



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

식물조직배양 및 형질전환기술을
이용한 신품종 잔디의 개발

Development of new turfgrass varieties by tissue
culture and *Agrobacterium*-mediated transformation

濟州大學校 大學院

生命工學科

金壽蓮

2013年 2月

식물조직배양 및 형질전환기술을 이용한 신품종 잔디의 개발

Development of new turfgrass varieties by tissue culture
and *Agrobacterium*-mediated transformation

指導教授 李 孝 淵

金 壽 蓮

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2013年 2月

金壽蓮의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 선 현 진 (인)

委 員 이 효 연 (인)

委 員 강 홍 규 (인)

濟州大學校 大學院

2013 年 2月

목 차

Abstract	3
I. 서론	4
II. <i>GSDL1</i> 유전자가 도입된 형질전환 들잔디의 개발 및 특성분석	
1. 재료 및 방법	9
1) 형질전환 식물의 선발	9
2) 형질전환 식물체의 유전자 도입 및 발현 분석	15
3) <i>GSDL1</i> 형질전환 식물의 특성 분석	21
2. 결과 및 고찰	22
1) 형질전환 들잔디의 선발	22
2) 형질전환 들잔디의 유전자 도입 및 발현 분석	24
3) <i>GSDL1</i> 형질전환 식물의 특성 분석	27
III. Kentucky bluegrass 성숙종자를 이용한 효율적인 재분화조건의 확립	
1. 재료 및 방법	34
1) Callus 유도에 미치는 2,4-D와 BA의 영향	34
2) Kentucky bluegrass 품종별 재분화 효율	34
3) 뿌리 유도 및 순화	36
4) Callus 형태의 분류	36
5) Myo-inositol 농도에 따른 callus 유도율의 조사	36
6) Callus 유도 및 선발시 Kinetin의 혼용처리가 재분화에 미치는 영향	36
7) BA와 TDZ의 농도별 조합처리가 재분화 효율에 미치는 영향	37
8) Agarose 및 Gelrite 농도별 처리가 재분화 효율에 미치는 영향	37

2. 결과 및 고찰 -----	38
1) Callus 유도에 미치는 2,4-D와 BA의 영향 -----	38
2) Kentucky bluegrass 품종별 재분화 효율 -----	41
3) 뿌리 유도 및 순화 -----	43
4) Callus 형태의 분류 -----	44
5) Myo-inositol 농도에 따른 callus 유도율의 조사 -----	45
6) Callus 유도 및 선발시 Kinetin의 혼용처리가 재분화에 미치는 영향 -----	46
7) BA와 TDZ의 농도별 조합처리가 재분화 효율에 미치는 영향 -----	49
8) Agarose 및 Gelrite 농도별 처리가 재분화 효율에 미치는 영향 -----	52
IV. 종합고찰 -----	54
V. 참고문헌 -----	57
감사의 글 -----	61

Abstract

GSDL1, an AT-hook DNA binding family protein gene from *Arabidopsis*, is known to play a role in abiotic stress such as drought. In this study, transgenic zoysiagrass plants containing *GSDL1* gene were produced by *Agrobacterium*-mediated transformation to develop stress-tolerant variety of turfgrass. After transformation, putative transgenic plants were screened using Trait LL Test Strips which detects PAT protein. Integration of the *GSDL1* gene into the transgenic plants was confirmed by genomic PCR and Southern blot analysis and the expression of *GSDL1* gene was confirmed by RT-PCR. The transgenic zoysiagrass plants overexpressing *GSDL1* gene showed significantly enhanced drought tolerance and also showed delaying post-harvest senescence compared to wild type zoysiagrass.

Kentucky bluegrass is a typical cool-season perennial grass with apomictic reproduction and is mainly used in playing fields. Due to the apomictic mode of reproduction, development of new varieties of this species by conventional breeding is very difficult. Therefore, genetic transformation can be a good alternative method for introducing desirable traits and new genes into kentucky bluegrass. The purpose of this study was to establish an efficient plant regeneration system from seed-derived callus cultures of kentucky bluegrass for genetic transformation. Plant regeneration from seed-derived callus cultures of five kentucky bluegrass cultivars was tested on MS basal medium supplemented with different growth regulators. MS medium containing 1mg/L 2,4-D, 1mg/L BA was optimal for shoot-forming callus (type 1) induction. The highest frequency of type 1 callus induction (22.7%) and plant regeneration (98.8%) was obtained from 'Midnight'. In this study, we established a highly efficient regeneration system for kentucky bluegrass. The established protocol could be a powerful tool for molecular breeding of kentucky bluegrass through genetic transformation.

I. 서론

잔디는 생육적온에 따라 난지형과 한지형 잔디로 분류된다. 난지형 잔디는 여름철 고온 및 건조에 강한 품종이나, 추위에 약하고 녹기 유지기간이 짧는데 반해, 한지형 잔디는 추위에 강하며 녹도 및 밀도가 높은 장점이 있지만, 고온 및 건조에 취약하여 여름철에는 관리가 까다롭다(Ganesan et al., 2012). 따라서 대표적인 난지형 잔디인 들잔디(*Zoysia japonica* Steud.)와 한지형 잔디인 kentucky bluegrass(*Poa pratensis* L.)를 이용하여 환경스트레스 저항성 품종을 개발하는 데에 연구의 주된 목적이 있다. 먼저 생명공학기술을 이용한 신품종 잔디를 개발하기 위하여 조직배양계가 확립되어 있는 들잔디에 형질전환 기술을 이용하여 환경스트레스 저항성 유전자의 도입을 시도하였고, 한지형 잔디 중 가장 많이 식재되어 있는 kentucky bluegrass의 경우 형질전환 기술에 앞서 조직배양을 이용한 식물재분화계를 확립하는 데에 그 연구의 목적을 두고 있다.

들잔디는 한국을 비롯한 일본, 중국 등 동아시아 지역을 중심으로 매우 중요하게 사용되는 품종이다. 고온 및 건조에 강하고, 병해충에도 잘 견디며 척박한 토양에서도 생육이 왕성하여 골프장, 경기장, 도로법면, 하천제방 등 다양한 곳에 이용되고 있다(Toyama et al., 2003, Ge et al., 2006, Ganesan et al., 2012). 그러나 잔디밭 조성속도 및 회복되는 속도가 느리고 연중 5~6개월 정도밖에 푸른 상태를 유지하지 못할 정도로 녹기를 유지하는 기간이 짧은 단점이 있다. 국내에서도 잔디의 수요가 다양해짐에 따라 들잔디만으로는 효율적인 녹화에 한계가 있어 녹기 유지기간이 짧은 단점을 보완한 신품종 개발이 요구되고 있다. 식물의 품종개발에는 전통적인 육종법이 주로 이용되어 왔지만 신품종을 개발하기 까지 많은 시간이 소요되기 때문에 우수한 형질을 나타내는 유전자를 식물체내로 직접 도입하는 식물형질전환법을 이용하는 것이 들잔디의 신품종 개발에 훨씬 효율적일 것으로 생각된다(Toyama et al., 2003, Ge et al., 2006, Bae et al., 2009, Sun et al., 2010, Ganesan et al., 2012).

식물의 형질전환을 위해서는 먼저 식물의 재분화계가 확립되어야 하고, 형질전환에 사용할 식물의 효율적인 조직배양 체계의 검토가 무엇보다 중요하다. 조직

배양을 이용한 들잔디의 재분화에 관한 연구는 다른 식물에 비해 비교적 늦은 1989년 처음 보고된 이래, 여러 연구를 통해 체계화 되었다(Khayri et al., 1989, Asano, 1989, Asano et al., 1996, Toyama et al., 2003). 또한 들잔디의 형질전환은 microprojectile bombardment를 이용한 형질전환(Ahn and Lee, 1998)과 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환이 보고된 바 있다. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환은 들잔디 성숙종자 유래의 callus를 사용하여 *bar* gene을 도입한 제초제 저항성 품종의 개발(Toyama et al., 2003)과 들잔디 stolon을 이용한 hygromycin 저항성(*hpt*)을 나타내는 품종(Ge et al., 2006), 그리고 내충성 유전자 *CryIA(b)*를 도입한 품종(Zhang et al., 2007) 등이 있다. 현재까지 특정 유용형질을 도입하여 그 기능이 명확히 밝혀진 형질전환 들잔디는 제초제 저항성 유전자가 도입된 사례 밖에 없을 정도로, 그 결과는 미미하다. 들잔디는 기온이 10℃ 이하로 내려가는 10월초부터 잎의 노화가 진행되어 이듬해 4월까지 휴면상태에 들어가 녹색유지기간이 짧은 특성을 가지고 있는데, 이런 들잔디의 특성상 잎의 노화지연 관련 유전자를 도입하여 녹기가 연장된 신품종을 개발하면 경제적 가치가 높을 것으로 판단되었다.

GSDL1(Genomine Senescence Delayed Line 1, At4g17800) 유전자는 애기장대 유래의 AT-hook DNA binding family protein으로, 선행연구된 애기장대의 *GSDL1* 과발현체에서 야생형에 비해 잎의 노화가 지연되는 특징을 나타내었으며, 개체의 크기가 커지고 종자생산량도 증가하는 결과를 보였다. 또한 야생형 애기장대는 시간이 지남에 따라 엽록소 함량이 현저하게 감소하는데 반해 *GSDL1* 형질전환체는 60일 이후에도 처음함량의 40%정도를 유지하였고, 광합성 효율 또한 야생형은 급격히 감소하는데 비해 형질전환체는 거의 감소하지 않고 처음상태를 유지하는 결과를 보였다. *GSDL1* 유전자는 노화지연의 특성을 나타낸 것으로 보고된 *ORE7* 유전자(Lim et al., 2007)와 amino acid의 상동성을 분석한 결과 core-sequence가 같은 것이 확인되었고(Fusimoto et al., 2004, Lim et al., 2007, Matsushita et al., 2007), 애기장대 과발현체의 특성을 종합해 보았을 때 *ORE7*과 유사한 노화지연의 특성을 나타낼 것으로 예상된다. 본 연구에서는 이와 같이 노화지연의 특성을 보인 *GSDL1* 유전자를 들잔디에 도입하여 녹기가 연장된 신품종의 개발을 시도하였다.

Kentucky bluegrass(*Poa pratensis* L.)은 대표적인 한지형 잔디로 원산지는 아시아, 유럽이고 200여개 이상의 종이 있다. 한국의 기후에도 적응성이 좋은 품종으로 잎의 녹도가 높고 고밀도로 자라며 잎이 부드러운 특징이 있고, 재생력이 뛰어나기 때문에 한지형 잔디 중 가장 많이 사용되는 품종이다(Ke and Lee, 1996, Hu et al., 2006, Zhang et al., 2010). 내한성이 강하여 녹기를 유지하는 기간이 길며 그늘에서도 비교적 잘 자라는 편이다(Chai et al., 2003, Hu et al., 2006). 사초용으로 오랜 기간 이용되어 왔고 재생력이 우수하여 공원, 경마장, 골프장, 축구장, 야구장 등 경기장에 주로 사용되고 있다(Ke and Lee, 1996, 이 등., 2005, Hu et al., 2006). 특히 국내 월드컵 경기장 10곳 중 9곳에 kentucky bluegrass가 식재되어 있을 정도로 이용률이 높은 품종이다. 서울 상암경기장에는 100% kentucky bluegrass를 사용하고 있으며 그 외의 경기장에서는 Perennial ryegrass 10~20%와 혼용하여 사용하고 있다. 2002년 월드컵이 한국에서 개최된 이래 지속적으로 축구에 대한 관심이 높아지면서 경기장 내 잔디의 품질 또한 많은 관심을 받고 있다.

Kentucky bluegrass는 품질이 우수하여 특히 상업적인 용도로 각광받는 품종이긴 하나 난지형 잔디와는 반대로 기온이 높은 여름철에는 생육이 불량하고 심하면 고사하는 경향이 있다. 또한 건조에 취약하여 물 요구도가 높은 편이어서 여름철 관리가 까다로운 단점이 있다(Hu et al., 2006, Zhang et al., 2010).

Kentucky bluegrass는 무성생식의 일종인 apomixis로 번식하는 대표적인 식물이다(Valk et al., 1988, Msikita and Wilkinson, 1994, Gao et al., 2006, Zhang et al., 2010). Apomixis는 단성생식의 일종으로 수정과정을 거치지 않고 배가 만들어져 종자를 형성하는 현상으로, 이 단성생식으로 발생한 종자에서 형성된 개체는 모식물체와 유전적으로 완전히 동일한 특성을 가진다. 식물 대부분의 품종개발에는 교잡을 통한 전통적 육종법이 이용되지만 kentucky bluegrass는 이러한 단성생식으로 번식하는 특성 때문에 전통적 육종법을 이용한 신품종 개발에는 큰 어려움이 있다(Msikita and Wilkinson, 1994, Ke and Lee, 1996, Ha et al., 2001, Chai et al., 2003, Gao et al., 2006, Hu et al., 2006, Zhang 2010). 따라서 kentucky bluegrass의 품종개발에는 조직배양 및 형질전환 기술을 이용한 분자육종이 적합할 것으로 생각된다. 분자육종을 통해 우수한

신품종이 개발되면 단성생식으로 번식한 다음세대도 모본과 동일한 형질을 가지게 될 것이므로 도입형질의 고정에 소요되는 시간을 단축할 수 있는 장점이 있을 것으로 판단된다. 이러한 분자유종을 통한 신품종 개발을 위해서는 먼저 효율적인 조직배양체계의 확립이 필수적이다.

Kentucky bluegrass의 조직배양체계 확립에는 재료의 안정적인 확보가 가능한 성숙종자를 이용한 연구가 주를 이루고 있다(McDonnell and Conger, 1984; Boyd and Dale, 1986; Griffin and Dibble, 1995; Valk et al., 1995; 이 등., 2006). 그러나 사용한 품종마다 재분화 조건이 각기 다르고, callus 유도율 및 재분화율이 비교적 낮아 사용목적에 적합한 품종을 이용한 보다 체계적인 재분화체계의 확립이 필요할 것으로 보인다. Kentucky bluegrass의 형질전환에는 particle bombardment를 이용한 방법(Ha et al., 2001, Gao et al., 2006)과 *Agrobacterium*을 이용한 방법(Chai et al., 2003, Zhang et al., 2010)이 이용되고 있으며, 성공적인 형질전환을 위해서는 재분화능이 높은 callus의 선발 및 증식이 가장 중요한 요인으로 거론되고 있다.

본 연구에서는 들잔디 성숙종자 유래의 재분화능이 있는 callus를 사용하여 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환을 통해 *GSDL1* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디를 선발하고 그 특성을 분석하였다. 또한 건조에 취약한 kentucky bluegrass의 단점을 보완한 신품종 개발을 위해 *GSDL1*과 같은 유전자를 도입할 목적으로 kentucky bluegrass 5품종의 성숙종자를 이용한 효율적인 재분화 시스템을 확립하였다.

II. *GSDL1* 유전자를 도입한 형질전환 들잔디의 개발 및 특성분석

1. 재료 및 방법

1) 형질전환 식물의 선발

(1) 식물재료 및 배발생 callus 선발

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환에는 들잔디(*Zoysia japonica* Steud.)의 배발생 callus를 사용하였다. 먼저 들잔디의 callus를 유도하기 위해 성숙종자의 종피를 제거한 후 70% 에탄올로 1분간 살균하고, 10 μ l의 Tween-20 용액이 첨가된 5% sodium hypochlorite 용액을 15분간 처리하여 종자의 표면을 세척하였다. 멸균된 증류수로 거품이 없어질 때까지 종자를 씻어낸 뒤 멸균된 여과지 위에 올려 물기를 제거하였다. 표면살균한 종자를 callus 유도배지(MS, 3% sucrose, 100 mg/L myo-inositol, 4 mg/L Thiamin-HCl, 100 mg/L α -ketoglutaric acid, 2mg/L 2,4-D, 0.2mg/L BA, pH 5.8, 0.2 g/L Gelrite)에 치상하여 약 4~6주 동안 callus를 유도한 결과, 노랗고 단단하며 잘 부스러지는 형태의 type 1 callus, 노랗고 물기가 많은 형태의 type 2 callus, 하얗고 부드러운 형태의 type 3 callus가 유도되었다. 3가지 형태의 callus의 재분화 테스트를 실시한 결과 type 1 callus에서 높은 재분화율을 나타내었으며, 이 callus를 선발한 뒤 callus 증식배지(Ca²⁺ free-MS, 3% sucrose, 2 mg/L 2,4-D, 0.4 mg/L kinetin, pH 5.8, 0.2% Gelrite)에서 4주마다 계대배양하며 증식시켰고, 1회 5 plates의 callus를 형질전환에 사용하였다.

