 용액을 YEP 액체배지에 직접 넣고 28°C, 200rpm에서 24시간 배양하여 형질전환에 사용하였다. *Agrobacterium* stock 용액을 고체 배지에 도말/배양하여 single colony를 선발한 후, 형질전환에 사용할 *Agrobacterium*을 배양했던 기존 방법에 비해, 본 연구에서 사용한 직접배양법은 배양시간을 단축할 수 있는 이점을 가지면서 형질전환 효율에는 큰 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.

5) 전배양

형질전환에 사용할 식물 조직을 *Agrobacterium* 접종 전에 전배양배지에 처리

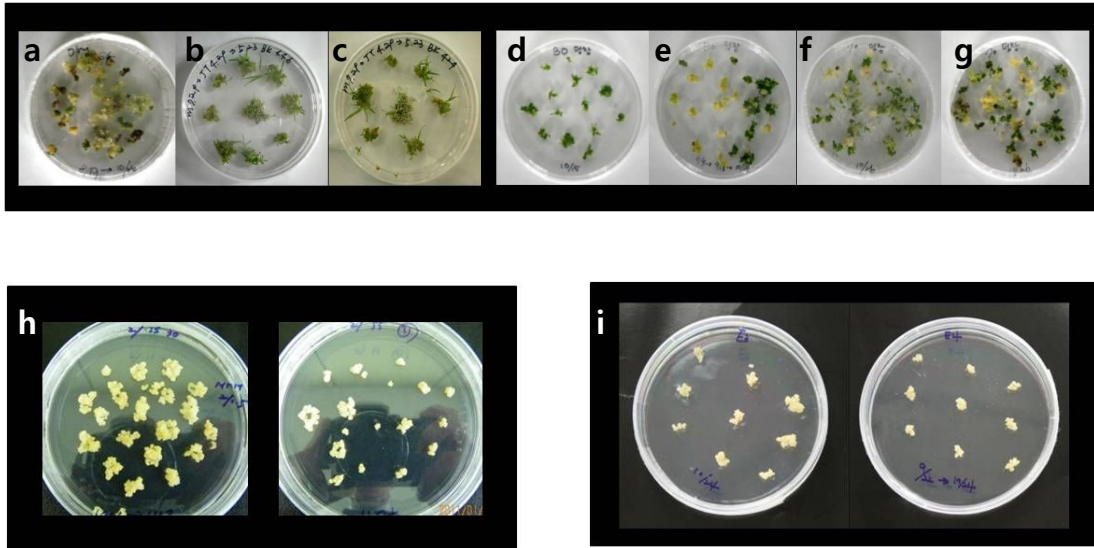


Fig. 12. Regeneration test of selected zoysiagrass callus. a~c, from Misung callus; d~g, from Ducchang callus; h, Misung callus selected for this study; i, Ducchang callus selected for this study.

하면 형질전환효율이 높아진다고 보고되었고 (Hiei et al. 1997; Cardoza and Stewart 2003), 현탁배양에 의한 전배양은 캘러스의 증식속도가 기존의 고체배양법보다 빠르다고 보고되었으며 (Sun et al. 2010), 칼슘을 포함하지 않은 배지를 사용하면 형질전환 효율이 증대된다고 보고되었다 (Toyama et al. 2003; Montoro et al. 2000). 그러나 현탁배양을 통한 전배양 및 칼슘을 첨가하지 않은 액체배지에서의 캘러스 전배양은, 조직이 경화되거나 공동배양 후 캘러스 주위에 *Agrobacterium*이 지속적으로 증식하여 신초를 형성하지 못하였고, 신초를 형성하더라도 *Agrobacterium*의 과잉 증식으로 곧 고사하는 문제점이 있었다. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환시 전배양 기간은 3일이 적절한 것으로 보고되었지만 (Hiei et al. 1997; Seo et al. 2002), 들잔디의 경우 고체배지에서 2~3주 정도가 가장 적합한 것으로 보인다.

6) *Agrobacterium* 감염

식물의 형질전환 효율을 증가시키기 위하여, 보통 배양재료의 종류 및 genotype, binary vector의 종류, 선발마커 유전자 및 항생제의 선택, 공동배양조건 및 항산화제의 사용 등과 같은 조건검토가 필요하며 (Hiei et al. 1997; Somers et al. 2003), 여러 가지 아미노산을 배지에 첨가하기도 한다 (식물형질전환 2007). 식물의 효율적인 형질전환을 위해서는 이와 같은 여러 가지 조건의 검토가 필요하지만, 특정 유전자를 안정적으로 식물의 염색체 내로 도입시키기 위해서는 감염방법과 시간이 특히 중요하다고 생각된다. 일반적인 식물의 형질전환에서는 감염시간으로 15~50분 (식물형질전환 2007)이 적합하지만, 들잔디의 형질전환을 위한 *Agrobacterium* 감염은 OD_{600nm}에서의 흡광도가 약 0.1이 되도록 현탁한 *Agrobacterium* 현탁액에서 24시간 감염하여 수행하였다(Fig. 13A). 이 조건에서 감염 후 3일간 공동배양하면, 초음파 처리 후 감염하여 3일 공동배양한 조건 (Fig. 13c, Sun et al. 2010)과 1분간 감염하여 9일간 공동배양한 (Fig. 13e, Toyama et al. 2003) 조건에서의 감염 효율과 비슷한 정도의 높은 감염 효율을 보인다고 보고되었다 (Sun et al. 2010). 본 연구에서도 '미성' 계통의 캘러스를

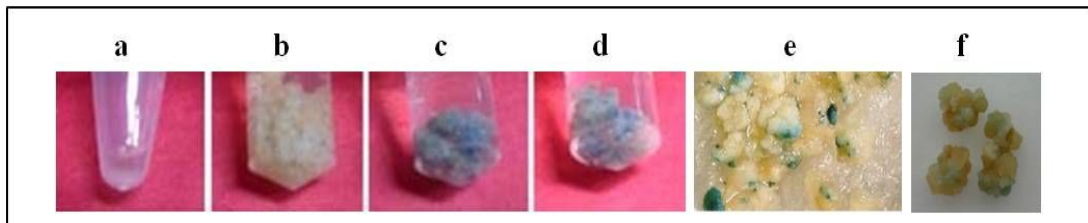
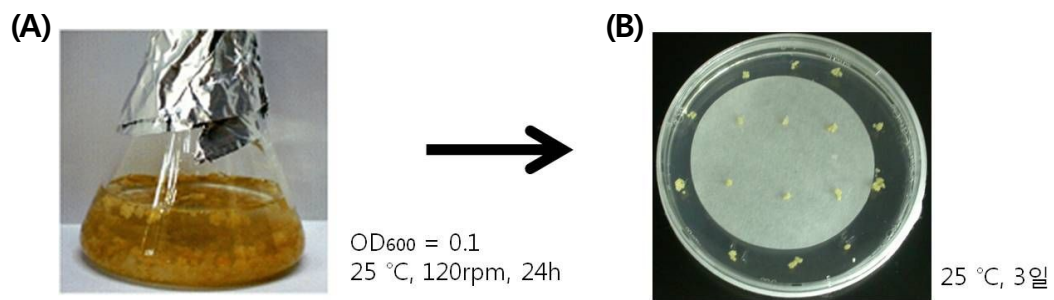


Fig. 13. *Agrobacterium* infection and Co-cultivation for transformation of zoysiagrass and GUS staining of infected calli.

(A), *Agrobacterium* infection; (B), Co-cultivation; a, *Agrobacterium* cells; b, embryogenic calli infected with *Agrobacterium* for 30 min; c, embryogenic calli infected with *Agrobacterium* for 30 min after sonication; d, embryogenic calli infected with *Agrobacterium* for 24h with shaking(a~d adopted from Sun et al. 2010); e, embryogenic calli infected with *Agrobacterium* for 1 min(9 days Co-cultivation)(adopted from Toyama et al. 2003); f, Misung calli infected with *Agrobacterium* for 24h(3 days Co-cultivation).

*Agrobacterium*의 농도를 OD_{600nm} = 0.1로 조정된 감염배지에서 24시간 현탁배양의 방법으로(Fig. 13A) 감염한 결과, 이와 비슷한 정도의 감염 효율을 얻을 수 있었다(Fig. 13f).

