



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

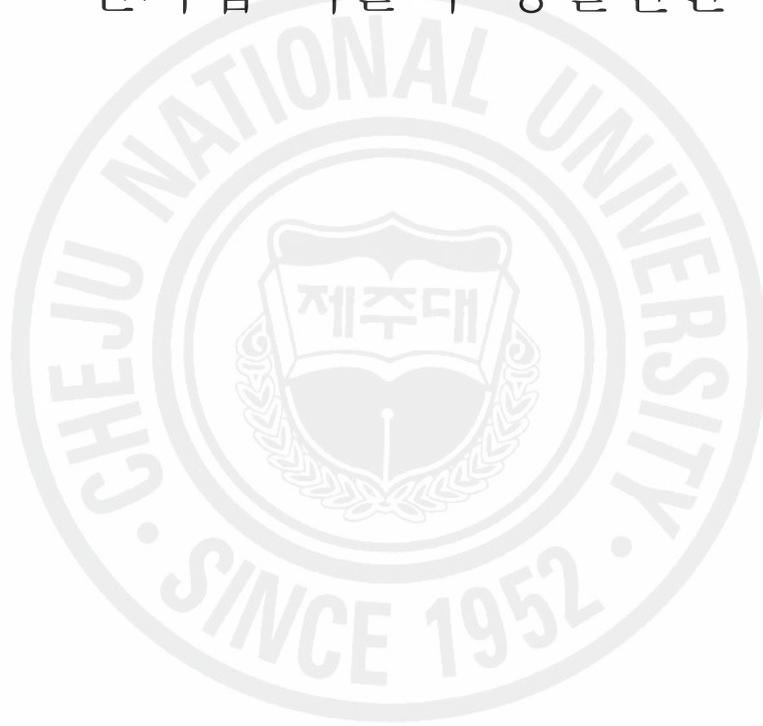
저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

Agrobacterium tumefaciens 를 이용한
단자엽 식물의 형질전환



濟州大學校 大學院

農化學科

西口智司

2007年 2月

Agrobacterium tumefaciens 를 이용한
단자엽 식물의 형질전환

指導教授 李 孝 淵

西 口 智 司

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

2007年 2月

西口智司의 農學 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

2007年 2月

목차

Abstract	1
I. 서론	3
II. <i>Agrobacterium</i> 을 이용한 벼의 <i>ABF3</i> 유전자 도입	5
재료 및 방법	5
결과 및 고찰	8
도표	10
III. <i>Agrobacterium</i> 을 이용한 벼의 human lactoferrin	
유전자 도입	15
재료 및 방법	15
결과 및 고찰	19
도표	21
IV. <i>Agrobacterium</i> 을 이용한 <i>Zoysia japonica</i> 의 음지 내성	
유전자 도입	28
재료 및 방법	28
결과 및 고찰	32
도표	35
V. 종합고찰	47
VI. 요약	49
VII. 참고문헌	50
감사의 글	57

Abstract

Agrobacterium-mediated transformation in monocotyledonous plants

Nishiguchi Satoshi

Department of Agricultural Chemistry

Graduate School

Cheju National University

Advisor : Prof. Lee Hyo Yeon

Monocotyledonous plants including many species are food and economically important crops. Recently many kinds of functional genes were transformed in various monocot plants through *Agrobacterium tumefaciens*. In the present study *ABF3* and human lactoferrin genes are transformed into rice (*Oryza sativa* L.) and oat phytochrome A gene is transformed into zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) through modified and improved method of *Agrobacterium*-mediated transformation.

ABF3 gene has the function against environmental stress. In this part over 30 transgenic plants are established. Among tested lines, all transgenic plant shows 3:1 segregation ratio in T₁ progenies. The transgenic plants showed higher tolerance than wild-type plants against cold stress.

Human lactoferrin (HLF) is antimicrobial compound of breast-fed infants. *HLF* gene is transformed using herbicide tolerance gene (*bar*) for plant selection marker. In this part over 40 transgenic plants are established and confirmed stable gene integration and herbicide tolerance. Transformed *HLF* gene is stably inherited to their progeny and that protein is expressed in progeny plants.

Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) takes much cost for weed control and mowing to manage beautiful grass field. For suppress shade-avoidance of the plants, oat phytochrome A mutant gene is transformed using herbicide tolerance gene (*bar*) for plant selection marker. Integration of gene and expression of protein in transgenic plants are confirmed through molecular

analysis. Oat phytochrome A mutant S598A gene transformed plant were shown higher suppressed elongation than wild-type plants.

Through this investigation, several functional genes are transformed at one time successfully using modified *Agrobacterium*-mediated transformation in two species of monocot plants.



I. 서론

단자엽 식물은 농업적으로 중요한 작물인 옥수수, 벼, 보리 등의 식용 작물과 Sorghum이나 라이그라스류 등의 사료작물, 골프장등에서 이용되고있는 잔디 등이 있다. 그 중에서도 벼는 중요한 식용 작물로서 세계각지에서 재배 이용되고있으며, 최근에는 분자 생물학 연구를 위한 모델 식물로서 많이 이용되고 있다.