(2) 형질전환에 사용한 *Agrobacterium* 균주 및 binary vector

노화지연과 관련된 *GSDL1* 유전자의 도입은 Figure 1과 같이 pCAMBIA 3301을 변형한 IG-2 vector를 사용하였다. T-DNA 내부에 Ubiquitin promoter와 Arbc3 terminator 사이에 *GSDL1* 유전자를 삽입하였고, 선발 marker로

bar(bialaphos resistance) 유전자와 intron GUS가 포함되어 있다.

Freeze-thaw법(Chen et al., 1994)을 이용하여 Figure 2와 같은 방법으로 *Agrobacterium* strain EHA105에 *GSDLI* 유전자를 삽입한 binary vector (IG2-*GSDLI*)를 도입하였으며, 50% glycerol과 혼합한 후 -70°C에 보관 및 형질전환에 사용하였다.

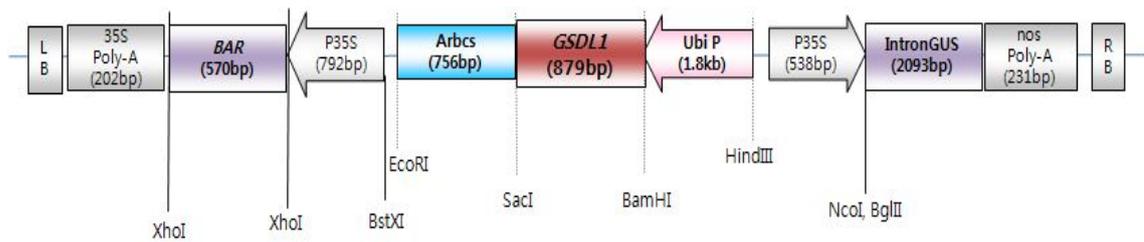


Figure 1. Map of the T-DNA region of the binary vector pCAMBIA 3301(IG-2) harboring *GSDLI*.

LB, left border; RB, right border; Ubi P, ubiquitin promoter; p35S, CaMV 35S promoter; Arbcs, Arbcs terminator; 35S poly-A, CaMV 35S terminator; nos Poly-A, NOS terminator; bar, bialaphos resistance gene

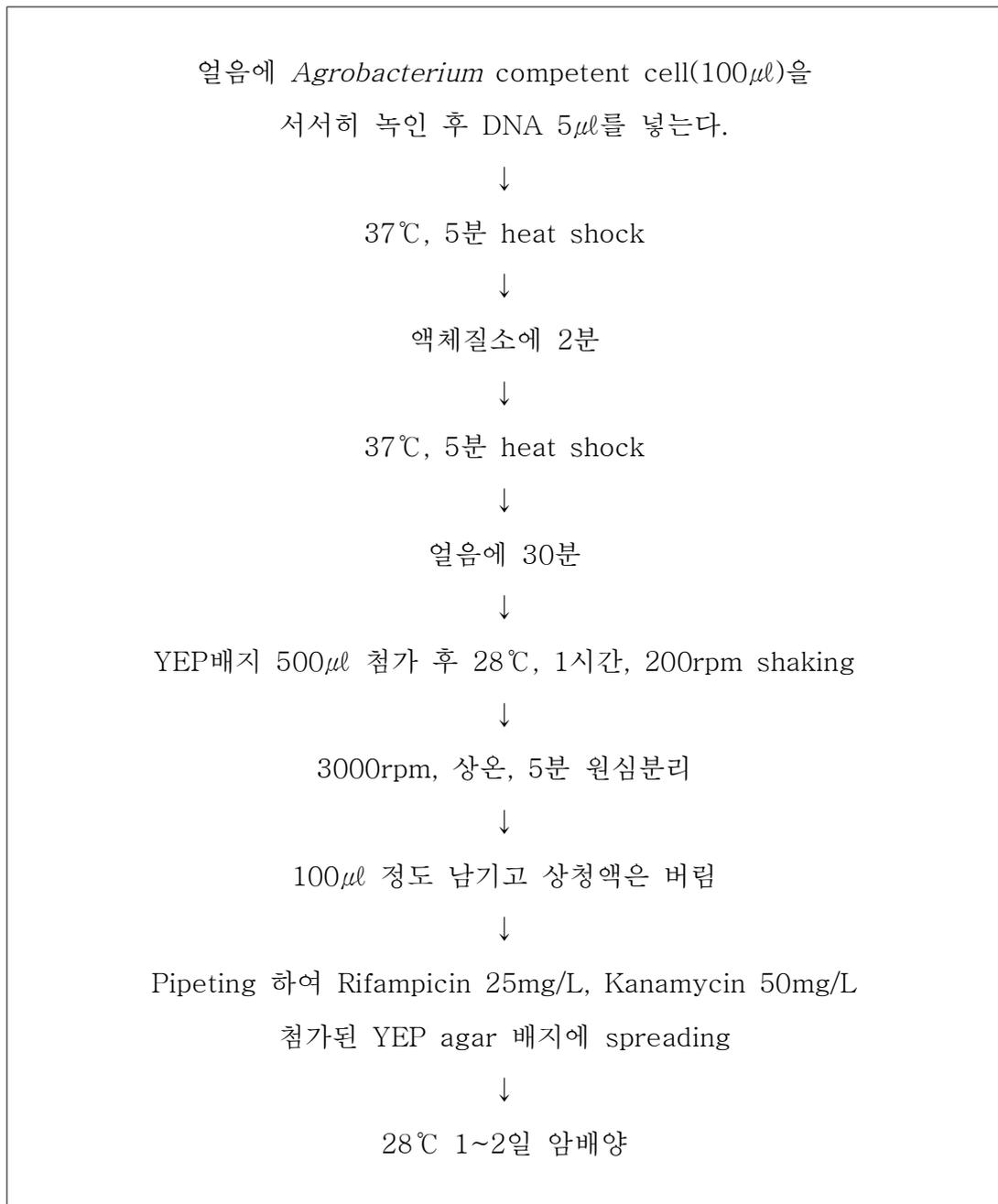


Figure 2. Procedure of *Agrobacterium* transformation

(3) *Agrobacterium*을 이용한 들잔디의 형질전환

들잔디 성숙종자 유래의 배발생 callus를 이용한 형질전환은 Figure 3과 같은 방법으로 수행하였다. 성숙 종자 유래의 배발생 callus를 유도 및 선발한 뒤 (Figure 4A-B), callus 증식배지에서 2~3주간 전배양하였다(Figure 4C). Rifampicin 25 mg/L, kanamycin 50 mg/L를 포함한 25 mL의 YEP 배지에 IG2-*GSDL1* vector를 도입한 *Agrobacterium*을 접종하여 28°C, 200rpm에서 24시간 배양하였다. *Agrobacterium*을 원심분리하여 상청을 제거하고(Figure 4D), 50mg/L acetosyringone (3,5-dimethoxy-4-hydroxy-acetophenon)이 포함되어 있는 25 mL의 infection 배지(1/2MS, 3% sucrose, 1% glucose, 1% Betaine, pH 5.2)에 균 pellet을 재현탁한 후 25°C, 110rpm에 2시간동안 pre-activation하고, 배발생 callus를 넣어 25°C, 110rpm에 2시간동안 감염하였다(Figure 4E). 감염한 callus를 멸균된 여과지에 올려 여분의 수분을 제거한 후 공동배양 배지(1/2MS, 3% sucrose, 1% glucose, 1% Betaine, 0.4mg/L Kinetin, pH 5.8, 0.2% Gelrite, 50mg/L acetosyringone)에 치상하여 25°C, 암 조건에서 3일간 배양하였다(Figure 4F). 공동배양한 callus로부터 *Agrobacterium*을 제거하기 위해 멸균수로 callus를 4~5회 씻은 후, 250 mg/L cefotaxime이 포함된 멸균수로 세척하고 멸균여과지를 사용하여 여분의 수분을 제거하였다. 수분을 제거한 callus는 250 mg/L cefotaxime이 첨가된 callus 증식배지에 치상하여 25°C, 암조건에서 2~3주간 배양하였다.

Callus 선발배지에서 선발한 callus에서 shoot를 유도하기 위하여 1 mg/L phophinothricin(PPT)이 첨가된 shoot 유도배지(MS, 3% maltose, 1 mg/L BA, pH 5.8, 0.3% Gelrite)에 callus를 치상하고 25°C, 광조건에서 4주간 배양하였다(Figure 4G). Callus로부터 유도된 shoot를 3 mg/L PPT가 첨가된 shoot 선발배지에 계대배양하고, 5cm이상 증식한 개체를 5 mg/L PPT가 포함된 1/2 MS배지에 치상하여 뿌리를 유도하였다. PPT가 포함된 배지에서 shoot와 뿌리가 유도된 식물체를 화분에 순화하고, GM온실에서 재배 및 증식하였다.

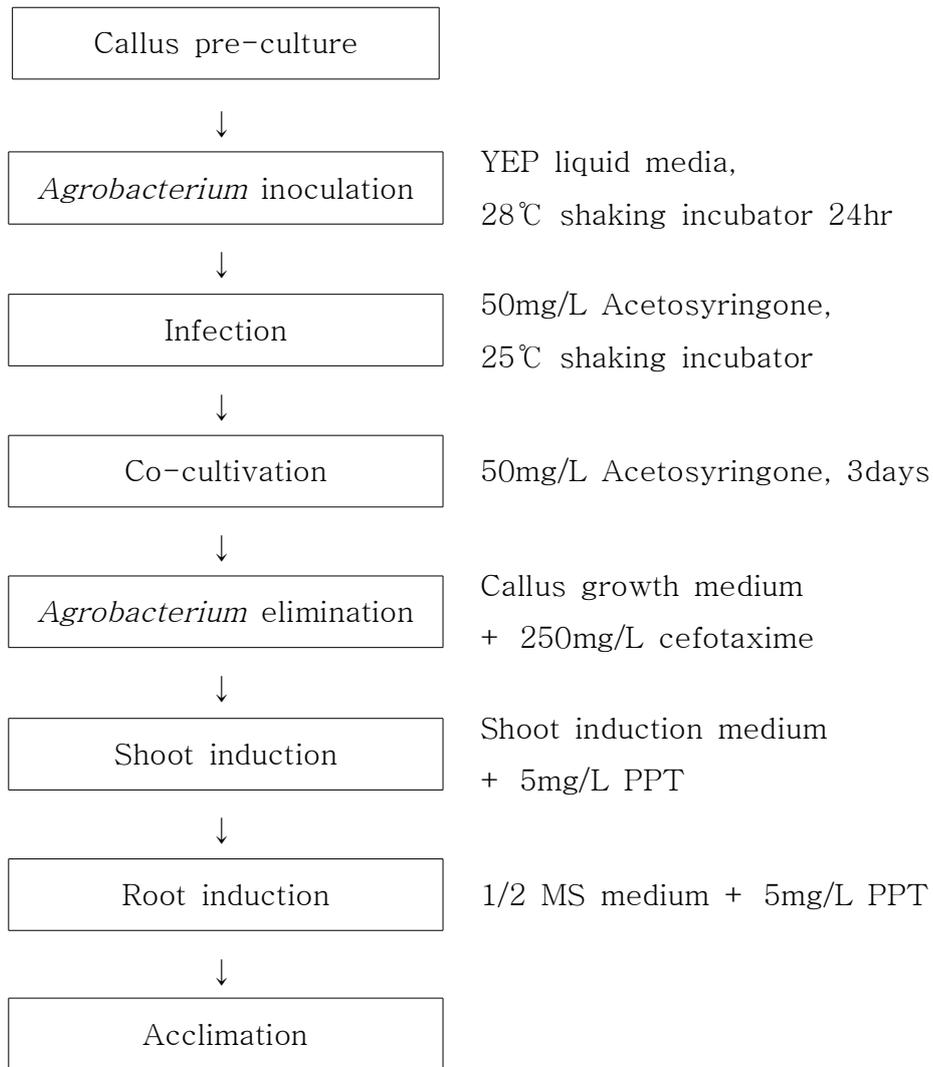


Figure 3. Procedure of *Agrobacterium*-mediated transformation.

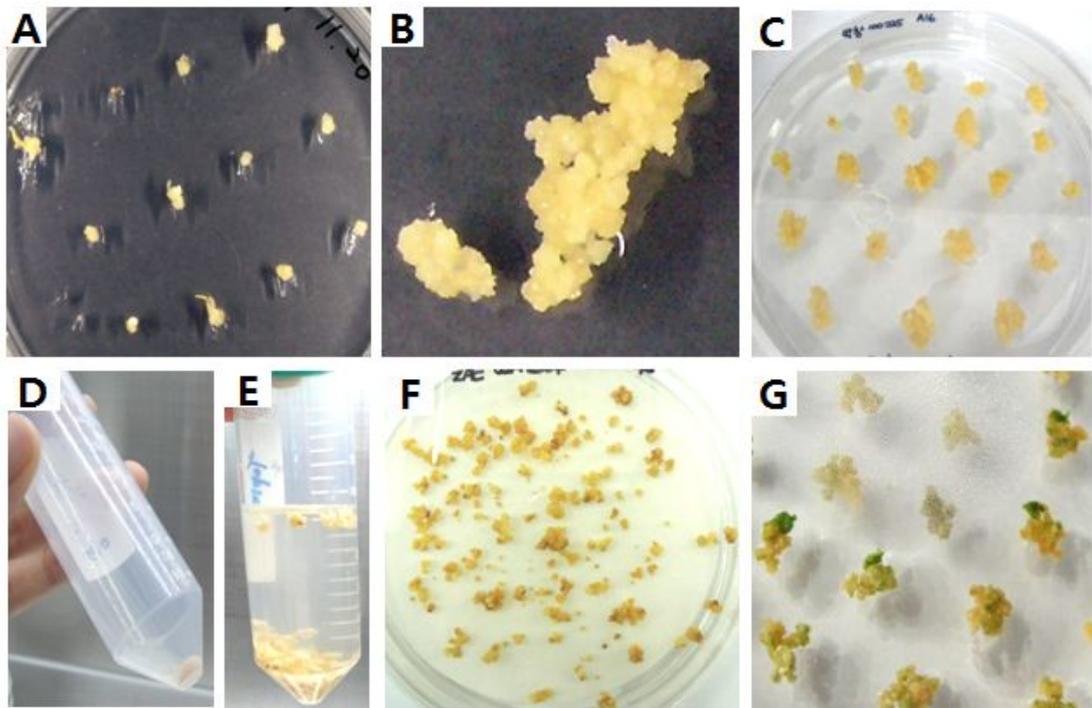


Figure 4. Procedure of *Agrobacterium*-mediated transformation for zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.).

(A) Callus induction; (B) Selection of callus; (C) Pre-culture of callus, (D) *Agrobacterium* pellet; (E) Infection; (F) Co-cultivation on solid medium in dark for 3days; (G) Shoot induction

2) 형질전환 식물체의 유전자 도입 및 발현 분석

(1) PAT 단백질의 확인

형질전환 식물체의 PAT 단백질을 간단하게 확인하기 위해 PAT strip test kit(Trait LL Test strip)을 사용하였다. 이 strip membrane의 상부에는 control band를 형성하는 흡수 pad가 있고, 하부에는 PAT 단백질에 특이적인 항체에 붉은색 색소를 결합시킨 복합체가 존재한다. 이 strip을 PAT 단백질이 발현된 식물조직의 추출물에 넣으면 용액이 흡수되면서 항체-색소 복합체에 PAT 단백질이 결합하여 붉은색의 띠를 형성하게 된다. 따라서 *bar* 유전자가 도입되지 않은 야생형 식물에서는 상부의 control band만 생성되고, *bar* 유전자가 도입된 형질전환 식물체에서는 상부의 control과 하부의 PAT 단백질이 결합한 두 개의 band를 형성하게 된다. 약 0.1g의 야생형 들잔디와 형질전환 후보체의 잎을 1.5mL tube에 잘라 넣고 0.5 mL의 증류수를 첨가한 후, pellet pestle(Sigma, USA)을 이용하여 잎조직을 분쇄하였다. 각각의 sample tube에 test strip을 넣고 5분간 반응시킨 후 PAT 단백질의 발현을 확인하였다.

(2) Genomic DNA 추출

야생형 및 형질전환 들잔디의 잎으로부터 Figure 5와 같이 CTAB법(Murray and Thomson, 1980)을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 이용하여 genomic-PCR 및 Southern blot 분석을 수행하였다.