7) 공동배양

형질전환을 위한 공동배양은 암조건에서 3일간 실시하였다(Fig. 13B). Canola (*Brassica napus* L.)의 경우 공동배양 시간에 따라 형질전환 효율에 큰 차이가 있다고 보고되었으나 (Cardoza and Stewart 2003), 일반적으로 단자엽식물에서의 공동배양은 2~3일이 적합한 것으로 보고되었다 (Cheng et al. 1997; Dong et al. 1996; Rashid et al. 1996; Hiei et al. 1994). 그 이상의 공동배양기간은 형질전환 효율을 증가시키지만 (Cervera et al. 1998; Dong and McHughen 1991; Suzuki et al. 2001; Toyama et al. 2003), 공동배양 기간이 길어지면 형태적으로 변형이 생긴다고 하였다 (식물형질전환 2007). *Agrobacterium*의 공동배양 기간은 식물에 따라 조금씩 다를 수 있지만, 들잔디 캘러스를 이용한 형질전환에서 3일 이상의 공동배양은 *Agrobacterium*의 지나친 증식으로 균의 제거가 곤란하였고, 2일 공동배양은 감염 효율의 저하로 많은 escape 식물체가 나타났다. 본 연구에서 수행한 24시간 감염 후 3일간 공동배양한 캘러스(Fig. 13f)는 1분간 감염 후 9일간 공동배양한 캘러스 (Fig. 13e, Toyama et al. 2003)와 비슷한 정도의 감염 효율을 보였다. 이들 결과에서 들잔디의 형질전환을 위한 공동배양은 3일이 적합하다고 판단된다.

8) *Agrobacterium* 제거

공동배양 후 *Agrobacterium*을 제거하기 위한 washing은 오염을 제거할 수 있는 중요한 단계라고 하였다 (식물형질전환 2007). 공동배양 후 *Agrobacterium*을 제거하기 위하여 물이 투명해질 때 까지 반복 washing하였고 마지막에는 세포탁심을 250 mg/L가 되도록 첨가하여 washing하였으나 균의 증식은 여전히 있었고 신초의 분화는 감소되는 결과를 보였다. Toyama 등 (2003)은 이러한 방법으로 제조체 저항성 유전자가 도입된 형질전환 들잔디를 제조하였지만 형질전환 효율은 약 1%정도로 낮았다. 세포탁심을 이용한 washing은 균을 제거하지만 (식물형질

전환 2007), 식물의 재분화도 억제하며 (Bae et al. 2007), 완전히 제거되지 않은 *Agrobacterium*의 증식은 신초의 분화를 감소시킨다는 것이 알려져 있다 (Cervera et al. 1998). 이러한 결과들을 종합하여 본 연구에서는 감염 시의 균 농도를 낮추고 감염시간을 길게 하였으며, 공동배양 후의 washing 조작을 생략하였다. 그 결과, *Agrobacterium*의 과잉증식은 관찰되지 않았으며 신초의 분화도 잘 되는 결과를 얻을 수 있었다.

9) 형질전환 캘러스 선발

*Agrobacterium*과 공동배양한 캘러스를 감염 및 공동배양과 동일한 성분의 선발배지(Table 1)에 치상한 후 두 단계로 나누어 형질전환 캘러스의 선발을 수행하였다. *Agrobacterium* EHA105와 공동배양 한 캘러스를 PPT 1 mg/L가 첨가된 선발배지에서 1주일간 선발한 다음, PPT가 5 mg/L의 농도로 포함된 선발배지에서 2주간 선발하였다(Fig. 14). 이와 같은 캘러스 선발 조건을 설정한 이유는 처음부터 높은 농도의 PPT가 포함된 배지에서 캘러스를 선발했을 경우에는 재분화 식물체를 거의 얻을 수가 없었으며 (Chang et al. 1991; Schreuder et al. 2001), 지속적으로 낮은 농도에서 선발했을 경우에는 유전자가 도입되지 않은 escape 식물체가 다량 생성되었기 때문이다. 선발초기에는 캘러스의 증식억제와 갈변이 진행되는 현상이 관찰 되었으나, 일부 캘러스의 경우 갈변된 캘러스로부터 PPT에 저항성을 나타내는 새로운 캘러스의 증식이 관찰되었다. 이와 같이 캘러스 선발 시의 PPT 농도를 조절한 결과, 지속적인 높은 PPT 농도에서 선발하였을 때 보다 재분화 효율은 증가하고, 지속적인 낮은 농도에서 선발하였을 때 보다 escape는 줄어드는 것을 알 수 있었다.

10) 형질전환 Shoot 유도 및 선발

캘러스 선발 후 갈변하지 않은 캘러스만을 선발하여 재분화 배지(Table 1)에 치상하여 형질전환 shoot를 유도하였다. 그 결과, 배양 후 3일째부터 캘러스 주위에 green spot의 생성이 관찰되었으며, 배양 2주후에는 거의 모든 캘러스에서 green spot과 신초의 분화가 관찰되었다(Fig. 15A-B). Shoot 선발 초기에는 3 mg/L의 PPT가 포함된 배지에서 선발하였고, 여기서 정상적으로 성장하는 shoot

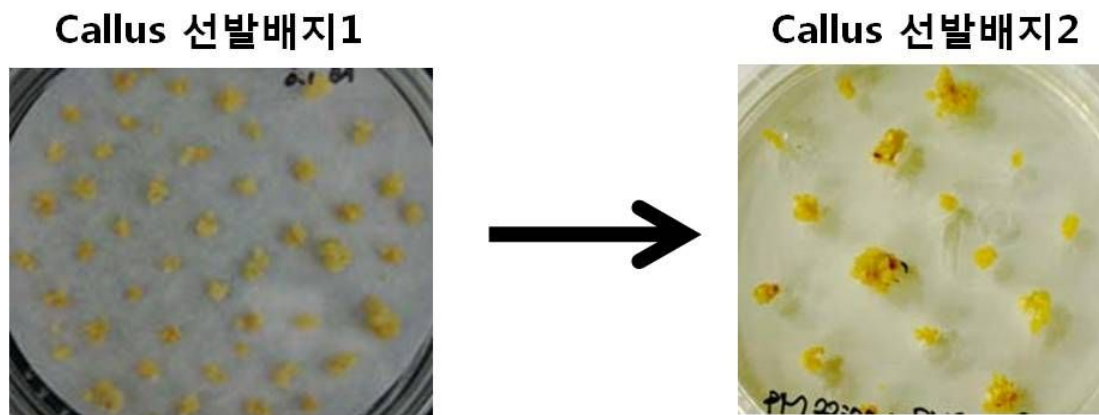


Fig. 14. The selection of transgenic callus was performed in 1st-callus selection medium containing PPT 1 mg/L for 1 weeks and then in 2nd-callus selection medium containing PPT 5 mg/L for 2 weeks.

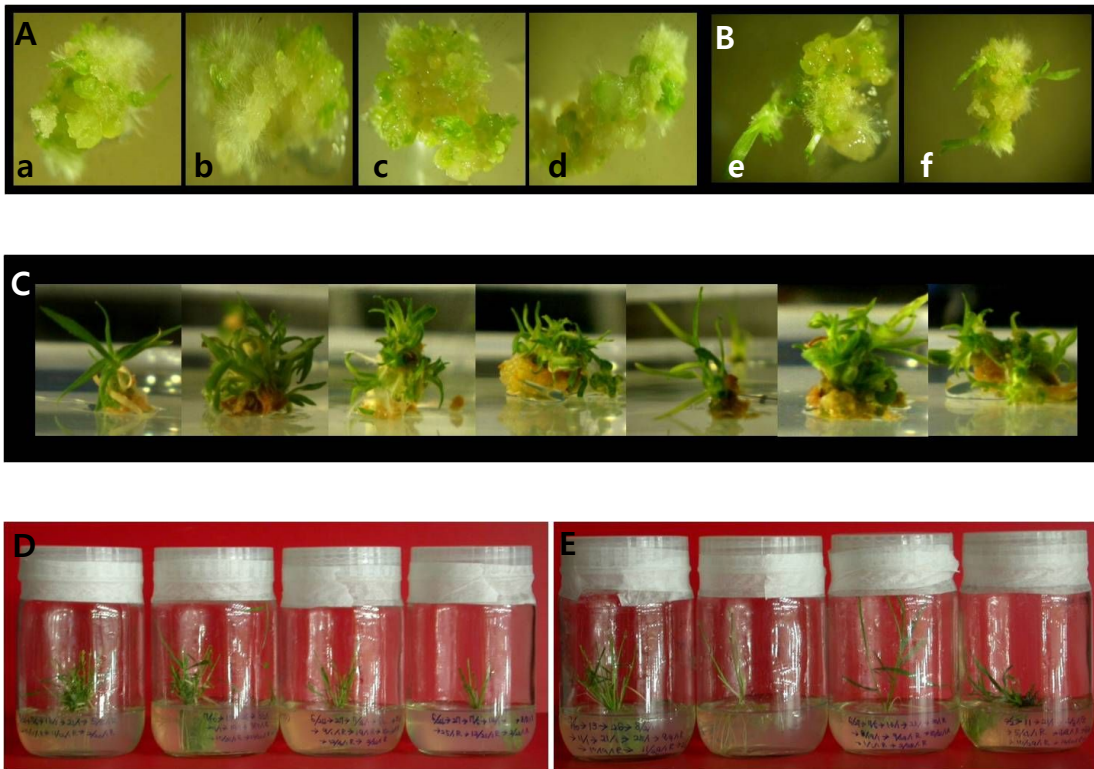


Fig. 15. Embryogenic calli formation (A and B), shoot induction (C) and root induction (D and E) from transformed callus of zoysiagrass.

를 PPT 1 mg/L가 포함된 배지로 계대배양 하여 shoot의 빠른 증식을 유도하였다. 형성된 shoot들을 캘러스와 함께 또는 shoot만 분리하여 재분화배지에 계대배양 하였다(Fig. 15C). 계대배양 후 녹색을 띠며 잘 성장하는 shoot는 root 선발배지로 계대배양 하였고, 성장을 멈추고 백화되는 shoot와 재분화가 되지 않고 갈색으로 변한 캘러스는 멸균하여 폐기하였다.

11) 형질전환 Shoot 증식 및 Root 유도

Shoot 유도 및 선발배지에서 고사하지 않고 약 2~3cm 이상 성장한 shoot를 PPT가 첨가된 root 선발배지로 이식하여 root를 유도하였다(Fig. 15D-E). Root가 형성되지 못하거나 백화되는 개체 또는 성장을 멈추는 개체들도 있었지만, 대부분의 shoot는 root를 형성하였다. Root 선발배지에서 root가 유도된 개체들에 한하여 PAT strip test를 이용한 형질전환체의 선발을 수행하였다. PAT 단백질의 발현이 확인된 형질전환체는 화분에 순화하여 GM온실에서 증식하였고, 이들 개체를 이용하여 유전자의 도입 및 발현을 확인하고 기능분석을 수행하였다.

2. 형질전환 식물의 선발, 유전자 도입 및 발현 확인

1) PAT 단백질의 발현 확인을 통한 형질전환체의 선발

Root 선발배지에서 root를 형성하고 잘 증식하는 식물체를 선발하여(Fig. 16-1a, Fig. 17-1a, Fig. 18-1a, Fig. 19-1a) PAT strip test를 통해 형질전환체의 선발을 수행하였다. 그 결과, *Annexin1*-형질전환식물체는 총 11개체에서(Fig. 16-1b), *ATHG1*-형질전환식물체는 총 54개체에서(Fig. 17-1b), *ATPG7*-형질전환식물체는 총 13개체에서(Fig. 18-1b) 그리고 *ATPG8*-형질전환식물체는 총 18개체에서(Fig. 19-1b) PAT 단백질의 발현을 확인하였다. 또한, vector control들인 E9-공백터 1개체(Fig. 16-1b)와 IG2-공백터 2개체에서도(Fig. 17-1b) PAT 단백질의 발현을 확인 할 수 있었다. PAT 단백질의 발현이 확인된 형질전환 후보체들은 genomic PCR을 통하여 목적 유전자의 도입을 확인하였다.

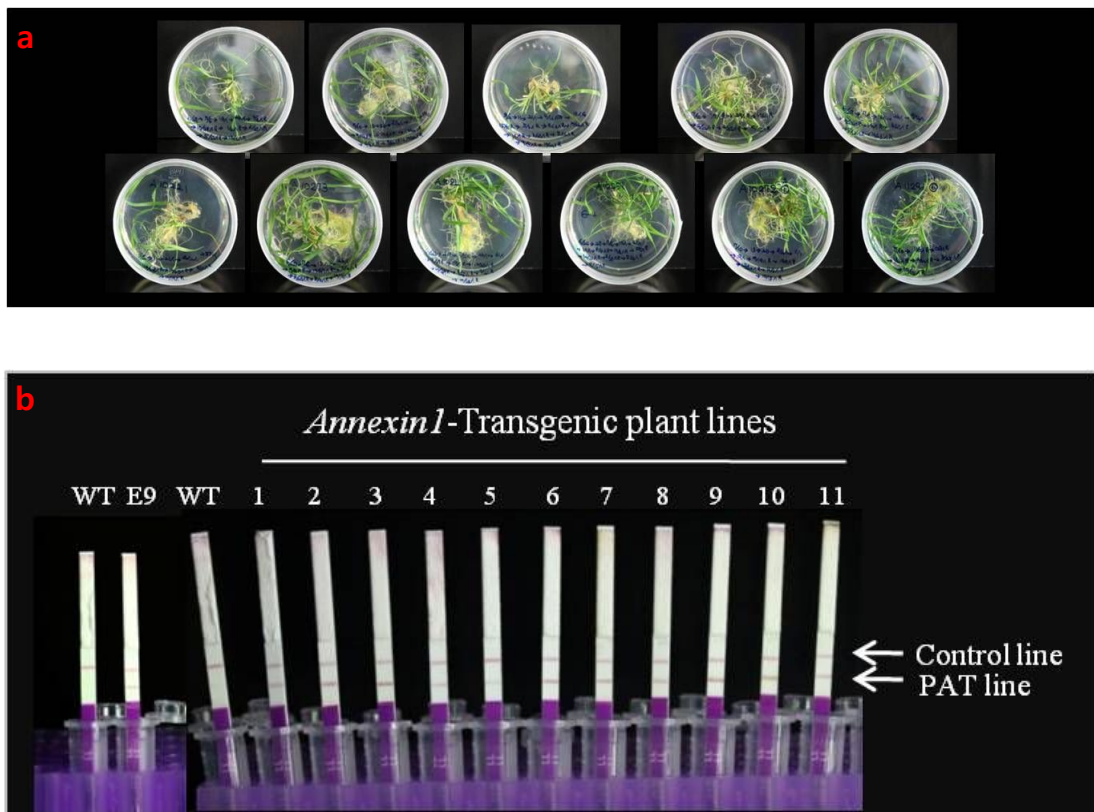


Fig. 16-1. Production of putative transgenic zoysiagrass introducing *Annexin1* gene (a) and PAT strip test analysis (b). WT, wild-type plant; E9, control plant introduced E9 vector only; 1-11, putative transgenic plant lines.

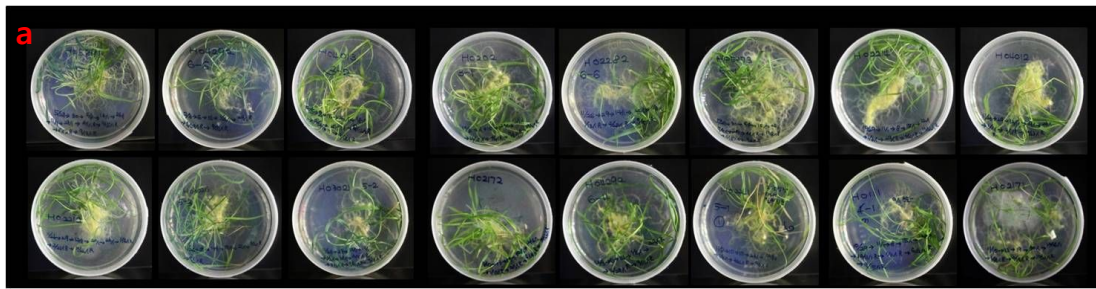


Fig. 17-1. Production of putative transgenic zoysiagrass introducing *ATHG1* gene (a) and PAT strip test analysis (b). WT, wild-type plant; IG2, control plant introduced IG2 vector only; 1-16, putative transgenic plant lines.