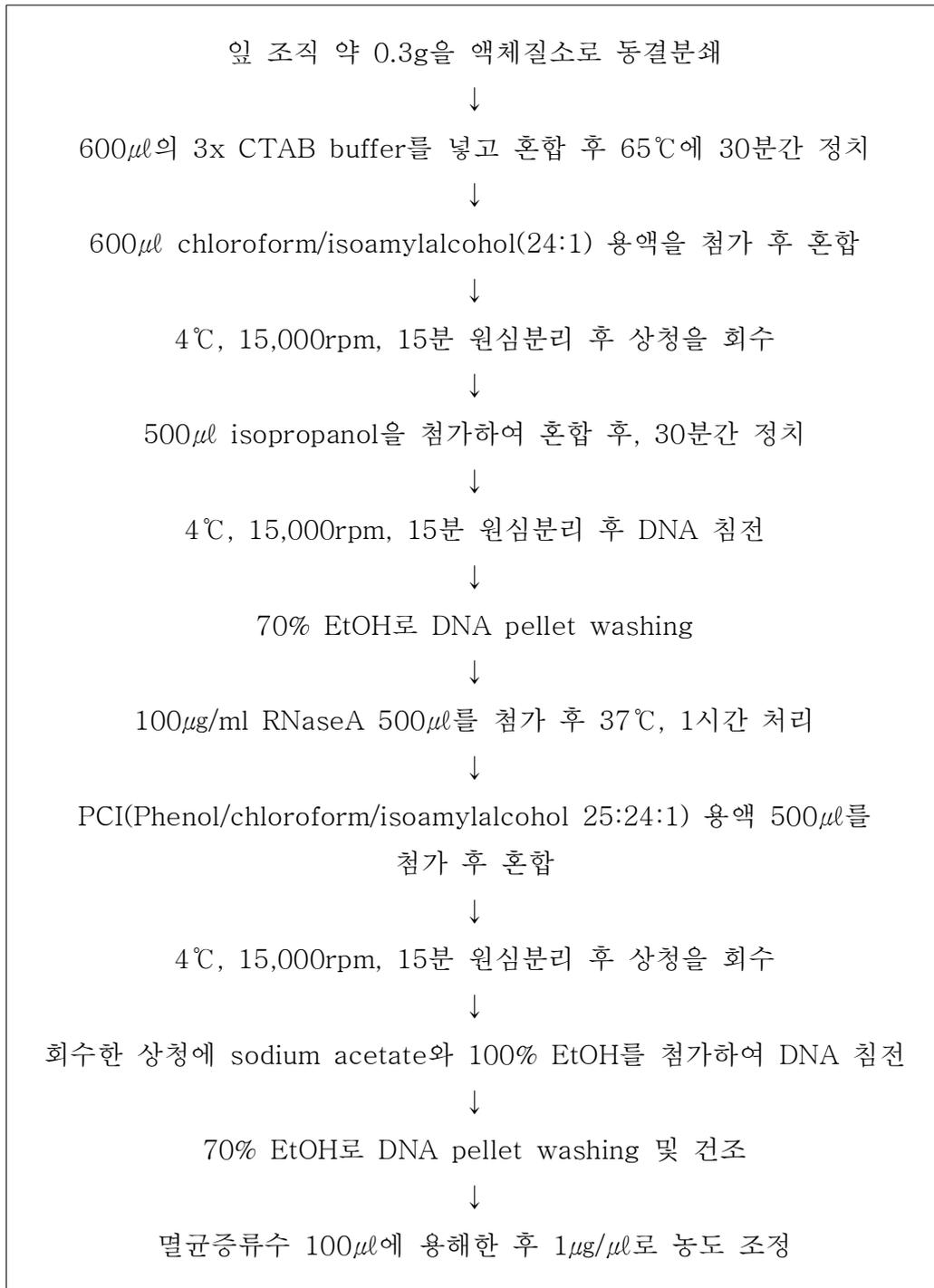


Figure 5. Genomic DNA extraction from wild type and transgenic plants.

(3) PCR 분석

GSDL1 유전자의 도입을 확인하기 위해 Figure 6과 같은 방법으로 genomic-PCR 분석을 수행하였다. 879bp 크기의 *GSDL1* 유전자를 증폭하기 위한 primer로는 forward primer(5'- CCC GGG ATG GCT GGT CTT GAT CTA GGC A -3')와 reverse primer(5'- CCC GGG TCA GAA AGG ACC TCT TCC ACC G -3')를 디자인하여 사용하였다. PCR 산물은 EtBr을 첨가한 1% Agarose gel에 loading하여 전기영동한 후 band를 확인하였다.

<u>반응액의 조성</u>	<u>Genomic-PCR 조건</u>		
Genomic DNA 25ng	2 μ l	Pre-denaturation	95 $^{\circ}$ C, 5min
10x Taq polymerase buffer (TAKARA, JAPAN)	2 μ l		
25mM dNTP	2 μ l	Denaturation	95 $^{\circ}$ C, 30sec
Taq DNA polymerase (TAKARA, JAPAN)	0.2 μ l	Annealing	60 $^{\circ}$ C, 30sec
		Extension	72 $^{\circ}$ C, 30sec
10pM Forward primer	0.4 μ l		} 30cycles
10pM Reverse primer	0.4 μ l		
Sterile distilled water	13 μ l	Post-elongation	
-----	----		
Total	20 μ l		

Figure 6. Genomic-PCR reaction conditions for *GSDL1* gene in transgenic plants.

(4) Southern blot 분석

야생형 및 형질전환 식물에서 추출한 10 μ g genomic DNA를 사용하여 Southern blot 분석을 수행하였다. Genomic DNA를 *Bam*HI(TAKARA, Japan)으로 37 $^{\circ}$ C에서 약 24시간동안 처리한 후 1% Agarose gel에서 50V, 4시간 전기영동하여 분리하였다. 전기영동한 gel을 EtBr 용액에 약 30분간 염색한 후 UV light하에 DNA를 확인하였고, 0.25M HCl 용액에서 15분, 변성용액(0.5M NaOH, 1.5M NaCl)에서 15분씩 2회, 중화용액(0.5M Tris-HCl, pH7.5, 1.5M NaCl)에서 15분씩 2회 처리한 후 20xSSC (3M NaCl, 0.3M sodium citrate, pH 7.0) 버퍼에서 10분간 평형화하였다. 그 다음 20xSSC 버퍼를 사용하여 나일론 membrane에 transfer하였다. 약 16시간 transfer 후 membrane을 80 $^{\circ}$ C에서 2시간 baking하여 DNA를 고정하였다. DNA가 고정된 membrane을 High-SDS buffer(50% formamide, 5xSSC, 50mM sodium phosphate pH 7.0, 2% blocking reagent, 0.1% N-laurylsarcosine)에서 pre-hybridization (45 $^{\circ}$ C, 1시간)한 후, DIG-labeled *GSDL1* probe 20 μ l를 첨가한 hybridization 용액을 넣어 45 $^{\circ}$ C에서 약 16시간동안 반응시켰다. Hybridization 후 membrane을 2x wash buffer(2xSSC, 0.1% SDS)에서 65 $^{\circ}$ C, 5분씩 2회, 0.1x wash buffer(0.1xSSC, 0.1% SDS)에서 65 $^{\circ}$ C, 15분씩 2회 세정하였다. 그 후 2% blocking solution으로 2시간동안 blocking하고, blocking buffer에 anti-Digoxigenin-AP를 10,000배 희석한 항체용액에서 30분간 반응시켰다. 항체와 반응시킨 membrane을 washing buffer(0.15M NaCl, 0.1M Maleic acid, 0.3%, tween20, pH 7.5)로 15분씩 2회 세척하고, detection buffer(0.1M Tris, 0.1M NaCl, pH 9.5)에서 5분간 평형화하였다. Membrane 위에 CDP-star를 고르게 뿌려준 후 5분간 반응시켜 LAS-4000을 사용하여 signal을 검출하였다.

(5) Total RNA 추출

야생형 및 형질전환 들잔디의 잎으로부터 Figure 7과 같은 방법으로 total RNA를 추출하였으며, 추출한 RNA는 도입유전자의 발현확인을 위한 RT-PCR 분석에 사용하였다.

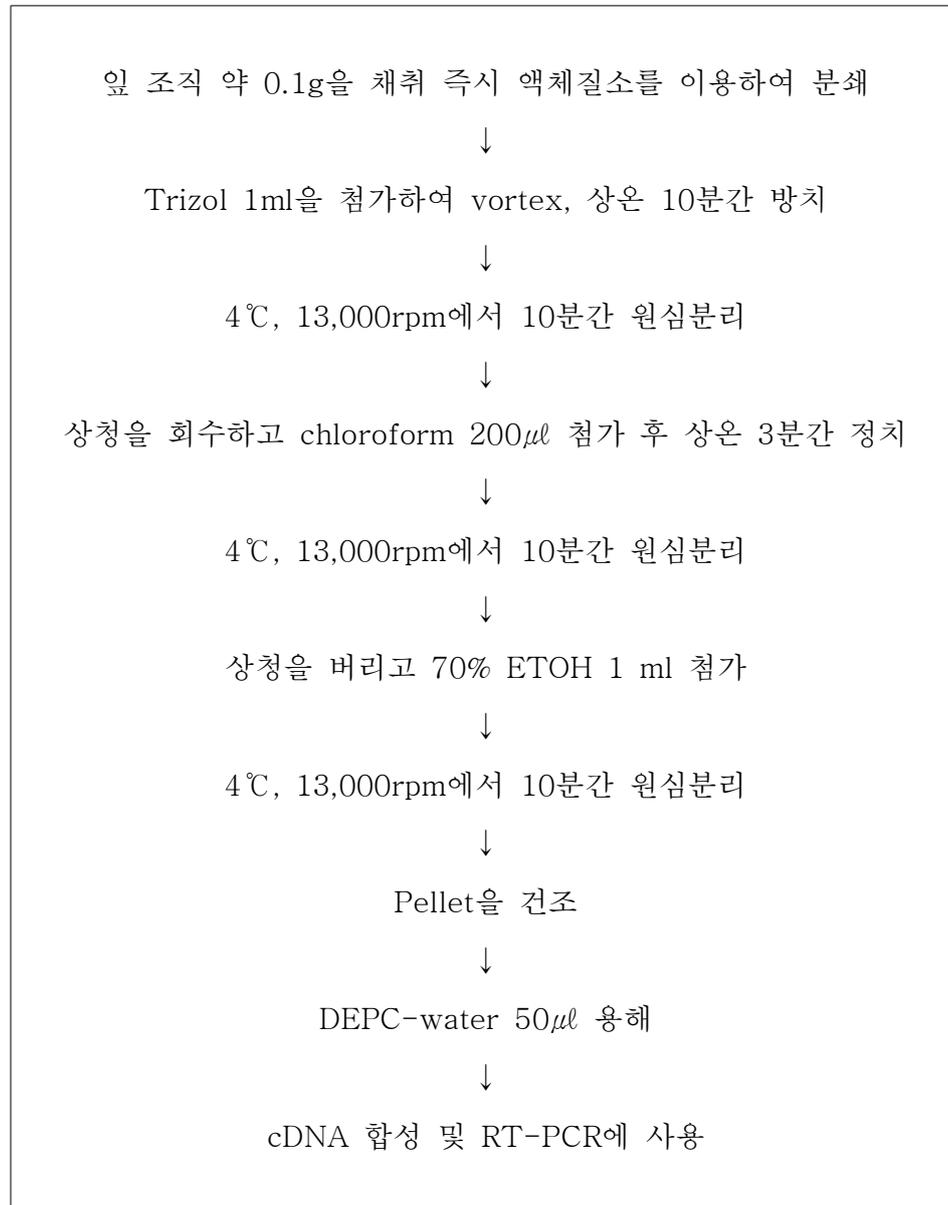


Figure 7. Total RNA extraction from wild type and transgenic plants.

(6) RT-PCR

추출한 total RNA를 이용하여 Figure 8과 같은 방법으로 cDNA를 합성하고, 합성한 cDNA를 template으로 *GSDL1* 특이적 primer 세트를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. Standard control로는 18s ribosomal RNA primer 세트를 사용하였다. PCR 산물은 1% Agarose gel에 loading 한 후 전기영동하여 band를 확인하였다.

<u>cDNA 합성</u>	<u>Genomic-PCR 조건</u>			
Total RNA	1 μ g	Pre-denaturation	95 $^{\circ}$ C, 5min	
Oligo(dT) primer	5 μ l			
M-MLV 5x reaction buffer	5 μ l			
10mM dNTP	5 μ l	Denaturation	95 $^{\circ}$ C, 30sec	
25unit Recombinant Rnasin		Annealing	60 $^{\circ}$ C, 30sec	
ribonuclease inhibitor	0.5 μ l	Extension	72 $^{\circ}$ C, 30sec	
200unit M-MLV Reverse transcripase (Promega)	1 μ l		} 20cycles	
DEPC-water	fill up	Post-elongation		72 $^{\circ}$ C, 10min
-----	----			
Total	25 μ l			

Figure 8. cDNA synthesis and RT-PCR reaction conditions for *GSDL1* gene.

3) *GSDL1*-형질전환 식물의 특성 분석

(1) 암 조건에서 형질전환 식물의 특성 조사

야생형 들잔디와 *GSDL1*-형질전환 식물의 잎을 약 2cm 길이로 잘라 3mM MES 용액에 담근 후 25℃, 암조건에 처리하였다. 약 2일 간격으로 시간경과에 따른 잎의 형태 변화를 관찰하였고, 동시에 chlorophyll 함량을 측정하였다.

(2) 산화스트레스 조건에서 형질전환 식물의 특성 조사

야생형 들잔디와 *GSDL1* 형질전환 식물의 잎을 약 2cm 길이로 잘라 3mM MES, 15mM 과산화수소(H₂O₂) 혼합용액에 담근 후 25℃, 장일조건에 처리하여 시간경과에 따른 잎의 형태 변화를 관찰하였고, 동시에 chlorophyll 함량을 측정하였다.

(3) 형질전환 들잔디의 건조스트레스에 대한 내성 조사

GSDL1 유전자가 도입된 형질전환 식물이 건조스트레스에 대한 내성을 나타내는지 확인하기 위해 야생형 들잔디와 형질전환 식물의 잎 절편을 잘라 200mM mannitol이 첨가된 1/2MS 배지위에 치상하고 25℃, 장일조건에 처리하여 시간경과에 따른 잎의 변화를 관찰하였다.

2. 결과 및 고찰

1) 형질전환 들잔디의 선발

형질전환에는 재분화능이 있고 유전자의 도입이 유리한 callus 선발이 가장 중요한 것으로 생각된다. 기존의 들잔디 형질전환 연구에서 보고한 바와 같이 (Toyama et al., 2003), callus 유도배지에서 callus를 유도한 뒤 노랗고 잘 부서지는 형태의 callus를 선발하였으며, CaCl_2 를 생략한 MS 배지에서 증식시킨 callus 라인들 중 일부 라인만 형질전환이 되는 결과를 보였다. 이는 Ca^{2+} 이 생략된 MS배지에 callus를 증식시키는 과정에서 감염효율이 높은 callus가 형성된 것으로 보이며, 감염 및 공동배양배지에 Ca^{2+} 을 다시 첨가해 주는 것 또한 callus의 감염효율을 높이는 중요한 과정으로 생각된다. 이와 유사하게 *Agrobacterium*을 이용하여 바나나를 형질전환한 연구(Sreeramanan et al., 2010)에서 *Agrobacterium*의 도입에 Ca^{2+} 을 생략한 공동배양배지 조건이 식물 세포벽의 구조 변형에 영향을 준 것으로 보고된 바 있다.

Agrobacterium 감염, 공동배양 후 callus를 cefotaxime이 포함된 멸균수로 씻어내고 균체거 배지에 치상한 결과, 일부 callus는 갈변되는 결과를 보였는데 이는 균체거 과정 중 callus가 damage를 입은 것으로 예상된다. 균체거 배지에 감염한 callus를 치상한 후 *Agrobacterium*의 over-growing을 방지하기 위해 cefotaxime이 포함된 균체거 배지를 약 2주에 한 번씩 3~4회 새 배지로 계대배양 하였고, 균체거 후의 callus를 250mg/L cefotaxime 과 1~5mg/L PPT가 포함되어 있는 재분화 배지에 치상하였다.

유전자가 도입된 것으로 예상되는 식물체는 Figure 9와 같이 PPT가 포함된 배지에서 왕성하게 자라는 결과를 보였으며, shoot가 5cm 이상 자란 개체를 PPT가 포함된 1/2 MS배지에 계대배양하여 뿌리를 유도하였다. 개체들 중 일부는 shoot가 고사하거나 뿌리를 유도하지 못하는 결과를 보였는데, 이는 *bar* 유전자가 escape 된 것으로 추정된다.

PPT가 포함된 배지에서 shoot와 뿌리의 생장이 왕성했던 개체들 중 다수의 클론이 확보된 5개체를 선발하여 이 후의 분석에 사용하였다.

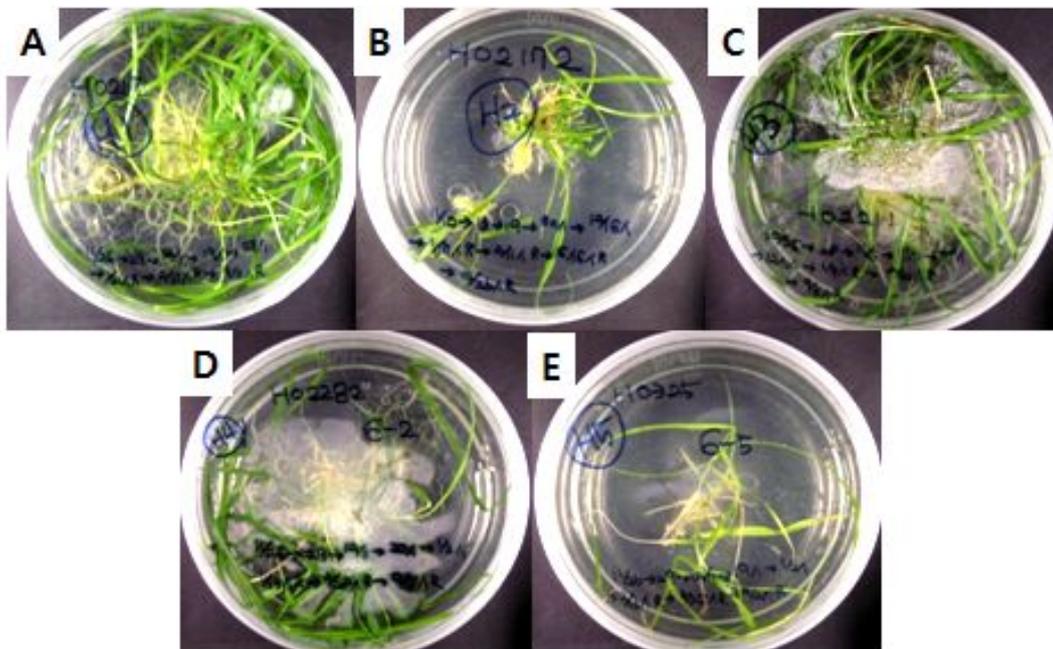


Figure 9. Production of *GSDL1*-transgenic zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated transformation.

A, H1 line; B, H2 line; C, H3 line; D, H4 line; E, H5 line

2) 형질전환 들잔디의 유전자 도입 및 발현 분석

(1) PAT 단백질의 확인 및 genomic-PCR

선발한 5개 라인의 형질전환체의 잎을 잘라 PAT detection kit를 사용하여 PAT 단백질의 발현을 확인하였다(Figure 10A). 그 결과 IG-2 공vector가 도입된 control 형질전환 식물과 *GSDL1* 유전자를 도입하여 선발한 5개체의 식물에서 PAT protein의 발현이 확인되었다. *Bar* 유전자가 선발마커 유전자로 사용된 형질전환 식물체의 PAT test strip을 이용한 screening은 간편하고 형질전환체의 빠른 판별에 효율적임을 알 수 있었다 (Zapiola et al., 2008, Sun et al., 2010).

형질전환 식물에 *GSDL1* 유전자가 도입되었는지를 확인하기 위해 5개 라인의 genomic-PCR을 수행하였다(Figure 10B). *GSDL1* 특이적 primer를 이용한 PCR을 수행한 결과, 야생형과 IG-2 공vector가 도입된 control 형질전환 식물에서는 band가 확인되지 않았으나, 선발한 형질전환체 5개 라인에서는 879bp 크기의 *GSDL1* 유전자가 도입되었음을 확인할 수 있었다.

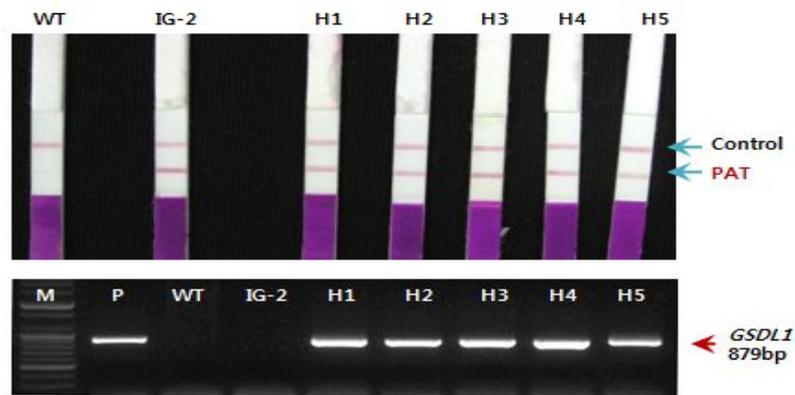


Figure 10. PAT protein detection and PCR analysis of *GSDL1* gene in transgenic *Zoysia japonica* Steud.

(A) PAT protein detection of 5 selected PPT resistant plants; (B) Genomic-PCR analysis of putative transgenic zoysiagrass. M, marker DNA; P, positive control; WT, wild type plant; IG-2, IG-2 vector control plant; H1-H5, *GSDL1*-transgenic plants (879bp)

(2) Southern blot 분석

도입된 유전자의 copy수를 확인하기 위하여 Southern blot 분석을 수행하였다(Figure 11). T-DNA 내부영역에서 single cut 제한효소인 *Bam*HI을 처리한 10 μ g genomic DNA와 DIG-labelling한 *GSDL1* probe를 이용하여 분석한 결과, H1, 2, 3, 5 라인은 각각 서로 다른 위치에서 1개의 band가 검출되어 1copy의 유전자가 도입된 것이 확인되었으며, H4 라인은 서로 다른 위치에서 2개의 band가 검출되어 2copy의 유전자가 도입된 것으로 확인되었다. 따라서 *GSDL1* 형질전환 들잔디 5 라인은 모두 독립된 개체임을 알 수 있었다.

*Agrobacterium*을 매개로 하는 형질전환에서는 목적 유전자가 single copy로 도입되는 빈도가 높은 것으로 알려져 있는데(Hiei et al 1997), *GSDL1* 유전자가 도입된 형질전환 식물에서도 분석한 5 라인 중 4 라인에서 single copy 유전자가 도입되어 이와 유사한 결과를 나타내었다.

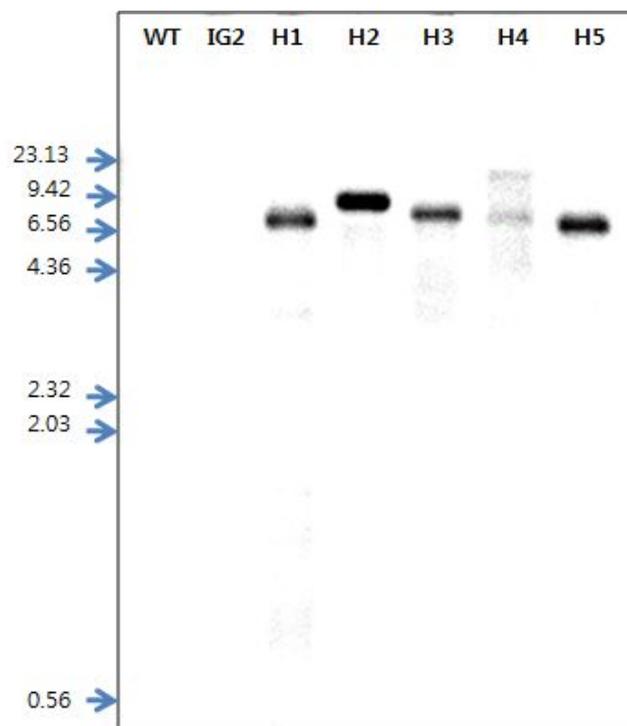


Figure 11. Southern blot analysis of *GSDL1*-transgenic zoysiagrass.

(3) RT-PCR

각 형질전환 식물에서 *GSDL1* 유전자의 발현을 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 야생형 들잔디와 IG-2 공vector가 도입된 control 형질전환 식물에서는 band가 확인되지 않았으나, 선발한 형질전환체 5개 라인에서는 *GSDL1* 유전자의 발현을 확인할 수 있었다. 특히 H1, 2, 5 라인이 H3, 4 라인보다 발현량이 높은 것으로 나타났으며(Figure 12), 보다 정량적인 비교를 위해서는 Real-Time PCR 또는 Northern blot 분석이 필요할 것으로 보인다.

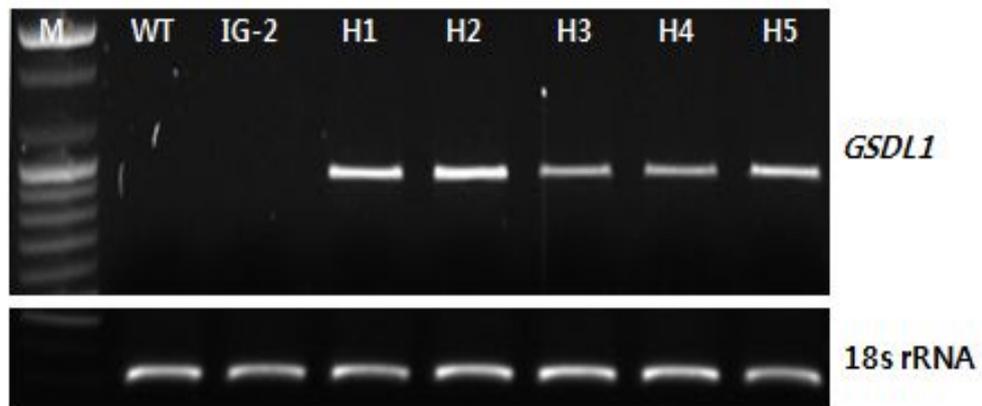


Figure 12. RT-PCR analysis of *GSDL1*-transgenic *Zoysia japonica* Steud. M, marker DNA; P, positive control; WT, wild type plant; IG-2, IG-2 vector control plant; H1-H5, *GSDL1*-transgenic plants; 18s rRNA, 18s ribosomal RNA

3) *GSDL1* 형질전환 식물의 특성 분석

GSDL1 유전자의 도입 및 발현이 확인된 형질전환 들잔디의 특성을 분석하기 위해 암조건, 산화 스트레스 조건 및 건조 스트레스 조건에 형질전환 식물을 처리하고 phenotype의 변화 및 chlorophyll 함량의 변화를 분석하였다.

(1) 암 조건에서의 특성 분석

암 조건은 식물의 노화를 촉진시키는 환경스트레스 중 하나로 알려져 있기 때문에 식물의 생리적 특성 검증에 많이 이용되고 있다(Kleber and Krupinska, 1997). 본 실험에서는 노화지연의 특성을 조사하기 위해 3mM MES 용액에 야생형 및 형질전환 식물의 잎절편을 넣어 암조건에 처리한 후, 시간경과에 따른 잎의 형태변화를 관찰하고 동시에 chlorophyll 함량을 측정하였다(Figure 13, 14). 그 결과, 야생형 들잔디는 처리 후 7일째부터 잎의 노화가 관찰되기 시작하였고, 21일째에는 chlorophyll 함량이 처음함량의 30% 미만으로 감소하는 결과를 나타내었다. *GSDL1* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디 H1, 2, 5 라인의 경우에는 야생형보다 5일정도 지연된 처리 후 약 12일째부터 잎의 노화가 관찰되었고, 처리 후 21일째에도 chlorophyll 함량이 처음함량의 40~50% 수준을 유지하는 결과로부터 형질전환 잔디는 야생형에 비해 약 2배정도 노화지연의 특성을 가짐을 알 수 있었다. H1, 2, 5 라인에서 노화지연의 특성이 H3, 4 라인보다 더 강하게 나타난 것은 이들 라인의 발현량이 H3, 4 라인보다 높기 때문인 것으로 보인다. *GSDL1* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디는 선행연구된 *GSDL1* 유전자 또는 *ORE7* 유전자가 과발현된 애기장대(Lim et al., 2007)와 비슷한 노화지연의 특성을 나타내었다.

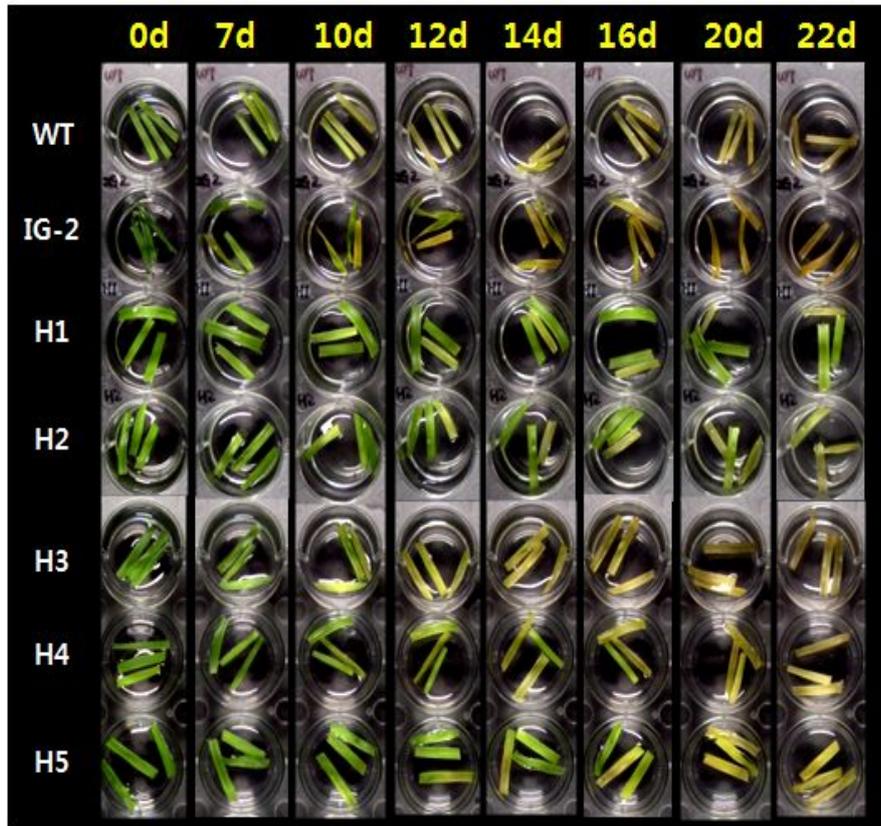


Figure 13. Dark-induced senescence phenotype analysis of detached leaves of wild type(WT), IG-2 vector control plant(IG-2) and *GSDL1*-transgenic plants(H1-H5).

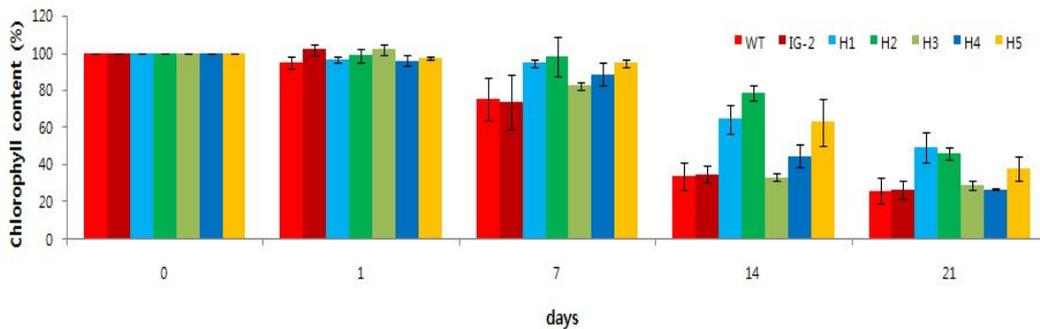


Figure 14. The changes of chlorophyll content in detached leaves during dark incubation. WT, wild type; IG-2, IG-2 vector control plant; H1-H5, *GSDL1*-transgenic plants

(2) 산화스트레스 조건에서의 특성 분석

산화스트레스 저항성을 조사하기 위해 3mM MES와 15mM 과산화수소를 혼합한 용액에 야생형 및 형질전환 식물의 잎절편을 처리 후, 시간경과에 따른 잎의 형태변화를 관찰함과 동시에 chlorophyll 함량을 측정하여 비교 분석하였다 (Figure 15, 16). 그 결과 들잔디 야생형과 형질전환체 모두 chlorophyll 함량이 현저히 감소하는 유사한 양상을 보였으며, 야생형 들잔디보다 H3, 4, 5 라인은 chlorophyll 함량이 조금 개선된 결과를 보였으나 육안으로 관찰했을 때에는 그 차이가 거의 없었고, 형질전환 들잔디 5 라인 모두 IG-2 공vector가 도입된 control 식물체보다 chlorophyll 함량이 현저히 감소한 결과를 보였다. 보고된 *ORE7* 유전자가 과발현된 애기장대(Lim et al., 2007)에서도 이와 유사한 실험을 수행하였으며, 과산화수소 처리 5일 후 chlorophyll 함량이 야생형은 완전히 없어진 것에 비해 형질전환체는 약 80% chlorophyll 함량을 나타내었다. *GSDL1* 유전자를 도입한 들잔디에서도 저항성을 나타낼 것으로 예상하였으나, 산화스트레스에 대한 저항성은 없는 것으로 확인되었다.