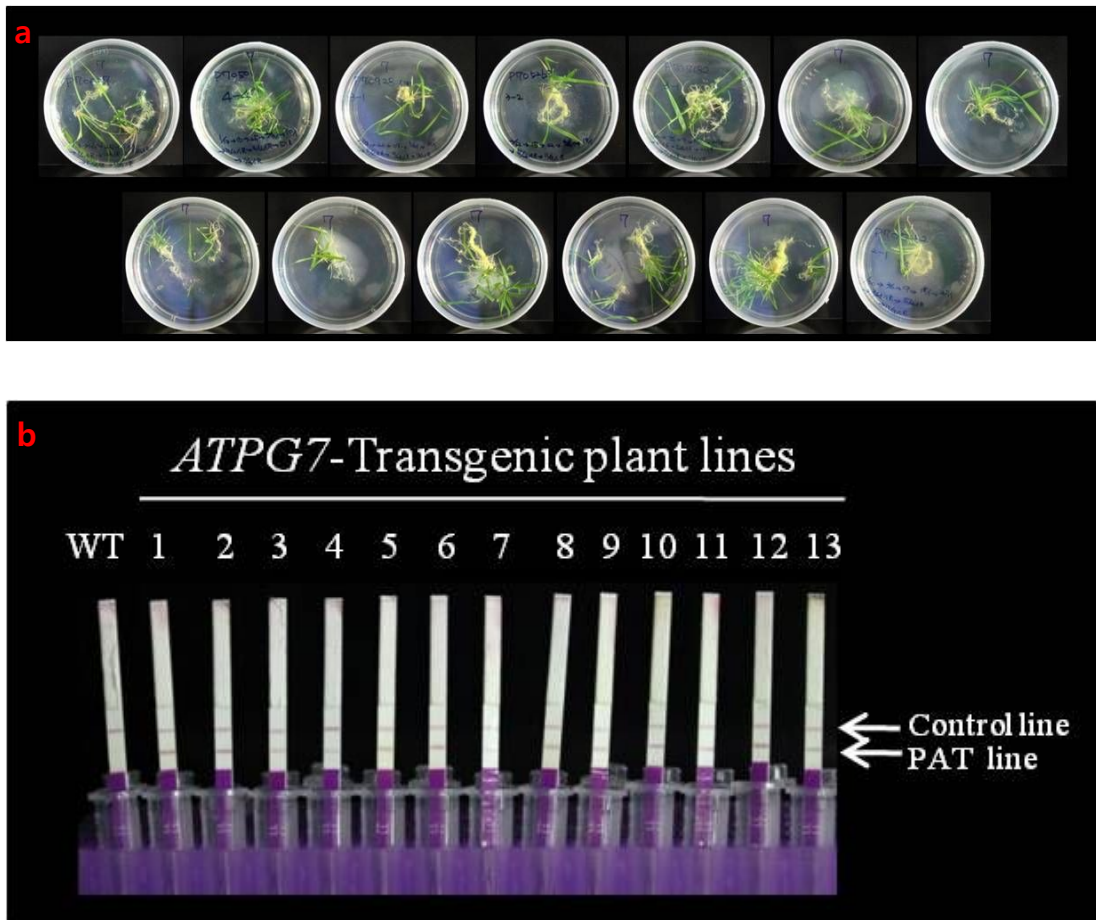


Fig. 18-1. Production of putative transgenic zoysiagrass introducing *ATHG7* gene (a) and PAT strip test analysis (b). WT, wild-type plant; 1-13, putative transgenic plant lines.

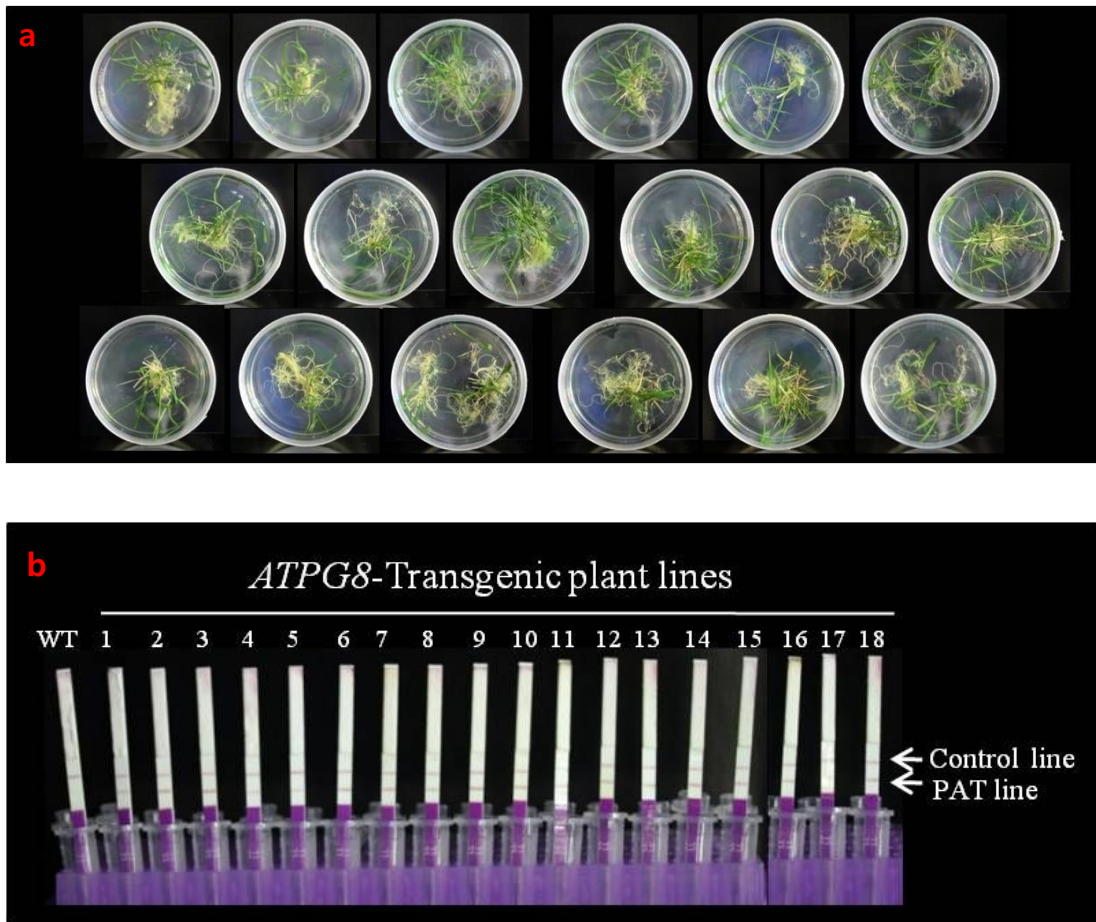


Fig. 19-1. Production of putative transgenic zoysiagrass introducing *ATHG8* gene(a) and PAT strip test analysis(b). WT, wild-type plant; 1-18, putative transgenic plant lines.

2) 염색체 DNA추출 및 PCR

① *Annexin1*

PAT strip test를 통하여 선발한 *Annexin1* 형질전환식물체의 염색체내에 목적 유전자의 도입 여부를 확인하기 위하여, 잎 조직으로부터 염색체 DNA를 추출하여 PCR 분석을 수행하였다(Fig. 16-2). 그 결과 야생형 식물에서는 어떠한 증폭산물도 관찰되지 않은 반면, PAT strip test를 통하여 선발한 11개체의 형질전환 식물체에서는 모두 954bp의 *Annexin1* 유전자 특이적 증폭산물이 관찰되었다. 이 결과로부터 11개체의 *Annexin1* 형질전환 들잔디가 제조되었음을 확인할 수 있었고, PAT strip test를 통한 형질전환 식물의 선발은 형질전환 식물의 간편한 확인에 매우 유용한 수단임을 알 수 있었다. genomic-PCR을 통하여 목적유전자의 도입이 확인된 *Annexin1* 형질전환 식물은, Southern blot 분석을 수행하여 도입 유전자의 copy 수를 확인하고, RT-PCR를 통하여 목적유전자의 발현을 확인한 다음, 순화/증식한 형질전환 식물을 이용하여 그 특성을 조사하였다.

② *ATHG1*, *ATPG7*, *ATPG8*

Root 선발배지에서 선발한 *ATHG1*(Fig. 17-1a), *ATPG7*(Fig. 18-1a), *ATPG8*(Fig. 19-1a) 형질전환 식물체를 PAT strip test를 통해 형질전환 식물을 선발한 후(Fig. 17-1b, 18-1b, 19-1b), 이 식물들에 목적유전자가 도입되었는지를 확인하기 위해 genomic-PCR을 수행한 결과, *ATPG7*, *ATPG8* 형질전환 식물체는 각각 13개체, 18개체 모두에서 목적 유전자가 도입되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 18-2, 19-2). 또한 *ATHG1* 형질전환 식물체의 경우 PAT strip test를 통해 총 54개체의 형질전환체를 선발 할 수 있었고, 이 중 16개체를 무작위로 선택하여 목적 유전자인 *ATHG1* 유전자가 도입되었는지를 확인하기 위해 PCR을 수행한 결과, 16개체 모두에서 *ATHG1* 유전자가 도입되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 17-2).

3) RT-PCR 분석

유전자의 도입이 확인된 *Annexin1*-형질전환 식물에서의 *Annexin1* 유전자의 발현을 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다(Fig. 16-3). 그 결과, 형질전환 식물



Fig. 16-2. Detection of the *Annexin1* gene by genomic-PCR analysis in transgenic zoysiagrass. M, 100bp size marker; WT, wild type plant; 1-11, putative transgenic plant lines.



Fig. 17-2. Detection of the *ATHG1* gene by genomic-PCR analysis in transgenic zoysiagrass. M, 100bp size marker; WT, wild type plant; 1-16, putative transgenic plant lines.



Fig. 18-2. Detection of the *ATPG7* gene by genomic-PCR analysis in transgenic zoysiagrass. M, 100bp size marker; WT, wild type plants; 1-13, putative transgenic plant lines.



Fig. 19-2. Detection of the *ATPG8* gene by genomic-PCR analysis in transgenic zoysiagrass. M, 100bp size marker; WT, wild type plants; 1-18, putative transgenic plant lines.

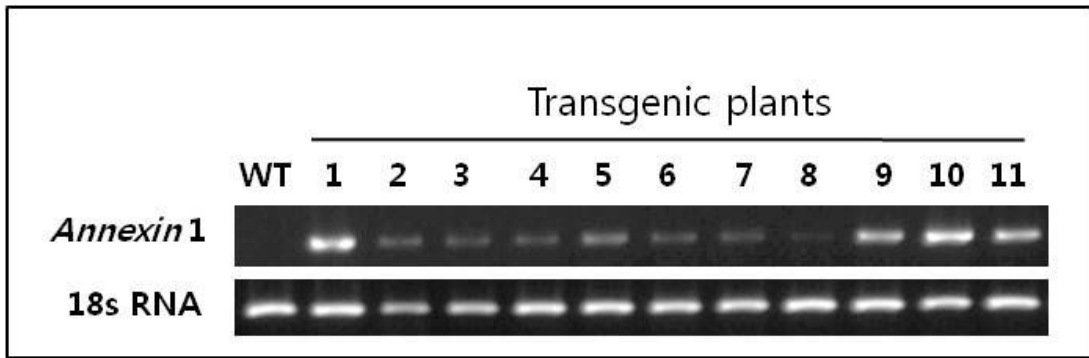


Fig. 16-3. RT-PCR analysis of *Annexin1*-transgenic zoysiagrass. WT, wild type plant; 1-11, transgenic plant lines.