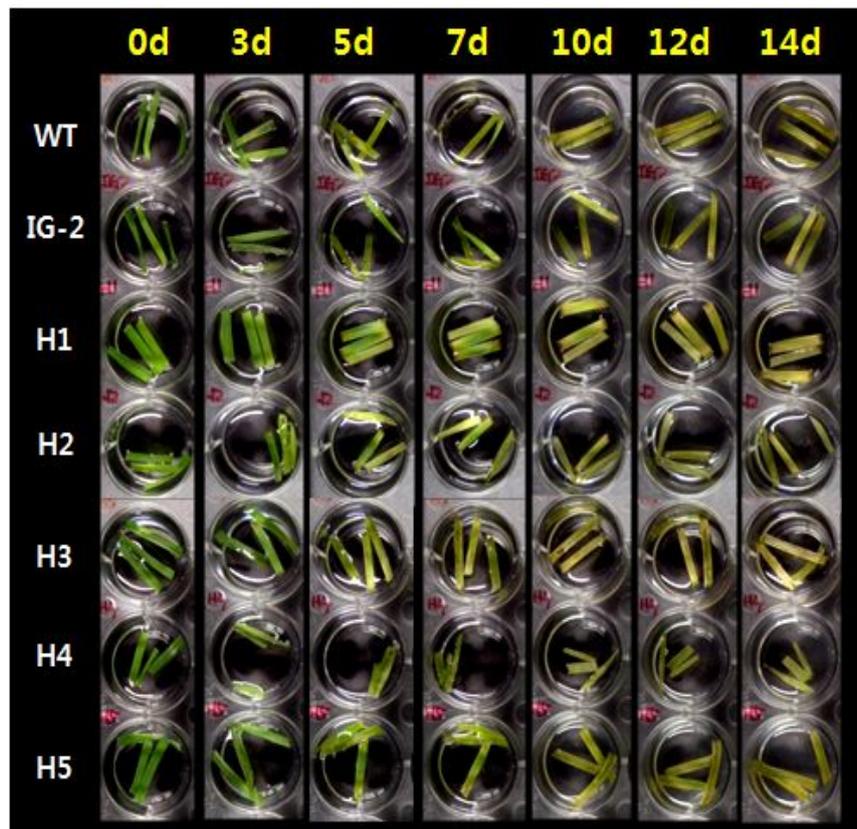


Figure 15. Oxidative stress-induced senescence phenotype analysis of detached leaves of wild type(WT), IG-2 vector control plant(IG-2) and *GSDLI*-transgenic plants (H1-H5).

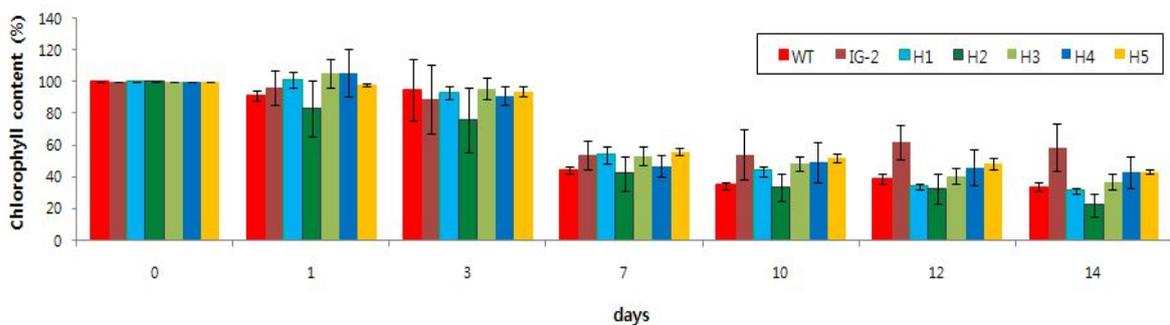


Figure 16. The changes of chlorophyll content in detached leaves during hydrogen peroxide-induced senescence. WT, wild type; IG-2, IG-2 vector control plant; H1-H5, *GSDLI*-transgenic plants

(3) 건조스트레스 조건에서의 특성 분석

건조스트레스에 대한 저항성 조사를 위해 200mM mannitol이 첨가된 1/2 MS 배지에 잎절편을 치상하고 암조건에서 잎의 형태변화를 관찰하였다. 그 결과 야생형 들잔디는 시간이 지남에 따라 잎의 현저한 노화현상이 관찰되었고, 처리 후 32일째에는 잎이 완전히 노화되었다(Figure 17). *GSDLI*-형질전환 식물 중 H1, 2, 5 라인은 처리 후 32일째에도 잎의 노화가 거의 진행되지 않았으며, H3, 4 라인의 경우에는 처리 후 약 27일째부터 노화가 시작되는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 *GSDLI* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디는 건조스트레스에 대한 저항성이 크게 향상되었음을 시사한다. 또한 H1, 2, 5 라인이 H3, 4 라인보다 건조스트레스에 저항성이 더 강하게 나타난 것은 H3, 4 라인보다 발현량이 높기 때문인 것으로 판단된다.

보고된 연구들 중 애기장대에 식물의 삼투스트레스 조절에 중요한 신호역할을 하는 *SRK2C* 유전자(Umezawa et al., 2004)와 *p5cs* 및 *rab18* 유전자(Knight et al., 1998)를 도입한 애기장대 과발현체의 유전자의 기능을 분석한 결과에서 형질전환식물의 건조스트레스 저항성 실험에 본 실험과 유사하게 mannitol을 처리하여 연구를 수행하였으며, 잎의 노화 정도에 따라 건조스트레스에 저항성이 향상되었음을 확인하였다. 또한 *GSDLI*-형질전환 식물은 선행연구된 *GSDLI* 유전자를 과발현한 애기장대에서도 건조 스트레스에 대한 내성이 향상된 형질을 나타내었으며, 보고된 *ORE7* 유전자(Lim et al., 2007)가 도입된 애기장대에서 노화지연 뿐만 아니라 건조스트레스에 대한 저항성도 증가한 결과를 나타내어 본 실험 결과와 유사하였다. 또한 각종 환경스트레스에 저항성을 나타내는 *NAC* 전사인자의 도입에 의해 염 스트레스 저항성과 함께 건조스트레스 저항성이 향상된 형질전환 벼(Hu et al., 2006)와도 비슷한 결과를 보였다. 보고된 논문들을 검토한 결과, 환경스트레스 저항성에 관련된 유전자가 도입된 형질전환 식물은 건조, 염, 산화 스트레스 등 복합적인 스트레스 저항성을 나타내는 결과를 보였다. 따라서 들잔디에 도입된 *GSDLI* 유전자 또한 잎의 노화지연 뿐만 아니라 건조스트레스에 중요한 기능을 하고 있음을 예상할 수 있다.

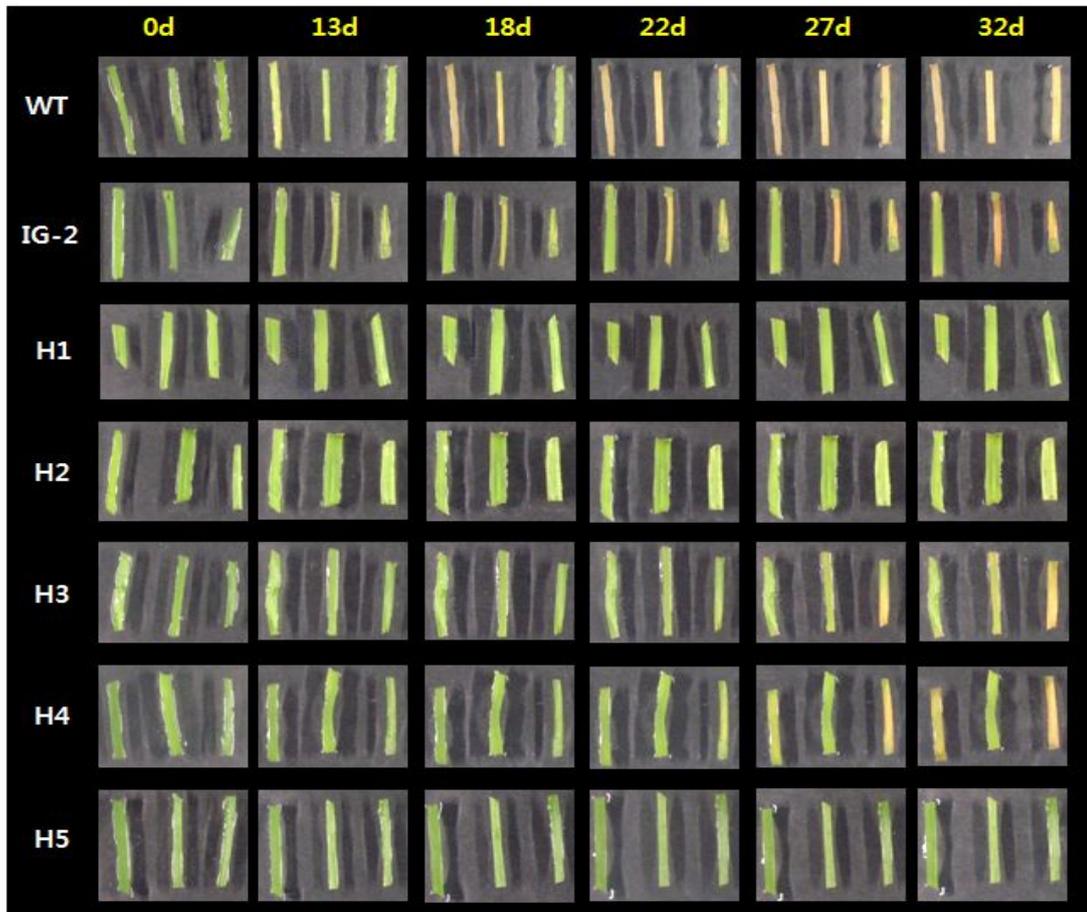


Figure 17. Drought-induced senescence phenotype analysis of detached leaves of wild type(WT), IG-2 vector control plant(IG-2) and *GSDL1*-transgenic plants(H1-H5).

III. Kentucky bluegrass 성숙종자를 이용한 효율적인 재분화 조건의 확립

1. 재료 및 방법

1) Callus 유도에 미치는 2,4-D와 BA의 영향

Kentucky bluegrass의 재배품종 Bedazzle, Blueberry, Common, Diva, Midnight 등 5품종의 성숙종자를 사용하여 재분화능이 있는 callus 유도율이 높은 배지를 선발하기 위해 2,4-D(0, 1, 2, 4mg/L)와 BA(0, 0.1, 1mg/L)를 농도별로 조합한 MS 기본배지(3% sucrose, Gelrite 0.3%, pH 5.8)에 종자를 치상하여 5품종의 callus 유도율을 조사하였다. 70% EtOH 용액에 종피를 제거한 종자를 넣어 1분간 처리하고, 5% sodium hypochlorite 용액에 20 μ l tween-20을 첨가하여 15분 동안 표면살균한 후, 멸균수로 4~5회 거품을 없앨 때까지 세척하였다. 표면살균한 종자를 멸균된 여과지 위에 올려 물기를 제거하고, 2,4-D와 BA가 농도별로 조합된 callus 유도배지 12가지 구성에 간격을 두어 종자를 치상하였다. 4~5주 동안 25 $^{\circ}$ C 암조건 하에서 callus를 유도하였고 callus 유도율은 백분율로 나타내었다(유도된 callus / 치상된 종자 수 x 100).

2) Kentucky bluegrass 품종별 재분화 효율

Callus 유도배지에 Bedazzle, Blueberry, Common, Diva, Midnight 5품종의 종자를 1)항과 같은 방법으로 세척하여 치상한 후, 노랗고 단단한 형태의 callus를 유도 및 선발하고(Figure 1a-b), 동일조성의 callus 증식배지에 계대 배양 하여 증식한 다음(Figure 1c), MS 기본배지에 3% maltose, 1mg/L BA, pH 5.8, 0.3% Gelrite가 포함된 재분화배지에 callus를 일정간격으로 치상하여 25 $^{\circ}$ C, 장일 조건하에서 shoot의 유도를 관찰하였다(Figure 1d). 재분화율은 백분율로 나타내었다(유도된 shoot / 치상된 callus 수 x 100).

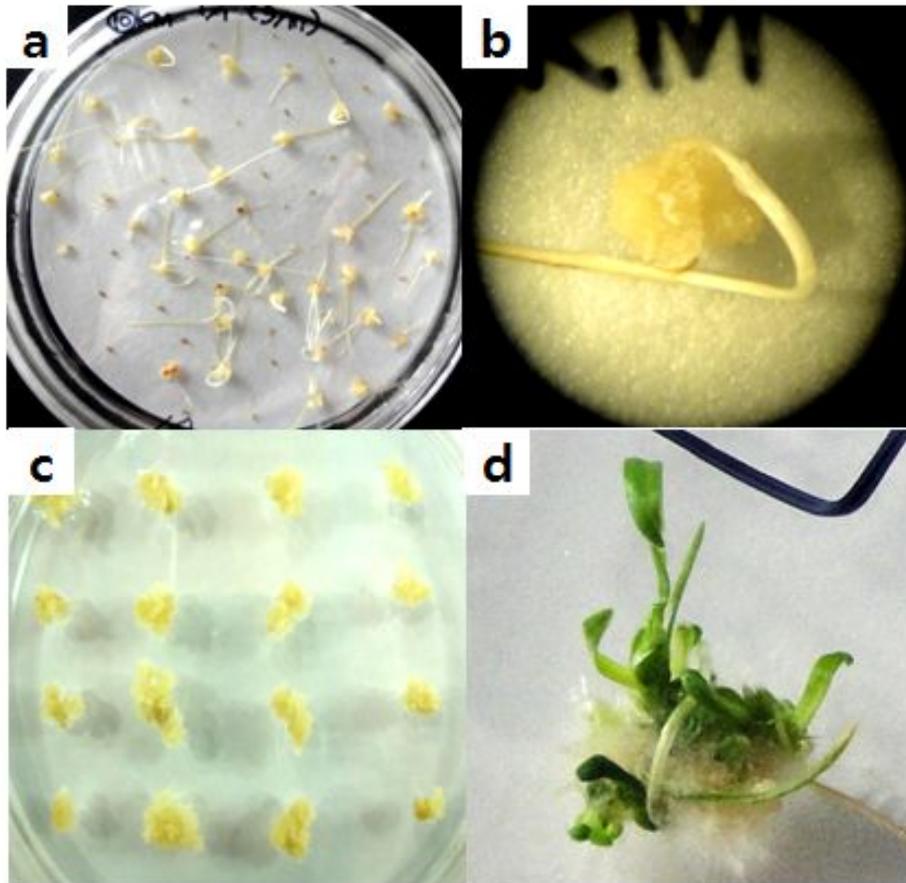


Figure 1. Procedure of regeneration from mature seed-derived callus of kentucky bluegrass

(a) Callus induction; (b) Callus selection; (c) Callus growth; (d) Shoot induction

3) 뿌리 유도 및 순화

뿌리 유도 배지(1/2 MS, 3% sucrose, pH 5.8, 0.3% Gelrite)에 각 품종별 재분화 개체를 치상하고 25℃, 장일조건에 두어 뿌리 유도 및 증식하였다. 뿌리가 유도된 개체는 25±3℃, 상대습도 60±10%, 16시간을 광주기로 조절되는 온실에 상토와 모래를 1:1로 배합한 흙이 담긴 화분에 심어 순화하였다.

4) Callus 형태의 분류

Kentucky bluegrass 재배품종 중 Midnight 종자로부터 유도된 callus를 형태별로 4가지로 분류하였다.

5) Myo-inositol 농도에 따른 callus 유도율의 조사

Midnight 품종을 이용하여 Myo-inositol이 callus 유도에 미치는 영향을 조사하기 위해 MS 배지(3% sucrose, 2,4-D 1mg/L, BA 1mg/L, Gelrite 0.3%, pH 5.8)에 myo-inositol 0, 25, 50, 100, 200mg/L을 각각 첨가하고, 종자를 치상하여 callus의 유도율을 조사하였다. 종자 파종은 위 1)항과 동일한 방법으로 처리하여 파종하였으며 25℃, 암조건 하에서 4~5주동안 callus를 유도하였다. callus 유도율은 백분율로 나타내었다(유도된 callus / 치상된 종자수 x 100).

6) Callus 유도 및 선발시 Kinetin의 혼용 처리가 재분화에 미치는 영향

Minight 품종을 이용하여 Kinetin이 재분화에 미치는 영향을 검토하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. 2,4-D 1mg/L에 kinetin (0.5, 1mg/L)을 농도별로 조합한 MS 기본배지(3% sucrose, pH 5.8, 0.3% Gelrite)에 종자를 치상하여 callus를 유도한 후 3% maltose, 1mg/L BA, pH 5.8, 0.3% Gelrite가 포함된 MS배지에서 shoot을 유도하여 재분화율을 검토하였다. 그

리고 2,4-D와 BA가 각각 1mg/L 첨가된 MS배지에서 유도된 callus를 2,4-D 1mg/L, kinetin(0.5, 1mg/L)을 농도별로 조합한 MS배지에 치상하여 1회 증식한 후, 위와 동일한 조성의 재분화 배지에서 shoot을 유도하였다. 그리고 각각 1mg/L의 2,4-D와 BA가 혼용처리된 배지에서 유도 및 증식된 callus를 동일한 재분화배지에 치상하여 재분화율을 비교분석하였다. 재분화율은 백분율로 나타내었다(유도된 shoot / 치상된 callus수 x 100).

7) BA와 TDZ의 농도별 조합처리가 재분화 효율에 미치는 영향

BA와 Thidiazuron(TDZ)을 농도별로 처리한 maltose가 포함된 MS배지에 type 1 callus를 치상하여 최적조건의 재분화배지를 선별하기 위하여 실험을 수행하였다. BA (0, 0.1, 1mg/L), TDZ (0, 0.1, 1mg/L)를 농도별로 혼합한 9가지 배지에 Midnight callus를 치상하여 25℃, 장일 조건하에서 shoot의 유도를 관찰하였다. 재분화율은 백분율로 나타내었다.(유도된 shoot / 치상된 callus 수 x 100)

8) Agarose 및 Gelrite 농도별 처리가 재분화 효율에 미치는 영향

배지에 첨가되는 Agarose 및 Gelrite 를 농도별로 처리하여 재분화율을 조사하였다. 0.7% Agarose 또는 0.2%, 0.3%, 0.5% Gelrite를 각각 처리한 배지에 callus를 치상하여 shoot의 유도를 관찰하였다. 재분화율은 백분율로 나타내었다(유도된 shoot / 치상된 callus 수 x 100)

2. 결과 및 고찰

1) Callus 유도에 미치는 2,4-D와 BA의 영향

MS 기본배지에 2,4-D와 BA를 농도별로 혼합한 12가지 처리구의 callus 유도배지에서 5품종의 callus 유도율과 노랗고 단단한 형태의 type 1 callus 유도율을 각각 조사하였다. 그 결과, Midnight와 Diva의 경우 40~50%의 callus 유도율을 보였으며, Bedazzle, Blueberry, Common는 약 20~30%의 유도율을 나타내었다(Table 1). 재분화능이 높은 노랗고 단단한 형태의 type 1 callus의 유도율은 1 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BA를 포함한 10번 처리구에서 Diva를 제외한 전품종에서 높은 결과를 나타내었다(Table 2).

Callus 유도율은 Bedazzle, Blueberry, Common, Diva 품종에서 5.58%~7.69%로 유도율이 8% 미만이었으나, Midnight는 10번 처리구에서 22.74%로 가장 높은 유도율을 나타내었다. 이 결과에서 1mg/L 2,4-D, 1 mg/L BA를 혼합처리한 10번 처리구는 5품종 중 Midnight에 가장 적합한 조성임을 알 수 있었다. 기 보고된 연구에서는 2,4-D와 BA의 혼합비율을 각기 다르게 처리한 배지에서 callus를 유도하였으며(Ke and Lee, 1996, Hu et al., 2006), callus 유도율은 20~70%로 그 효율에 큰 차이를 보였다. 재분화능이 있는 type 1 callus의 유도율은 대체로 10% 미만의 낮은 유도율을 보였고(Griffin and Dibble, 1995), 최대 약 40%의 유도율을 보인 결과도 있었다(Valk et al., 1989, Valk et al., 1995). 본 실험에서의 callus 유도율 및 type 1 callus 유도율은 이미 보고된 논문들과 비슷한 결과를 나타내었다.

Table 1. Effects of different concentrations of 2,4-D and BA on callus induction

No.	2,4-D (mg/L)	BA (mg/L)	Midnight	Common	Bedazzle	Blueberry	Diva
1	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	49.13±4.58	29.11±1.5	27.47±0.43	32.02±2.42	27.21±0.53
3	2	0	49.57±2.13	26.87±0.25	27.38±0.46	26.92±0.12	42.11±3.17
4	4	0	43.32 4.97	15.29±0.10	23.28±0.20	21.64±0.05	35.50±0.31
5	0	0.1	1.58±1.23	0	0	0	0
6	1	0.1	48.17±3.55	29.85±0.07	31.45±0.4	30.66±0.14	41.58±1.52
7	2	0.1	47.99±6.13	27.33±0.83	24.73±.27	26.47±1.26	57.44±1.6
8	4	0.1	41.58±1.61	22.66±0.44	23.95±0.88	24.00±1.12	27.33±2.44
9	0	1	0.32±0.55	0	0	0	0
10	1	1	44.68±4.19	29.37±2.22	29.33±3.28	30.74±1.60	49.42±1.44
11	2	1	44.37±2.74	26.71±1.36	30.98±1.40	29.91±1.35	39.95±4.54
12	4	1	42.62±2.12	18.01±0.14	25.92±2.62	23.15±2.47	33.78±0.88

Table 2. Effects of different concentrations of 2,4-D and BA on type1 callus induction

No.	2,4-D (mg/L)	BA (mg/L)	Midnight	Common	Bedazzle	Blueberry	Diva
1	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	0.76±0.23	0	2.07±0.73	0	0
3	2	0	0.47±0.49	0	0.56±0.01	0	0
4	4	0	0	0	0	0	0
5	0	0.1	0	0	0	0	0
6	1	0.1	18.22±4.68	4.32±2.10	7.55±4.09	2.36±1.01	7.34±3.09
7	2	0.1	7.80±2.19	0	3.23±1.03	0.46	5.56±0.15
8	4	0.1	0.12±0.20	0	1.80±0.07	0	0
9	0	1	0	0	0	0	0
10	1	1	22.73±3.40	5.58±1.04	7.69±3.07	6.70±2.13	2.92±0.58
11	2	1	12.58±1.08	1.32±0.02	4.64±1.06	2.33±0.03	4.55±2.48
12	4	1	4.3±1.38	0	2.72±0.07	0	0

2) Kentucky bluegrass 품종별 재분화 효율

Kentucky bluegrass 5품종의 callus를 유도 및 증식한 후 3% maltose, 1mg/L BA, pH 5.8, 0.3% Gelrite가 포함된 재분화 배지에서 shoot을 유도한 결과 모두 100%에 가까운 재분화율을 나타내는 것으로 확인되었다(Table 3, Figure 2). 기 보고된 연구에서는 대체로 재분화율이 낮았고 품종별 재분화 효율에도 큰 차이를 보였으나(Ke and Lee, 1996, Griffin and Dibble, 1995, Valk et al., 1989, Hu et al., 2006), 본 실험에서 사용한 다섯 품종은 동일한 배지 조성에서 모두 95% 이상의 높은 재분화율을 얻을 수 있었다. 재분화에는 배지 조성도 중요하지만 재분화능 있는 callus의 선발이 가장 중요한 것으로 생각된다. 따라서 이 후의 실험은 노랑고 단단한 형태의 재분화능이 높은 type 1 callus 유도율이 가장 높았던 Midnight 품종을 사용하여 callus 형태 분류 및 재분화능 있는 callus의 선발 배지의 조건들을 검토하였다.

Table 3. Regeneration ratio of five kentucky bluegrass cultivars

Cultivars	Regeneration ratio(%)
Midnight	98.80±1.84
Bedazzle	95.48±3.70
Blueberry	97.51±3.87
Common	95.50±5.65
Diva	100

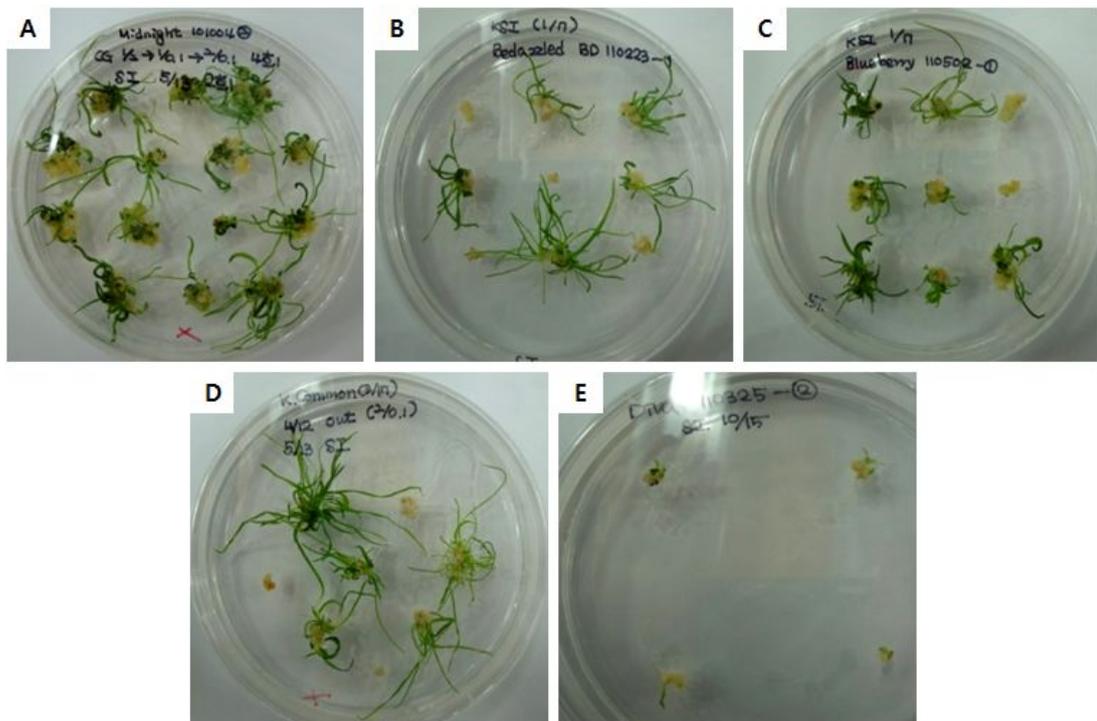


Figure 2. Regeneration of five kentucky bluegrass cultivars on regeneration medium.

(A) Midnight; (B) Bedazzled; (C) Blueberry; (D) Common; (E) Diva

3) 뿌리 유도 및 순화

Kentucky bluegrass 종자로부터 callus를 유도 및 증식하고 재분화배지에 치상한 결과 약 3주 후 callus로부터 shoot가 유도되었고, Diva를 제외한 4품종이 1/2MS 배지에서 뿌리가 유도되었다(Figure 3A-D). 뿌리가 유도된 개체는 화분에 심어 순화하였다(Figure 3E).

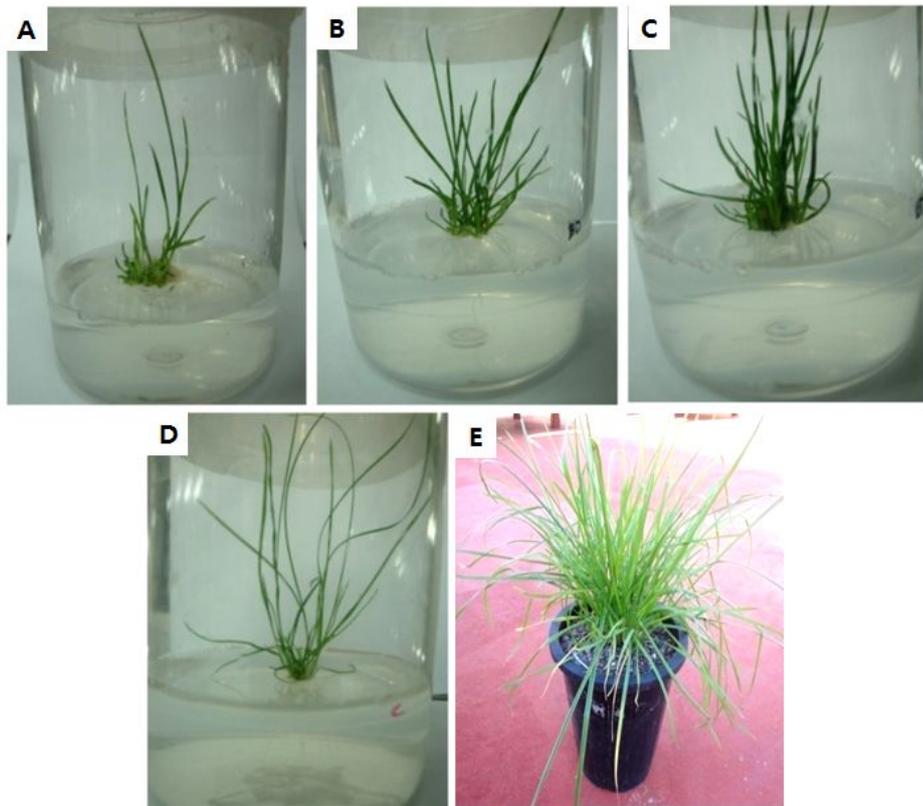


Figure 3. Root induction of five kentucky bluegrass cultivars on 1/2MS medium.

(A) Midnight; (B) Bedazzle; (C) Blueberry; (D) Common; (E) Acclimation

4) Callus 형태의 분류

2,4-D, BA 혼합 조성에서 노랑고 단단한 형태의 callus 유도율이 가장 높았던 Midnight 품종을 사용하여 재분화능 있는 callus를 선별하기 위해 callus를 4가지 형태로 분류하였다(Figure 4). 연노란색의 물기가 없는 단단하고 조직적인 형태의 callus를 type 1, 물기가 없고 단단하며 일부 갈변된 형태의 callus를 type 2, 노란색의 물기가 많고 부드러운 형태의 callus를 type 3, 희고 물기가 많은 callus를 type 4로 분류하였다. 이 중 단단한 형태의 type 1 callus와 type 2 callus의 밝은 부분에서 재분화가 잘되는 결과를 나타내었으며, type 3 callus와 type 4 callus와 같은 물기가 많고 부드러운 callus에서는 재분화가 되지 않는 결과를 보였다.

앞서 수행한 들잔디의 재분화능 있는 단단하고 잘 부스러지는 callus와 유사한 형태를 보였으나, Midnight의 callus는 들잔디 callus 보다 좀 더 단단하고 응축된 형태를 보였다. 이는 이미 보고된 kentucky bluegrass 여러 품종에서의 결과 (Valk et al., 1989, Ke and Lee, 1996)와 거의 유사함을 알 수 있었다.

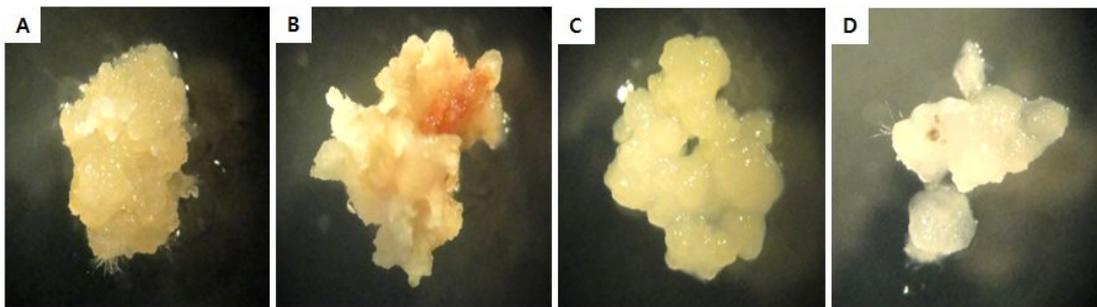


Figure 4. Classification of mature seeds-derived callus type from kentucky bluegrass cv. Midnight.

(A) Bright yellow, hard and compact type; (B) Bright yellow and partially brownish, hard and compact type; (C) Bright yellow, watery and soft type; (D) Ivory, watery and soft type

5) Myo-inositol 농도에 따른 callus 유도율의 조사

Myo-inositol이 callus 유도율에 영향을 주는지를 확인하기 위해 Midnight 품종을 사용하여 1mg/L 2,4-D와 1mg/L BA를 첨가한 MS 기본배지에 myo-inositol을 농도별로 처리하여 callus 유도율을 조사하였다(Table 4). 그 결과 Myo-inositol을 0, 25, 50, 100, 200mg/L 농도별로 처리하여 callus 유도율을 조사한 결과에서 각 처리 농도별 callus 유도율 약 20%로 큰 차이가 없음을 알 수 있었다.