에서는 모두 *Annexin1* 유전자가 발현하고 있음을 확인하였고 야생형 식물에서는 발현하지 않음을 확인하였다.

4) Southern blot 분석

Annexin1 형질전환 식물의 도입유전자 수를 확인하기 위해 형질전환 식물로부터 추출한 genomic DNA를 이용하여 Southern blot 분석을 수행하였다. CTAB 법을 이용하여 추출한 genomic-DNA를 T-DNA영역에서 single cut 제한효소인 *EcoRI*을 처리한 후 Dig로 labeling한 *Annexin1* probe와 *Bar* probe를 사용하여 Southern blot 분석을 수행한 결과, 야생형 잔디에서는 signal 이 검출되지 않았으나 형질전환 식물에서는 signal이 검출되었다(Fig. 16-4b). Southern blot 분석 결과로부터 *Annexin1* 형질전환 식물들에는 one copy에서 수 copy까지 *Annexin1* 유전자가 도입되었음이 확인되었다. *Agrobacterium*을 매개로 하는 형질전환에서는 single copy로 도입되는 빈도가 높지만 (Hiei et al. 1997), 다수 복수 copy의 유전자가 도입된 경우도 있다 (Cheng et al. 1997; Toyama et al. 2003; Zhang et al. 2007). 이 결과로부터 제조한 *Annexin1* 형질전환 들잔디들은 각각 독립적인 라인임을 알 수 있었고, 11개체 중 6개체가 single copy 유전자가 도입되었음을 확인하였다.

3. 들잔디의 형질전환 효율조사

본 연구에서는 개량한 *Agrobacterium*을 매개로하는 들잔디 형질전환 방법을 이용하여 여러 종류의 환경 스트레스 관련 유전자를 도입한 형질전환 식물을 제조하였다. 각 유전자를 도입하여 제조한 형질전환 들잔디의 형질전환 효율을 Table 2에 요약하였다.

*Annexin1*의 형질전환에는 총 4570개의 캘러스를 사용하였고 11개체의 형질전환식물을 제조하였다. 형질전환 효율은 약 0.24%였다. 이와 동시에 vector control인 E9-공백터가 도입된 형질전환 식물도 1개체를 제조하였다. *ATHG1*의 형질전환에는 총 1800개의 캘러스를 사용하였고 54개체의 형질전환 식물을 제조하였다. 형질전환 효율은 약 3%였다. 이와 동시에 vector control인 IG2-공백터가 도입된 형질전환 식물도 2개체를 제조하였다. *ATPG7*의 형질전환에는 총 876

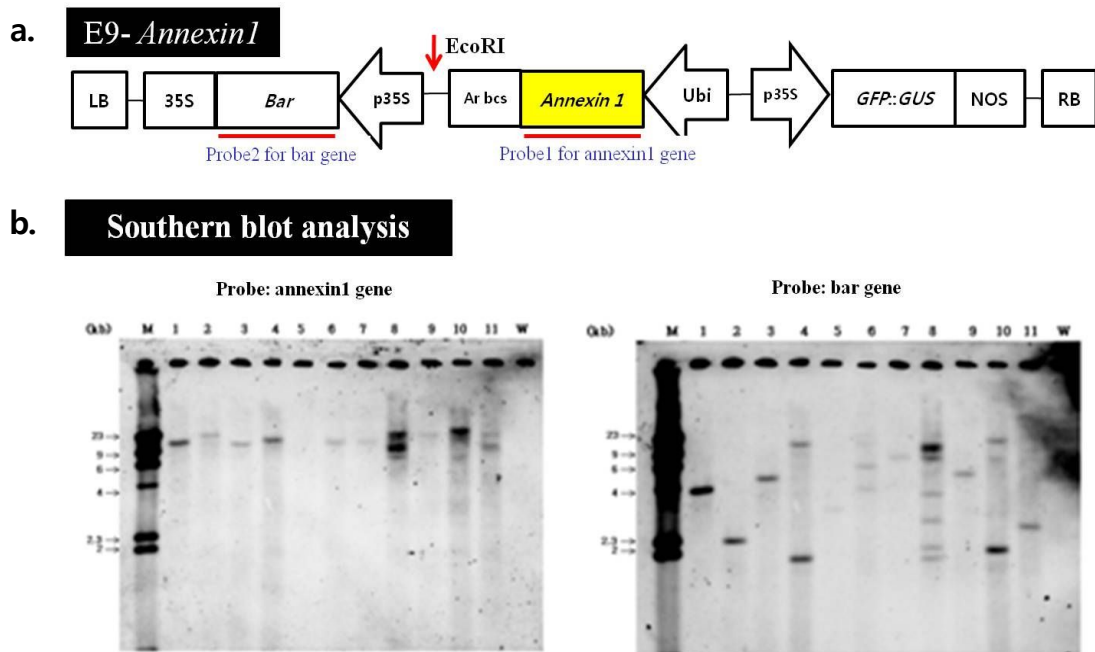


Fig. 16-4. Map of the T-DNA region of the binary vector, E9-*Annexin1* (a) and Southern blot analysis of *Annexin1* transgenic zoysiagrass (b).

Table 2. Transformation efficiencies of zoysiagrass obtained from this study

Transformation efficiencies					
Gene	Cultivar	Infection time	No. of transformed callus	No. of transgenic plant	Transformation efficiencies
Annexin1	Ducchang	36	4570	11	0.24%
ATHG1	Ducchang	12	1800	54	3.00%
ATHG1	Misung	38	5700	0	0.00%
ATPG7	Ducchang	12	876	13	1.48%
ATPG8	Ducchang	10	730	18	2.47%
IG2	Ducchang	2	146	2	1.37%
E9	Ducchang	3	219	1	0.46%

개의 캘러스를 사용하여 13개체의 형질전환 식물을 제조하였다. 형질전환 효율은 약 1.48%였다. *ATPG8*의 형질전환에는 총 730개의 캘러스를 사용하였고 18개체의 형질전환 식물을 제조하였다. 형질전환 효율은 약 2.47%였다. 들잔디의 형질전환 효율은 0~3% 사이였으며 도입유전자에 따라 큰 차이를 보였다. 특히 *ATHG1*의 형질전환에는 ‘미성’ 및 ‘덕창’ 유래의 캘러스를 사용하였으나 ‘미성’에서는 형질전환 식물을 얻지 못하였다. 식물의 형질전환 효율은 매우 다양한 요인에 의해 영향을 받는다. *Agrobacterium*을 이용한 식물의 형질전환 효율에는 작물의 genotype, 배양조직, 선발마커 (Cho et al. 2005a), 배지조성 및 *Agrobacterium* strain (Simmonds and Donaldson 2000)등의 요인들이 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 그 외에 연구자의 숙련도도 영향을 받는다 (Gaba et al. 2004). 이들 요인들 중 단자엽 식물의 형질전환 효율에는 작물의 genotype이 가장 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Hiei et al. 1997). 본 연구에서는 잔디의 품종이 형질전환에 영향을 미치는지를 평가하기 위해, ‘덕창’ 과 ‘미성’ 두 품종을 비교하였다. 그 결과, ‘덕창’ 유래의 캘러스를 이용한 형질전환에서는 0.24-3%의 효율로 형질전환 식물을 얻을 수 있었지만 ‘미성’ 유래의 캘러스를 이용한 형질전환에서는 형질전환 식물을 얻을 수 없었다(Table 2). 이 결과에서 들잔디의 품종차이 즉 genotype의 차이가 형질전환 효율에 큰 영향을 미칠 수 있음을 알 수 있었다. 또한 도입유전자의 종류에 따라서도 형질전환 효율에 큰 차이가 있었는데, 이는 도입 유전자의 종류도 형질전환 효율에 큰 영향을 미칠 수 있음을 시사하는 것으로 보인다.