Myo-inositol은 조직배양에서 당과 비슷한 탄소원으로 첨가하기도 하며 세포 분열 및 세포의 배발생을 포함한 다양한 생리적 단계에 합성되는 것으로 보고되어(Abid et al., 2009, Jie et al., 2011) myo-inositol의 농도별 처리가 kentucky bluegrass의 callus 유도율에 영향을 미칠 것으로 예상하였으나, 각 농도별 처리구에서의 callus 유도율은 큰 차이가 없었다.

Table 4. Effects of different concentrations of myo-inositol on callus induction (cv. Midnight)

no.	myo-inositol (mg/L)	number of seed	induced callus	callus frequency(%)	number of type1 callus	type1 callus frequency(%)
1	0	731	364	49.8	162	22.2
2	25	811	419	51.7	218	26.9
3	50	778	397	51	167	21.5
4	100	665	319	48	134	20.2
5	200	666	371	55.7	157	23.6

6) Callus 유도 및 선발시 Kinetin의 혼용처리가 재분화에 미치는 영향

Midnight 품종을 사용하여 2,4-D와 kinetin을 혼합 처리한 배지에서의 callus 유도율 및 재분화에 미치는 영향을 조사하였다. Callus 유도배지에 1mg/L 2,4-D와 kinetin 0.5, 1mg/L 각각 첨가한 배지에 종자를 치상하여 callus를 유도한 후, type1 callus를 선발하여 MS배지에 3% maltose, BA 1mg/L, pH 5.8, 0.3% Gelrite가 포함된 재분화배지에서 shoot 유도율을 조사하였다. 또한 1mg/L 2,4-D, 1mg/L BA를 혼용처리한 배지에서 callus를 유도하여 type1 callus를 선발한 후, 1mg/L 2,4-D, kinetin 0, 0.5, 1mg/L이 각각 첨가된 배지에 callus를 치상하여 shoot의 유도율을 조사하였다. 그 결과, BA를 포함하는 배지에서 유도한 callus는 shoot가 정상적으로 성장하는데 반해 kinetin을 포함하는 배지에서 유도한 callus에서는 shoot의 유도 속도가 느린 결과를 보였다 (Figure 5, 6). 또한 green spot의 생성율은 높았으나 shoot의 유도율은 kinetin 0.5mg/L에서 31.25%, 1mg/L에서 43.75%를 나타내었다(Table 5). 이는 BA를 포함한 배지에서 증식한 callus가 100%에 가까운 재분화율을 보이는 것에 비해 매우 낮은 유도율이며, 증식 속도도 상당히 지연됨을 알 수 있었다. 2,4-D와 BA를 포함하는 배지에서 유도한 callus를 2,4-D와 kinetin이 포함된 배지에 1회 계대배양하여 증식한 후 shoot를 유도했을 경우에도, green spot은 약 75%로 높게 생성되었지만 shoot의 유도율은 0.5mg/L에서 6%, 1mg/L에서 15.6%로 상당히 감소함을 확인할 수 있었다(Table 6). 이들 결과는 kentucky bluegrass의 callus 유도 및 증식에 있어서 callus 유도배지에 첨가되는 성장조절제의 농도 및 종류가 callus의 증식뿐만 아니라 식물체의 재분화율에도 큰 영향을 미침을 시사한다. BA의 첨가가 화본과 작물의 재분화율을 향상시킨다는 결과가 bentgrass(Zhong et al., 1991)와 보리(Cho et al., 1998), bermudagrass (Chaudhury et al., 2000)등에서 보고된 바 있다.

Table 5. Effects of callus induction medium with supplemented different concentration of 2,4-D and kinetin on plant regeneration (cv. Midnight)

2,4-D (mg/L)	kinetin (mg/L)	green spot (%)	Shoot (%)
1	0.5	83.33±3.61	32.99±1.59
1	1	70.49±6.94	40.28±3.18

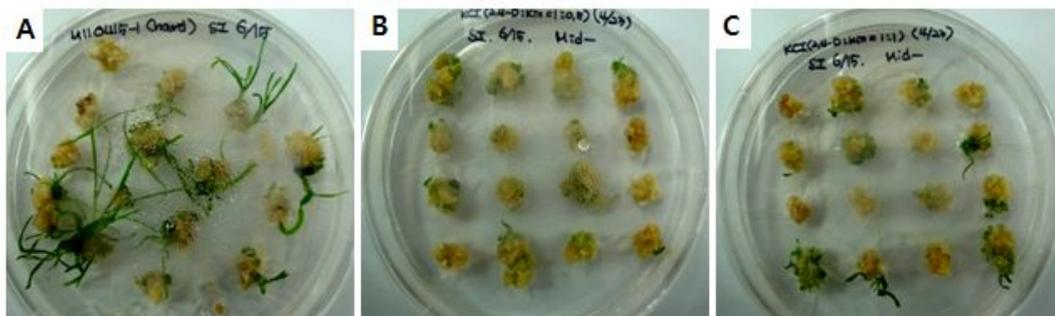


Figure 5. Effects of callus induction medium supplemented with different concentrations of growth regulators on plant regeneration (cv. Midnight).

(A), Callus induced on medium containing 1 mg/L 2,4-D and 1 mg/L BA

(B), Callus induced on medium containing 1 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L kinetin

(C), Callus induced on medium containing 1 mg/L 2,4-D and 1 mg/L kinetin

Table 6. Effects of callus growth medium supplemented with different concentration of 2,4-D and kinetin on plant regeneration (cv. Midnight)

2,4-D (mg/L)	kinetin (mg/L)	green spot (%)	Shoot (%)
1	0.5	75.86±1.98	5.25±1.84
1	1	79.51±5.35	24.31±7.54



Figure 6. Effects of callus growth medium supplemented with different concentrations of growth regulators on plant regeneration (cv. Midnight).

- (A), Callus grown on medium containing 1 mg/L 2,4-D and 1 mg/L BA
- (B), Callus grown on medium containing 1 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L kinetin
- (C), Callus grown on medium containing 1 mg/L 2,4-D and 1 mg/L kinetin

7) BA와 TDZ의 농도별 조합처리가 재분화 효율에 미치는 영향

3% maltose, pH 5.8, 0.3% Gelrite가 포함된 MS배지에 BA와 TDZ를 농도별로 혼합처리한 9개 처리구에 Midnight 품종의 callus를 치상하여 BA와 TDZ가 재분화에 미치는 영향을 조사하였다(Table 7, Figure 7). 그 결과, 1mg/L BA를 단독처리한 3번 처리구와, 0.1mg/L TDZ 단독처리 및 0.1mg/L BA와 TDZ를 혼합처리한 4, 5번 처리구에서 green spot 및 shoot의 유도율이 가장 높은 결과를 나타내었다(Table 7). 1mg/L BA를 단독처리한 배지에서는 shoot가 왕성하게 자라고 잎의 녹도도 높았으나, TDZ를 단독 및 혼합처리한 4~9번 처리구에서는 callus에 잔털이 많이 발생하고, 잎의 색이 옅고 가늘게 자라는 현상이 관찰되었다(Figure 7). 따라서 kentucky bluegrass cv. Midnight의 재분화에는 1mg/L BA가 첨가된 MS배지가 가장 적합한 것으로 사료된다.

Kentucky bluegrass의 재분화에 관한 연구에서는 각각 다른 품종이 사용되었고, 재분화 배지로는 auxin과 cytokinin을 혼합처리한 조성이 주로 이용되었으며, 재분화율도 대체로 낮은 결과를 보였다(Valk et al., 1989, Valk et al., 1995, Ke and Lee 1996, Griffin and Dibble, 1995, Hu et al., 2006). 그에 반해 본 실험에서 사용한 Midnight 품종은 1mg/L BA의 단독처리 또는 BA와 TDZ를 혼합처리한 재분화배지에서 100%에 가까운 재분화율을 보여, 기존에 보고된 재분화 효율보다 좋은 결과를 나타내었다.

Table 7. Effects of different combinations of BA and TDZ on plant regeneration (cv. Midngith)

No.	BA(mg/L)	TDZ(mg/L)	Shoot and green spot(%)
1	0	0	52.08 ± 9.55
2	0.1	0	56.25 ± 12.50
3	1	0	92.41 ± 9.81
4	0	0.1	89.06 ± 3.13
5	0.1	0.1	87.50 ± 8.84
6	1	0.1	56.25 ± 17.68
7	0	1	66.67± 9.55
8	0.1	1	66.67± 10.46
9	1	1	79.17± 14.88

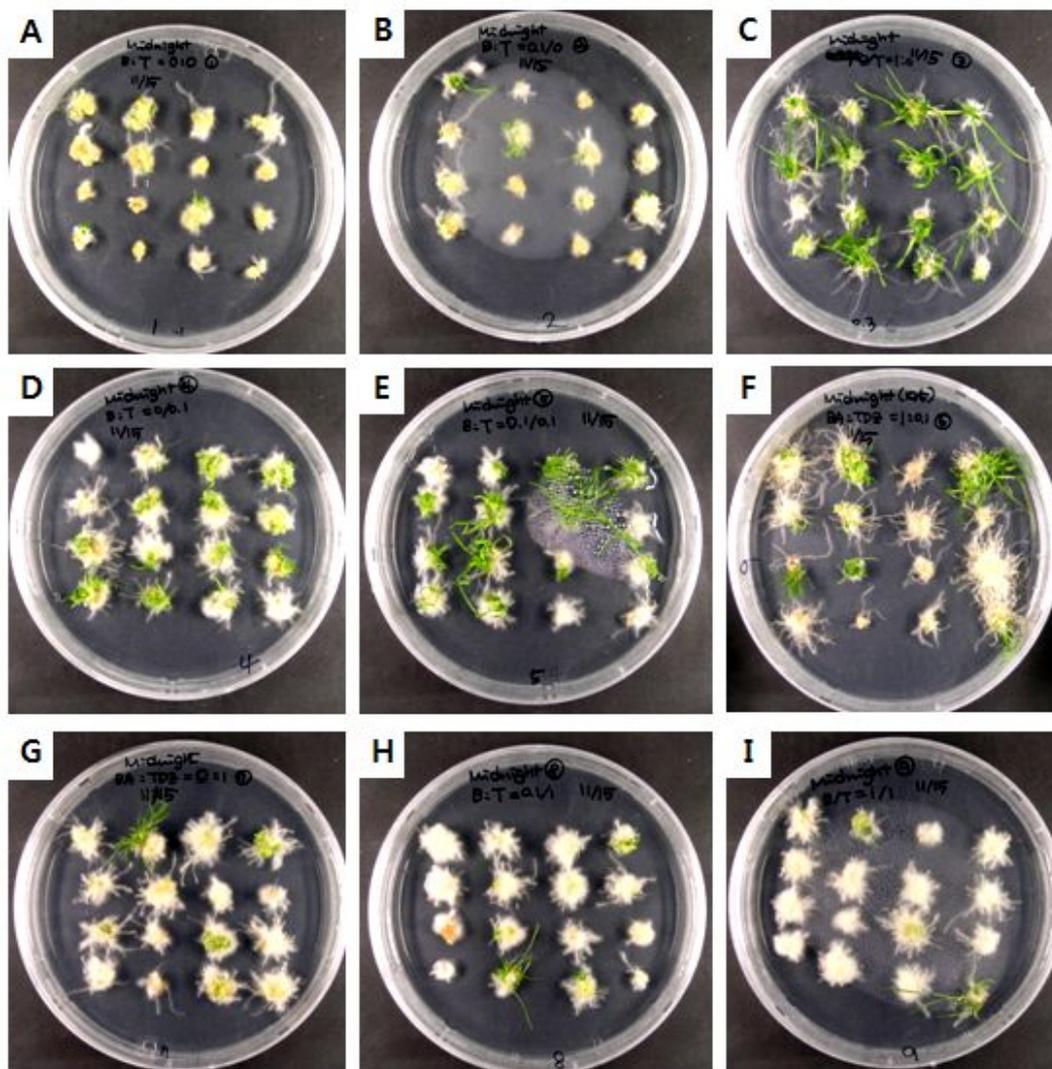


Figure 7. Effects of different concentrations of BA and TDZ on plant regeneration (cv. Midnight).

(A) 0mg/L BA, 0mg/L TDZ; (B) 0.1mg/L BA, 0mg/L TDZ; (C) 1mg/L BA, 0mg/L TDZ; (D) 0mg/L BA, 0.1mg/L TDZ; (E) 0.1mg/L BA, 0.1mg/L TDZ; (F) 1mg/L BA, 0.1mg/L TDZ; (G) 0mg/L BA, 1mg/L TDZ; (H) 0.1mg/L BA, 1mg/L TDZ; (I) 1mg/L BA, 1mg/L TDZ

8) Agarose 및 Gelrite 농도별 처리가 재분화 효율에 미치는 영향

Kentucky bluegrass의 재분화배지에 있어서 Agarose 및 Gelrite의 적정 농도를 조사하기 위해 3% maltose, 1mg/L BA, pH 5.8를 포함하는 MS배지에 0.7% Agarose와 0.2%, 0.3%, 0.5% Gelrite를 각각 처리한 배지에 callus를 치상하여 재분화율을 조사하였다. 그 결과 0.3% Gelrite가 포함된 배지에서 재분화율이 약 97%로 가장 높은 결과를 나타내었으며(Table 8), shoot의 성장속도는 0.2% Gelrite가 포함된 배지에서 다른 농도의 배지보다 빠른 경향을 보였다(Figure 8). 결과를 종합해 볼 때 0.2%~0.3%의 Gelrite 농도가 재분화배지에 적합한 것으로 생각된다.

Table 8. Effects of different concentrations of Agarose or Gelrite on plant regeneration (cv. Midnight)

No.	Agarose(%)	Gelrite(%)	Induced shoot frequency(%)
1	0.7	-	87.50±6.25
2	-	0.2	82.50±2.80
3	-	0.3	96.88±3.61
4	-	0.5	89.06±3.13

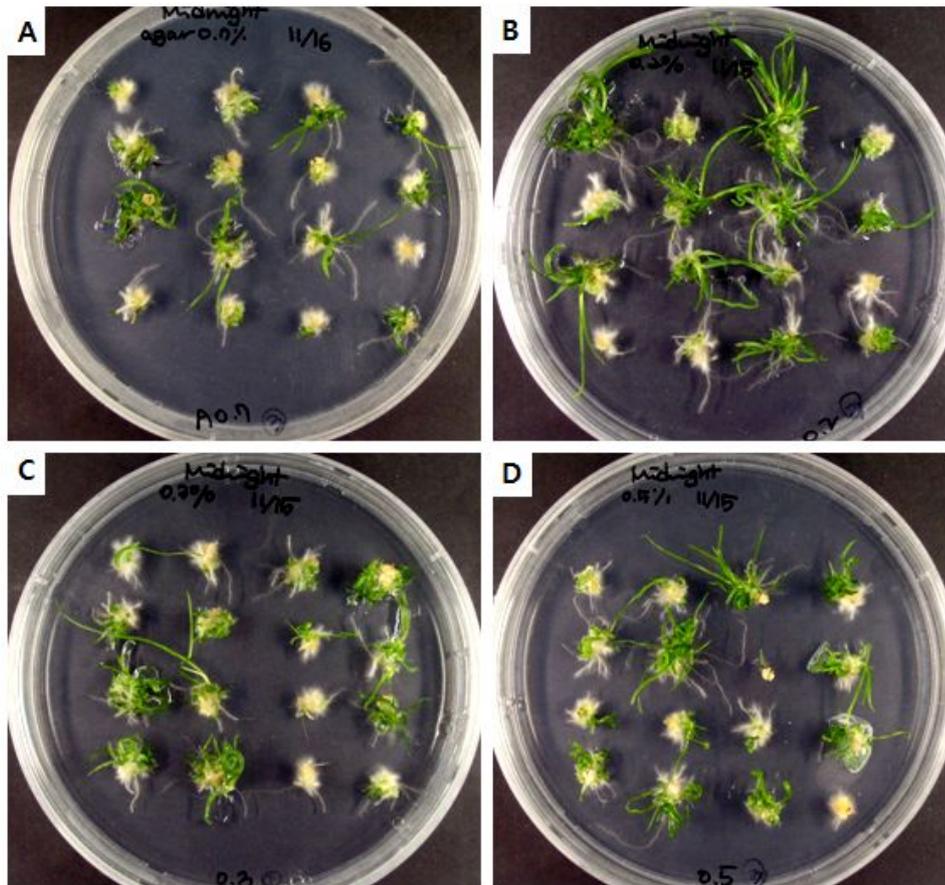


Figure 8. Effects of different concentrations of Agarose or Gelrite on plant regeneration (cv. Midnight).

(A) 0.7% Agarose, (B) 0.2% Gelrite, (C) 0.3% Gelrite, (D) 0.5% Gelrite

IV. 종합고찰

잔디는 크게 난지형잔디와 한지형잔디로 분류되어 있다(Ganesan et al., 2012). 대표적인 난지형 잔디인 들잔디(*Zoysia japonica* Steud.)는 내서성, 내병성, 내건성이 강해 한국을 비롯한 일본, 중국 등 아시아에서 이용률이 가장 높은 품종이나(Toyama et al., 2003), 연중 녹기를 유지하는 기간이 짧은 단점으로 인해 들잔디를 이용한 효율적인 녹화에 한계가 있어 녹기를 오래 유지하는 신품종 들잔디의 개발이 요구되고 있다. 들잔디의 품종 개발에는 우수품종 선발에 오랜 시간이 소요되는 전통적 육종법보다 유용유전자를 직접 도입하는 형질전환법을 이용하는 것이 신속한 품종개발에 효율적인 것으로 사료된다(Toyama et al., 2003, Ge et al., 2006).

현재까지 보고된 *Agrobacterium*을 이용한 들잔디의 형질전환은 *bar* 유전자를 도입한 제초제 저항성 들잔디(Toyama et al., 2003)를 시작으로 *hpt* 유전자를 도입한 hygromycin 저항성 들잔디(Ge et al., 2006)와 내충성 유전자 *cryIA(b)*를 도입한 품종(Zhang et al., 2007), *phyA* 유전자 도입에 의한 내음지성 들잔디(Ganesan et al., 2012) 등이 보고되었으나 그 수와 도입 유전자의 종류는 매우 한정적이어서, 다양한 유용유전자를 도입한 신품종의 지속적인 개발이 필요할 것으로 판단된다.

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환을 통해 들잔디에 도입한 *GSDL1*은 애기장대 유래의 AT-hook DNA binding family protein을 coding 하는 유전자이다. AT-hook motif는 동물, 효모의 성장과 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었으나(Lim et al., 2007), 식물에서의 기능을 규명하기 위한 연구 사례는 찾아보기 어렵다. AT-hook motif를 포함하는 애기장대 유전자들은 계통도에 따라 크게 두 그룹으로 나뉘며(Fujimoto et al., 2004), 이 두 그룹의 유전자들은 식물에서 각기 다른 기능을 할 것으로 추정되고 있다(Lim et al., 2007). *GSDL1* 유전자는 애기장대에서 잎의 노화지연에 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 *ORE7* 유전자(Lim et al., 2007)와 같은 계통에 속하는 유전자로 알려져 있다(Fujimoto et al., 2004, Matsushita et al., 2007).

본 연구에서는 노화지연 들잔디를 개발할 목적으로 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환을 통해 *GSDLI* 유전자를 도입한 형질전환 들잔디를 선발하였다. 선발한 *GSDLI*-형질전환 들잔디는 야생형보다 노화가 지연되는 특성을 보였으며, 건조스트레스에 대한 내성도 야생형보다 증가하는 결과를 나타내었다. 또한 *GSDLI* 유전자의 발현량이 높은 라인이 건조스트레스 저항성 및 노화지연의 특성이 좀 더 강하게 나타난 결과에서 발현량과 표현형질 사이에는 높은 상관관계가 있는 것으로 판단되었다. *GSDLI*-형질전환 식물은 *ORE7* 유전자가 도입된 애기장대(Lim et al., 2007)와 유사한 노화지연의 특성을 보였고, 선행연구된 *GSDLI* 유전자를 과발현한 애기장대와 같이 노화지연 및 건조 스트레스에 대한 내성이 증가한 형질을 나타내었다. 이들 결과는 들잔디에 도입된 *GSDLI* 유전자가 건조스트레스 및 노화지연의 특성 개선에 중요한 역할을 담당하고 있음을 시사한다. *GSDLI* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디는 야생형 들잔디보다 잎의 노화지연의 특성이 향상되었는데, 이는 식물형질전환 기술을 이용한 분자육종이 녹기를 유지하는 기간이 짧은 들잔디의 녹기연장에 유용하게 이용될 수 있음을 의미한다. *GSDLI* 유전자가 도입된 형질전환 들잔디는 노화지연의 특성 외에 건조에도 강한 내성을 보였는데, 이와 같은 유전자를 건조에 특히 약한 특성을 가진 kentucky bluegrass에 도입한다면 보다 경제적 가치가 높은 신품종 kentucky bluegrass의 개발이 가능할 것으로 생각되었다.

따라서 본 연구에서는 kentucky bluegrass의 분자육종을 통한 신품종 개발을 위해, 먼저 kentucky bluegrass의 효율적인 재분화 시스템을 확립하고자 하였다. 5품종의 성숙종자에서 유도한 callus를 사용하여 100%에 가까운 재분화율을 보이는 조직배양 체계를 확립하였고, 이용한 5품종 중 Midnight 품종이 가장 높은 재분화능을 가진 callus 유도율을 보여, 이 후의 분자육종 연구에 적합한 품종임을 확인하였다. 국내에서 이용되는 kentucky bluegrass 품종들의 품질을 평가한 보고서(이 등., 2004)에 따르면 몇 가지 품종들 중에서 Midnight 품종이 혼용 및 단용구에서 품질이 가장 우수한 것으로 평가되었다. 또한 Midnight 품종은 월드컵 경기장을 포함하여 국내에서 이용률이 가장 높은 품종이므로 본 연구에서 확립한 Midnight의 효율적인 재분화 체계는 활용가치가 클 것으로 기대된다.

현재 kentucky bluegrass cv. Midnight의 신품종 개발을 위하여 본 연구에서

확립한 재분화계를 토대로 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 조건을 검토하고 있다. Kentucky bluegrass는 apomixis로 번식하기 때문에 기존의 교잡을 통한 전통적인 육종보다 형질전환기술을 이용한 신품종 개발이 유리한 품종으로 생각되나, 지금까지 보고된 kentucky bluegrass의 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 연구(Chai et al., 2003, Zhang et al., 2010)는 매우 적은 편이다. Kentucky bluegrass의 형질전환에 관한 연구가 미미한 이유는 kentucky bluegrass의 재분화에는 callus type이 가장 중요한 요인으로 작용하는 것으로 보이나, callus의 선발 및 증식에 1년 이상의 오랜 시간이 소요되어 형질전환에 사용될 callus의 재분화능이 감소하는 것이 가장 큰 원인으로 예상되었다(Ha et al., 2001). Kentucky bluegrass의 효율적인 형질전환에는 재분화능이 높은 callus의 선발과 선발한 callus를 재분화능이 있는 상태로 유지, 증식하는 것이 관건으로 여겨진다. 본 연구에서 선발한 *GSDL1*-형질전환 들잔디는 잎의 노화 지연 뿐만 아니라 건조스트레스에 대한 저항성도 개선된 결과를 나타내었는데, 이를 kentucky bluegrass에 적용하여 *GSDL1*과 같은 건조스트레스에 저항성을 나타내는 유전자를 도입한다면 건조에 취약한 kentucky bluegrass의 단점이 보완될 수 있을 것으로 생각된다. Kentucky bluegrass는 품질이 우수하여 국내뿐만 아니라 해외에서도 이용률이 높은 품종으로 건조에 강한 신품종의 개발은 경제적인 가치가 상당히 클 것으로 예상된다. 본 연구에서 확립한 kentucky bluegrass의 재분화계는 상업적으로 이용가치가 높은 kentucky bluegrass 품종개발에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

식물조직배양 및 형질전환 기술을 이용한 잔디의 신품종개발은 과거보다 다양해진 잔디의 수요를 충족시킬 수 있을 것으로 생각되며, 품질이 향상된 품종의 이용은 효율적인 녹화로 개선된 환경을 제공할 수 있을 것이고 인간의 복지 증진에도 기여할 것으로 기대한다.

V. 참고문헌

- Abid G, Silue S, Muhovski Y, Jacquemin JM, Toussaint A, and Baudoin JP (2009) Role of *myo*-inositol phosphate synthase and sucrose synthase genes in plant seed development *Gene* 439:1-10
- Asano Y. (1989) Somatic embryogenesis and protoplast culture in Japanese lawngress (*Zoysia japonica*) *Plant Cell Rep.* 8:141-143
- Asano Y, Katsumoto H, Inokuma C, Kaneko S, Ito Y, and Fujiie A. (1996) Cytokinin and thiamine requirements and stimulative effects of riboflavin and α -ketoglutaric acid on embryogenic callus induction from the seeds of *Zoysia japonica* Steud. *J. Plant Physiol.* 149:413-417
- Cahudhuri A and Qu R (2000) Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type Bermuda grass: effect of 6-benzyladenine in callus induction medium *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60:113-120
- Chai BF, Liang AH, Wang W, and Hu W (2003) *Agrobacterium*-mediated transformation of kentucky bluegrass *Acta Botanica sinica* 45:966-973
- Chen H, Chen H, Nelson RS, Sherwood JL (1994) Enhanced recovery of transformants of *Agrobacterium tumefaciens* after freeze-thaw transformation and drug selection. *Biotechniques* 16:664-8, 670
- Cho MJ, Jiang W, and Lemaux PG (1998) Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism *Plant Science* 138:229-244
- Dong S and Qu R (2005) High efficiency transformation of tall fescue with *Agrobacterium tumefaciens* *Plant Science* 168:1453-1458
- Fujimoto S, Matsunaga S, Yonemura M, Uchiyama S, Azuma T and Fukui K (2004) Identification of a novel plant MAR DNA binding protein localized on chromosomal surfaces *Plant Molecular Biology* 56:225-239
- Ganesan M, Han YJ, Bae TW, Hwang OJ, Chandrasekkhar T, Shin AY, Goh CH, Nishiguchi S, Song IJ, Lee HY, Kim JI, and 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

Gao C, Jiang L, Folling M, Han L, and Nielsen KK (2006) Generation of large numbers of transgenic Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) plants following biolistic gene transfer *Plant Cell Rep.* 25:19-25

Ge Y, Norton T, Wang ZY (2006) Transgenic zoysiagrass(*Zoysia japonica*) plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation *Plant Cell Rep.* 25:792-798

Griffin JD and Dibble MS (1995) High-frequency plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) *Plant Cell Rep.* 14:721-724

Ha CD, Lemaux PG, and Cho MJ (2001) Stable transformation of a recalcitrant kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) cultivar using mature seed-derived highly regenerative tissue *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 37:6-11

Hiei Y, Komari T, and Kubo T (1997) Transformation rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens* *Plant molecular biology* 35:205-218

Hu HH, Dai M, Yao J, Xiao M, Li X, Zhang Q, and Xiong L (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC(NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice *PNAS* 103:12987-12992

Hu XR, Yang AF, Zhang KW, Wang J, and Zhang JR (2006) Optimization of in vitro multiple shoot clump induction and plantlet regeneration of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis*) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84:90-99

Jie EY, Kim SW, Jang HR, In DS, and Liu JR (2012) Myo-inositol increases the plating efficiency of protoplast derived from cotyledon of cabbage(*Brassica oleracea* var. *capitata*) *J Plant Biotechnol* 38:69-76

Khayri JM, Huang FH, Thompson LF, and King JW, (1989) Plant regeneration of zoysiagrass from embryo-derived callus *Crop Sci.* 29:1324-1325

Ke S and Lee CW (1996) Plant regeneration in Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) via coleoptile tissue cultures *Plant Cell Rep.* 15:882-887

Knight H, Brandt S, and Knight MR (1998) A history of stress alters drought calcium signalling pathways in Arabidopsis *The Plant Journal* 16:681-687

Lim PO, Kim YM, Breeze E, Koo JC, Woo HR, Ryu JS, Park DH, Beynon J, Tabrett A, Buchanan-Wollaston V, and 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

Matsushita A, Furumoto T, Ishida S, and Takahashi Y (2007) AGF1, an AT-Hook protein, is necessary for the negative feedback of *AtGA3ox1* encoding GA3-Oxidase *Plant Physiology* 143:1152-1162

Msikital W and Wilkinson HT (1994) Powdery mildew resistance in Kentucky bluegrass genotypes regenerated from excised seed pieces *Euphytica* 78:199-205

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

Sreeramanan S, Maziah M, Sariah S, and Xavier R (2010) *Agrobacterium*-mediated transformation of Banana cultivar 'Rastali' (*Musa*, AAB genome) with Chitinase gene *ISHS Acta Horticulturae* 879

Sun HJ, Kang HG, Bae TW, Cho TG, Kim JK, Lim PO, Riu KZ, and Lee HY (2010) Assessment of Phosphinothricin Acetyltransferase(PAT) degradation from transgenic zoysiagrass digested with Simulated Gastric Fluid(SGF) *J. Plant Biol.* 53:113-120

Toyama K, Bae CH, Kang GJ, Lim YP, Adachi T, Riu KZ, Song PS, and Lee HY (2003) Production of Herbicide-tolerant Zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated Transformation *Molecules and Cells* 16:19-27

Valk P, Ruis E, Tettelaar-Schrier AM, and Velde CM (1995) Optimizing plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass. The effect of benzyladenine *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 40:101-103

Valk P, Zaall MACM and Creemers-Molenaar J (1988) Regeneration of albino plantlets from suspension culture derived protoplasts of *Poa pratensis* L.(Kentucky bluegrass) *Euphytica* S 39:169-17

Valk P, Zaal MACM, and Creemers-Molenaar J (1989) Somatic embryogenesis and plant regeneration in inflorescence and seed derived callus cultures of *Poa pratensis* L. (Kentucky bluegrass) *Plant Cell Rep.* 7:644-647

Umezawa T, Yoshida R, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, and Shinozaki K (2004) SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana* *PNAS* 101:17306-17311

Ye GY, Yao HW, Shu QY, Cheng X, Hu C, Xia YW, Gao MW, and Altosaar I, (2003) High levels of stable resistance in transgenic rice with a cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to rice leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenee) under field conditions *Crop Prot.* 22:171-178

Zhang L, Wu D, Zhang Li, and 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

Zhang K, Wang J, Hu X, Yang A, and Zhang J (2010) *Agrobacterium*-mediated transformation of shoot apices of kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) and production of transgenic plants carrying a *betA* gene *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 102:135-143

Zhong H, Srinivasan C, and Sticklen MB (1991) Plant regeneration via somatic embryogenesis in creeping bentgrass(*Agrostis palustris* Huds) *Plant Cell Rep.* 10:453-456

이기원, 이상훈, 이동기, 우현숙, 김도현, 최명석, 원성혜, 서 성, 이병현 (2005) 켄터키 블루그래스에 있어서 켈러스 배양 및 식물체 재분화에 미치는 요인의 영향. 한국동물자원과학회지 47: page

이상훈, 이기원, 김도현, 이동기, 원성혜, 김기용, 이병현 (2006) 식물생장조절물질과 배지첨가물이 켄터키 블루그래스의 식물체 재분화에 미치는 영향. *J. Korean Grassl, Sci.* 26:69-76

이혜원, 정대영, 심상렬 (2004) 켄터키 블루그래스의 단용 및 페레니얼 라이그래스와 혼용에 따른 생육특성. *Kor. Turfgrass Sci.* 18:1-13

감사의 글

엄하시지만 아버지처럼 자상하시기도 하신 생애 처음 지도교수님으로 모실 수 있게 된 이효연 교수님, 교수님 덕분에 방황하던 삶에서 이제야 제 길을 찾은 것 같아 항상 감사한 마음 잊지 않고 있습니다. 아낌없이 베풀어주신 은혜 앞으로 살아가면서 두고두고 보답할 수 있는 제자가 되도록 노력하겠습니다.

선현진 박사님, 점점 자신 없어 하는 제게 항상 긍정적인 말씀 많이 해주시고 많은 힘이 되어 주셨는데 정작 저는 기대에 부응하지 못한 것 같아 늘 감사하면서도 죄송하고 면목 없습니다. 한결같이 온화하신 박사님께 지금도 많은 것을 배울 수 있는 것이 감사하고 영광스럽게 생각합니다.

그리고 항상 애정 어린 시선으로 조언을 아끼지 않으신 교수님들과 박사님들께도 감사의 말씀 올립니다.

뒤늦게 공부한다고 해도 두말없이 믿어주고 밀어준 사랑하는 가족들, 힘들어 할 때마다 달려와 주고 격려해 준 소중한 내 친구들, 연구소에서 함께 지내고 있는 선후배 모두에게 고맙다는 말 꼭 하고 싶습니다.

아직도 부족한 게 많지만 도움 주신 모든 분들께 감사의 마음 전합니다.