4. *Annexin1*-형질전환 들잔디의 특성 조사

1) 산화 스트레스 조건하에서 형질전환 식물의 특성 조사

온실에서 순화 증식한 형질전환 잔디 및 야생형 잔디 잎절편을 3 mM MES 및 10 mM H₂O₂를 포함하는 용액에 침지시킨 후, 암조건에 처리하고 phenotype의 변화를 관찰하였다(Fig. 20). 그 결과, 형질전환 식물 5번과 10번 라인에서 야생형에 비해 강한 산화 스트레스에 대한 저항성이 관찰 되었다. 산화 스트레스

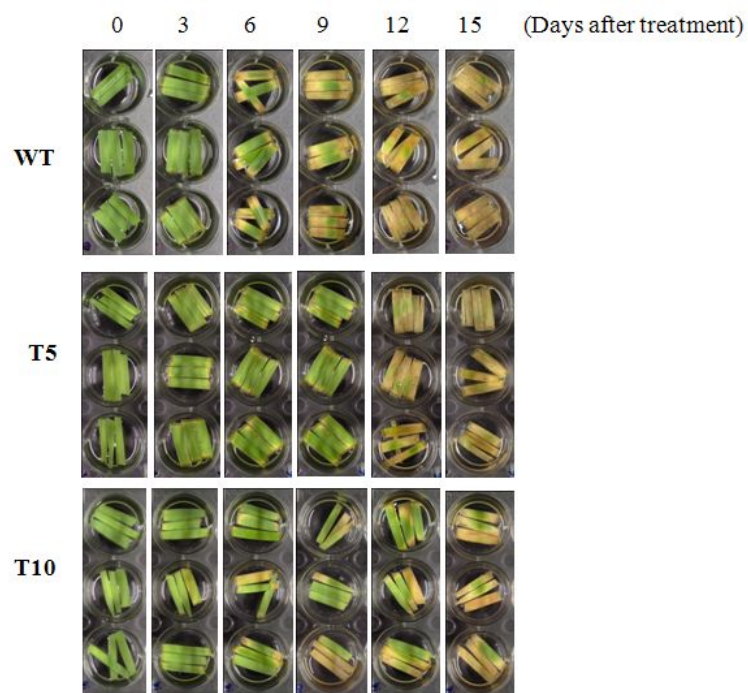


Fig. 20. Oxidative stress-induced phenotype of wild type and *Annexin1* transgenic plants. WT, wild-type plant; T5, T10, transgenic plant lines.

처리 후 6일째부터 형질전환 잔디와 야생형 잔디 잎절편의 노화양상에 차이가 관찰 되었다. 처리 후 15일째에는 형질전환 잔디 잎절편은 아직 녹기가 남아 있는 반면, 야생형 잔디 잎절편은 완전히 노화되었다. 이 결과로 부터 *Annexin1* 형질전환 들잔디는 야생형에 비해 산화 스트레스에 대한 내성이 증가되었음을 확인 할 수 있었다. *Medicago sativa*, *Arabidopsis thaliana* 등 식물 *Annexins*은 산화 스트레스 반응에 의해 유도된다고 보고된 바 (Kovacs et al. 1998; Lee et al. 2004; Konopka-Postupolska et al. 2009)있고, *Annexin1* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 산화 스트레스에 대한 내성이 증가된 결과에서 이들 *Annexin* 유전자들은 산화 스트레스 조건하에서 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 판단된다.

2) 건조 스트레스 조건하에서 형질전환 식물의 특성 조사

Annexin1 유전자는 ABA에 의해 발현이 유도되며 (Kovacs et al. 1998), 식물의 건조 스트레스에 중요한 역할 (Kovacs et al. 1998; Jami et al. 2008, Konopka-Postupolska et al. 2009)을 하는 유전자로 알려져 있다. *Annexin1* 형질전환 들잔디의 건조 스트레스에 대한 특성을 평가하기 위해, 건조 스트레스 조건하에서의 phenotype의 변화와 수분 함량의 변화를 관찰하였다(Fig. 21). GM 온실에서 증식한 야생형과 형질전환 잔디에 관수를 중단하고, 처리 후 시간경과에 따른 수분 함량의 변화를 관찰한 결과, 야생형에 비해 형질전환 식물 5번과 10번 라인은 높은 수준의 수분 함량을 유지하고 있었다. 이 결과로부터 형질전환잔디는 야생형에 비해 건조에 대한 내성이 증가되었음을 알 수 있었다.

3) 염 스트레스 조건하에서 형질전환 식물의 특성 조사

염 스트레스는 식물에 따라 다르지만 생장억제 등 모든 주요한 세포과정에 영향을 주며 (Parida and Das 2005), 식물체 내에 축적이 되어 노화를 유도한다 (Munns et al. 2002). 식물의 건조 내성은 염 내성에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있고 (Hasegawa et al. 2005), 염 스트레스에 의해 클로로필이 증가하는 드문 (Wang and Nil 2000, Lee et al. 1995) 경우도 있지만, 일반적으로 염스트레스에 의해 잎의 클로로필 함량은 감소한다 (Kim et al. 2010; Lee et al. 1992).

Annexin1 유전자의

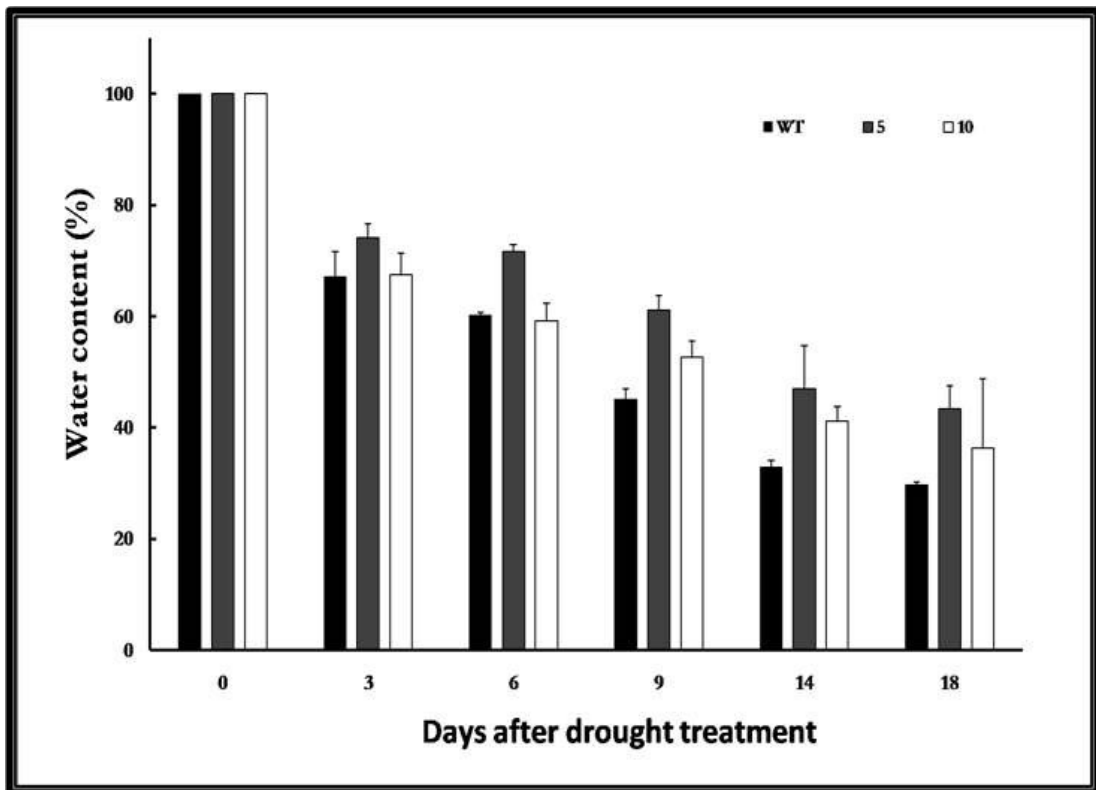


Fig. 21. Drought-induced phenotype (upper) and the water content (lower) of wild-type and *Annexin1* transgenic plant lines.

경우 염과 건조에 내성이 있는 것으로 보고되었다 (Kreps et al. 2002; Konopka-Postupolska et al. 2009; Jami et al. 2008). *Annexin1* 형질전환 들잔디의 염 스트레스에 대한 내성을 평가하기 위해, NaCl을 처리하고, 표현형과 클로로필 함량의 변화를 측정하여 야생형 잔디와 비교하였다(Fig. 22). 그 결과, 형질전환 식물과 야생형 식물은 외형적으로는 큰 차이를 보이지 않았지만, 클로로필 함량은 형질전환 식물이 야생형에 비해 높은 수준을 유지하였다. *Annexin1* 유전자가 도입된 형질전환 식물이 야생형에 비해 약 10% 정도 높은 수준의 클로로필 함량을 유지하는 결과에서 *Annexin1* 형질전환 들잔디는 야생형에 비해 염 스트레스에 대한 내성이 증가되었음을 알 수 있었다.

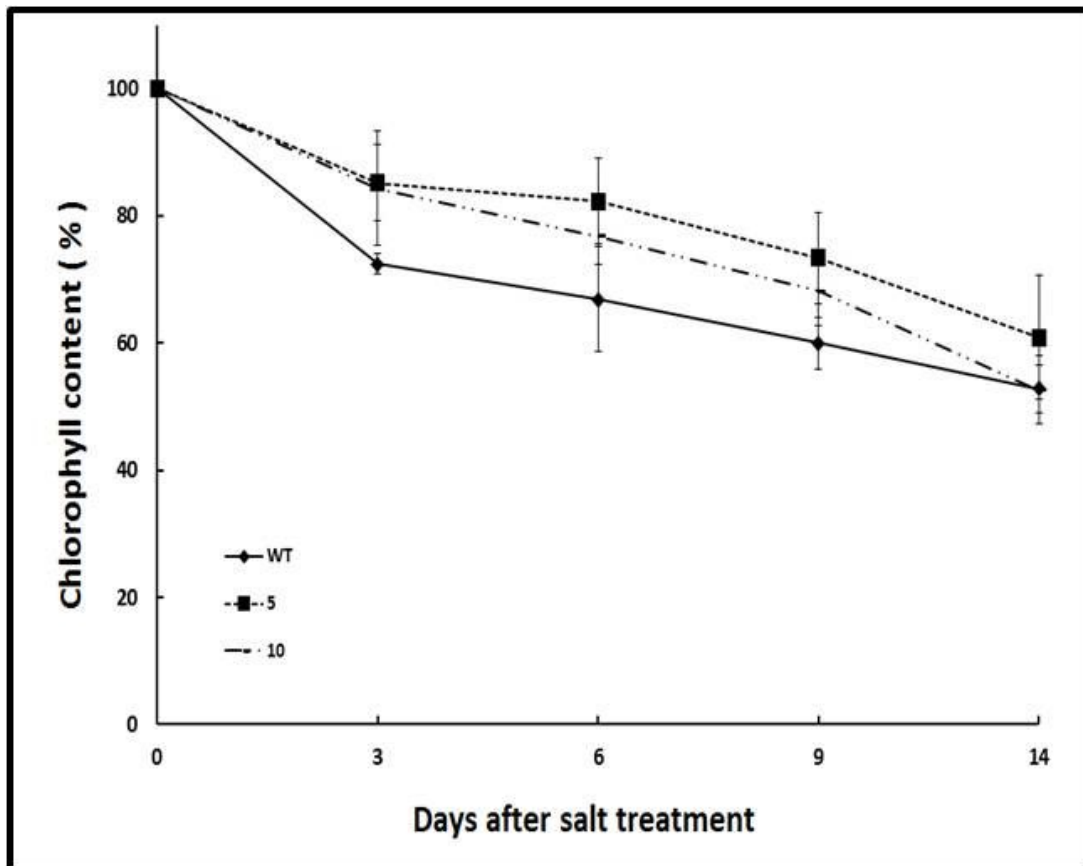
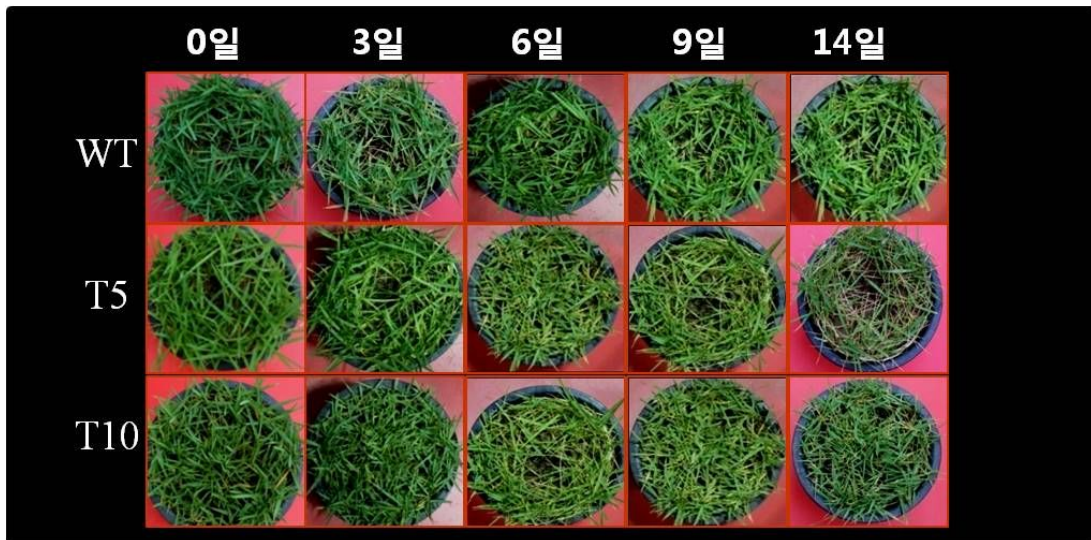


Fig. 22. Salt stress-induced phenotype (upper) and the chlorophyll content (lower) of wild-type and *Annexin1* transgenic plant lines.

IV. 종합고찰

형질전환에 사용한 캘러스는 재료의 안정적인 확보가 가능하고 비교적 배양이 쉬운 들잔디의 성숙종자에서 유도하였다. 품종 차이에 따른 캘러스 유도율, 형질전환 효율 등을 비교 평가하기 위해 ‘덕창’과 ‘미성’ 두 품종의 성숙종자를 구입하여 사용하였다. 균일한 형태의 캘러스만이 증식할 때까지 지속적으로 선발한 후, 재분화 테스트를 거쳐 재분화 효율이 90%이상인 계통, 4개 계통(‘미성’ 두 계통, ‘덕창’ 두 계통)을 이용하여 형질전환을 수행하였다. 들잔디의 경우 전배양은 고체배지에서 2~3주 정도가 가장 적합한 것으로 보이며 *Agrobacterium* 감염은 *Agrobacterium*의 농도를 $OD_{600nm} = 0.1$ 로 조정된 감염배지에서 24시간 현탁배양의 방법으로, 공동배양은 3일이 적합하다고 판단된다. 이런 조건에서 감염하여 공동배양한 캘러스는 washing 조작을 생략하여도 *Agrobacterium*의 과잉증식은 관찰되지 않았으며 신초의 분화도 잘 되는 결과를 얻을 수 있었다. 형질전환 캘러스 선발은 PPT 1 mg/L가 첨가된 선발배지에서 1주일간 선발한 다음, PPT가 5 mg/L의 농도로 포함된 선발배지에서 2주간 선발함으로써 재분화 효율은 증가하고, escape는 줄어드는 결과를 얻을 수 있었다. Shoot 선발 초기에는 3 mg/L의 PPT가 포함된 배지에서 선발하였고, 여기서 정상적으로 성장하는 shoot를 PPT 1 mg/L가 포함된 배지로 계대배양 하여 shoot의 빠른 증식을 유도하였고, root 선발배지에서 root가 유도된 개체들에 한하여 PAT strip test를 이용한 형질전환체의 선발을 수행하였다. PAT 단백질의 발현이 확인된 형질전환체는 화분에 순화하여 GM온실에서 증식하였고, 이들 개체를 이용하여 유전자의 도입 및 발현을 확인하고 기능분석을 수행하였다.

본 연구를 통해 개량한 들잔디의 조직배양 및 형질전환방법을 이용하여 *Annexin1*, *ATHG1*, *ATPG7*, *ATPG8*, *IG2 Vector* 및 *E9 Vector*가 도입된 형질전환 들잔디를 제조하였다. 형질전환 효율은 최대 3%로 기존에 보고된 들잔디의 형질전환 효율(약 1%)보다 개선된 결과를 얻을 수 있었다. 실험에 사용한 두 품종의 들잔디 중 ‘덕창’ 종자에서 유도/선발한 캘러스에서는 형질전환 식물을 얻을 수 있었으나 ‘미성’ 종자 유래의 캘러스에서는 형질전환 식물을 얻을 수 없었다.

이는 형질전환에 사용하는 잔디 품종이 형질전환 효율에 큰 영향을 미침을 시사한다. 또한 들잔디의 형질전환에 사용한 유전자들 중 *GA2ox4* 유전자 및 *ZjLsL*가 도입된 형질전환 식물은 얻지 못하였다. 이 결과는 도입 유전자의 종류도 형질전환 효율에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.

Annexin1 유전자가 도입된 형질전환 들잔디는 산화 스트레스, 건조 스트레스 및 염 스트레스에 대한 내성이 야생형 잔디에 비해 증가된 특성을 나타내었으나, 이후 반복 실험을 통한 확인이 필요할 것으로 판단되며, 이 외에, 본 연구에서 제조한 *ATHG1*, *ATPG7* 그리고 *ATPG8* 유전자가 도입된 형질전환 식물들에 대해서도 그 특성을 분석할 계획이다.

본 연구에서 개량한 들잔디의 조직배양 및 형질전환체계는 들잔디의 분자육종을 통한 신품종 개발에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

V. 인용문헌

김형기, 이상재 공저. 2010. 잔디학과 골프장. 선진문화사. 서울. pp. 157-159..

김경남. 2005. 잔디학개론. 삼육대학교출판부. 서울. pp. 68-70. pp. 131-138.

한지학 외76인 공저/식물형질전환연구회. 2007. 식물형질전환. 정문각. 서울
PP. 292-293. P. 286.

제노마인 보고서. 2012.

Anderson MD, Prasad TK, and Stewart CR (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol* 109:1247-1257

Boylard E, Chasseaud LF (1969) The role of glutathione and glutathione -S-tranferase in mercapturic acid biosynthesis. *Adv Enzymol Ralat Areas Mol Biol* 32:173-219

Boyer JS (1982) Plant Productivity and environment. *Science* 218:443-448

Cardoza V and Stewart CN (2003) Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting effeciencies in canola(*Brassica napus* L.) from hypootyls segment explants. *Plant cell Rep* 21:599-604

Chang CC and Schmidt DR (1991) Initiation and proliferation of carrot callus using a combination of antibiotics. *Planta* 185:523-526

Cheng M, Fry JE, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW and Wan Y (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 115:971-980

Cho MA, Song YM, Park YO, Ko SM, Min SR, Liu JR, Choi PS (2005a) The use of glufosinate as a selective marker for the transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Kor J Plant Biotechnol* 32:161-165

Cantero A, Barthakur S, Bushart TJ, Chou S, Morgan RO, Fernandez MP (2006) Expression profiling of the Arabidopsis annexin gene family during germination, de-etiolation and abiotic stress. *Plant Physiol and Biochem* 44:13 - 24

Clark GB Roux SJ (1995) Annexins of plant cells. *Plant Physiol* 109: 1133 - 1139

Dellaporta S, Wood J, Hick J (1983) A plant DNA miniprep; version II. *Plant Mol Biol Rep* 1:19-21

Dong J, Teng W, Buchholz WG, Hall TC (1996) *Agrobacterium*-mediated transformation of Javanica rice. *Mol Breeding* 2:267-276

Ganesan M, Han YJ, Bae TW, Hwang OJ, Chandrasekkhar T, Shin AY, Goh CH, Nishiguchi S, Song IJ, Lee HY, Kim JI, Song PS (2012) Overexpression of phytochrome A and its hyperactive mutant improves shade tolerance and turf quality in creeping bentgrass and zoysiagrass. *Planta* 236:1135-1150

Gorantla M, Babu PR, Reddy Lachagari VB, Alex Feltus F, Paterson AH, Reddy AR (2005) Functional genomics of drought stress response in rice:

transcript mapping of annotated unigenes of an indica rice (*Oryza sativa* L. cv. Nagina 22). *Curr Sci* 89:496 - 514

Gaba V, Zelcer A, Gal-On A (2004) Cucurbit biotechnology—the importance of virus resistance. *In Vitro Cell Dev Bio Plant* 40:346–358

Hsieh, TH, Lee JT, Charng YY, Chan MT (2002) Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *plant physiol* 130:618–626

Hwang OJ, Kim JI (2009) Recent advances in the development of biotech bentgrass. *J Plant Biotechnol* 36:327–335

Jefferson RA, Kavanaugh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker for higher plants. *EMBO J* 6:3901–3907

Konopka-Postupolska D, Clark G, Goch G, Debski J, Floras K, Cantero A (2009) The role of annexin 1 in drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 150:1394 - 1410

Kovacs I, Ayaydin F, Oberschal A, Ipacs I, Bottka S, Dudits D, Toth EC (1998) Immunolocalization of a novel annexin-like protein encode by a stress and abscisic acid responsive gene in alfalfa. *Plant J* 15:185 - 197

Kim JS, Shim IS, Kim MJ (2010) Physiological Response of Chinese Cabbage to Salt Stress. *Kor J Hort Sci Technol* 28:343–352

LEE KS, Choi SY, Choi CW (1995) Effect of NaCl concentration on

Germination and Seedling growth of Italian Ryegrass(*Lolium multiflorum* L.).
Korean J Crop Sci 40:340-350

Lee KW, Kim KI, Choi GJ, Lim YC, Kim WH, Jung MW, Seo S, Lee BH,
Lee SH (2008) Callus induction and plant regeneration from mature seeds.
J Kor Grassl Forage Sci 28:165-170

Lee KS, Lee JS, Choi SY (1992) Changes in Contents of Chlorophyll and Free
Proline as Affected by NaCl in Rice Seedling. Korean J Crop Sci 37:178-184

Lee S, Lee EJ, Yang EJ, Lee JE, Park AR, Song WH, Park OH (2004)
Proteomic identification of annexins, calcium-dependent membrane binding
proteins that mediate osmotic stress and abscisic acid signal transduction in
Arabidopsis. Plant Cell 16:1378 - 1391

Lee SH, Kim BS, Won SH, Jo J, Kim KY, Park GJ, Sung BR, Lee HS, Lee
BH (2004) Factors affecting callus induction and plant regeneration from
mature seed of zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). J Kor Grassl Sci
24:29-36

Montoro P, Teinseree N, Rattana W, Kongsawadworakul P, Michaux-Ferriere
N (1999) Effect of exogenous calcium on *Agrobacterium tumefaciens*-
mediated gene transfer in *Hevea brasiliensis*(ruber tree) friable calli. Plant Cell
Rep 19:851-855

Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell
Environ 25:239-250.

Park GH, Choi JS, Yun CH, Ahn BJ (1994) DNA delivery into embryogenic

cells of zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) and rice (*Oryza sativa* L.) by electroporation. Kor J Plant Tissue Culture 21:309-314

Park GH and Ahn BJ (1998) Electroporation conditions for DNA transfer into somatic embryogenic cells of *Zoysia japonica*. Kor J Plant Tissue Culture 25:13-19

Rashid H, Yokoi K, Toriyama K and Hinata K (1996) Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in indica rice. Plant cell Rep 15:727-730

Rhee HJ, Kim GY, Huh JW, Kim SW, Na DS (2000) Annexin I is a stress protein induced by heat, oxidative stress and a sulfhydryl-reactive agent, Eur J Biochem 267:3220 - 322

Rim YW, Kim KY, Choi GJ, Lim YC, Sung BY (2001) Callus induction and plant regeneration from seeds of *Zoysia japonica* Steud. J Kor Grassl Sci 21:49-52

Rogers SO, Bendich AJ (1988) Extraction of DNA from plant tissues. Plant Molecular Biology Manual A 6:1-10

Salin, ML (1991) Chloroplast and mitochondrail mechanism for protection against oxygen toxicity. Free Radic Res Commun 12-13:851-858

Schreuder MM, Raemakers CJJM, Jacobsen E, and Visser RGF (2001) Efficient production of transgenic plants by *Agrobacterium*-mediated transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Euphytica 120:35-42

Seo MS, Bae CH, Choi DO, Rhim SL, Seo SC, Song PS, Lee HY (2002) Investigation of Transformation Efficiency of Rice Using *Agrobacterium tumefaciens* and High Transformation of GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase) Gene Relative to Chilling Tolerance. Kor J Plant Biotechnology 29:85-92

Simmonds DH, Donaldson PA (2000) Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of shortseason soybean genotypes. Plant Cell Rep 19:485-490

Sacre SM, Moss SE (2002) Intracellular localization of endothelial cell annexins is differentially regulated by oxidative stress. Exp Cell Res 274: 254 - 263

Song IJ, Ganesan M, Kang EJ, Sun HJ, Bae TW, Lim PO, Song PS, Lee HY (2010) A simple and reproducible regeneration protocol for *Zoysia japonica* based on callus cultures. Hort Environ Biotechnol 51:222-225

Somers DA, Samac DA, Olhoft PM (2003) Recent advances in legume transformation. Plant Physiol 131:892-899

Sun HJ, Song IJ, Bae TW, Lee HY (2010) Recent developments in biotechnological improvement of *Zoysia japonica* Steud. J plant Biotechnol 37:400-407

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel eletrophoresis. J Mol Biol 98:503-517

Tanaka T, Akatsuka S, Ozeki M, Shirase T, Hiai H, Toyokuni S (2004)

Redox regulation of annexin 2 and its implications for oxidative stress
-induced renal carcinogenesis and metastasis. *Oncogene* 23:3980 - 3989

Watkinson JI, Sioson AA, Vasquez-Robinet C, Shukla M, Kumar D, Ellis
M, Heath LS, Ramakrishnan N, Chevone B, Watson LT, Zyl LV, Egertsdotter
U, Sederoff RR, Grene R (2003) Photosynthetic Acclimation Is Reflected in
Specific patterns of Gene Expression in Drought-Stressed Loblolly Pine. *Plant
Physiol* 133:1702-1716

Wang Y and Nii N (2000) Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate
carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and
transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *J Hort Sci
Biotechnol* 75:623-627

Wilkinson S, Davies WJ (2002) ABA-based chemical signalling: the
co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ* 25: 195 - 210

Zhang L, Wu D, Zhang L, Yang C (2007) *Agrobacterium*-mediated
transformation of Japanese lawngrass (*Zoysia japonica* Steud.) containing a
synthetic *cryIA (b)* gene from *Bacillus thuringiensis*. *Plant Breeding* 126:428-
432

Zhu JK (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin
Plant Biol* 6:441 - 445

감사의 글

석사생활 동안 다른 사람들의 도움을 받아 잘 넘기기도 하고 그 외에 많은 것들을 배웠습니다. 저에게 신경써주신 분들께 감사드리고 앞으로 열심히 하겠습니다.