*Agrobacterium*을 이용한 벼의 형질전환이 성공된 이후(Hiei et al. 1994) 많은 유용 유전자가 단자엽 식물에 도입되어 농업적으로 가치 있는 형질전환 식물체가 다수 개발되었다(Isida et al. 1996, Cheng et al. 1997, Tingay et al. 1997, Lee et al. 1998, Toyama et al. 2002). 특히 제초제 내성 옥수수(Byer Crop science. 1998), 해충 저항성 옥수수 (Syngenta seeds, Inc. 1996) 등은 산업적으로 널리 재배 이용되고 있다. 현재 재배되어 있는 제초제 내성, 해충 저항성 등의 형질전환 식물은 농업적으로 유의한 형질을 개량한 것으로 농약살포량을 감소시켜 생산비용 절감, 토양오염의 경감 수확량 증가, 등의 효과를 볼 수 있다(James, 2002). 이와 같이 과거에는 농작물의 생산 효율을 높이기 위한 방법으로 개발되었으나 최근에는 색, 향, 맛 및 저장성 등 소비자에게 유용한 형질을 가진 식물을 개발하는 방향으로 연구가 진행되고 있다 (Gandikota et al. 2001, Lewinsihn et al. 2001, Dandekar et al. 2004, Park et al. 2006). 또한 식물로부터 인간에게 필요한 유용 물질 및 약품을 대량 생산하는 기술도 형질전환 연구를 통해서 진행되고 있다(Huang et al. 2002).

본 연구는 단자엽 식물의 형질전환 식물체 개발이 중요한 시점에서 벼 및 들잔디의 형질전환을 시도하였다. 벼는 genome 해석이 완료되어(The rice full-length cDNA consortium. 2003) 모델 식물로서 단자엽 식물의 형질전환 연구에 널리 이용되고 있으나(Dong et al. 1996, Lee et al. 1998, Yara et al. 2001, Oh et al. 2004) 연구자에 따라서 형질전환 효율에 많은 차이가 있다. 본 연구는 기존의 형질전환 방법을 개선하여 *ABF3* 와 human lactoferrin 유전자를 벼에 형질전환하여 식물에서 정상적으로 기능하는지를 조사하였다. Abscisic acid responsive element binding factor 는 환경 스트레스 저항성을 나타내는 유전자로 다양한 식물체에서 *Arabidopsis* (Choi et al. 2000) 에서 클로닝된 *ABF3* 유전자는 담배(Kim et al. 2004a) 상추, *Agrostis mongolica* (Enkhchimeg et al. 2005 : 2006)에 도입되어 환경 스트레스 저항성을 나타내었다. 또한 Human lactoferrin (HLF)은 사람의 모유에 많이 포함되는 단백질로, 항균성이 있어서 면역력이 약한 유아를 병원균으로부터 지키는 기능이 있어(Lönnerdal B et al. 1995) 인간

genome에서 클로닝되어 담배(Mitra et al. 1994, Salmon et al. 1998), 감자 (Chong et al. 2000), indica 벼(Nandi et al. 2002) 등에 도입된 것이 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 japonica 벼에 유전자를 도입하여 human lactoferrin 단백질의 발현을 조사하였다.

들잔디의 경우에는 벼와 달리 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 연구가 많이 진행되어 있지 않으며, 그 효율도 매우 낮은 것으로 보고되어 있다(Toyama et al, 2003). 따라서, 벼에서 검토된 형질전환 기술을 개량하여 들잔디의 형질전환 효율을 개선하였으며 도입된 외부 유전자가 들잔디의 식물 내에서 정상적으로 발현하는지를 조사하였다. 들잔디에 도입된 oat phytochrome A mutant 유전자는 귀리에서 클로닝된 광시그널 전달 유전자를 일부 개량하여 만든 것으로 식물의 웃자람을 억제하는 특징을 가지고 있다(Kim et al, 2004b). 잔디를 밀식하면 음지 회피성에 의하여 웃자라게 되어 잔디깎기의 횟수가 늘어나며 시비량이 증가하게 되어 병해도 발생한다. 따라서 들잔디에 음지회피성을 억제 하기 위해서 oat phytochrome A mutant 유전자를 도입하고 그 유전자의 기능이 잔디에서 발현되는지를 조사하였다.

또한 지금까지 단자엽 식물의 형질전환은 한 가지 형질에 초점을 맞춰 진행하여 왔지만 앞으로는 두 가지 이상의 형질을 복합적으로 개량한 품종의 개발이 요구된다. 따라서 본 연구는 비선택성 제초제 저항성 유전자인 bialaphos 저항성 유전자(*bar*)를 선발 marker로 사용하여 기능성 유전자의 발현에 의한 상품성 향상과 더불어 농업적으로 유용한 형질을 가지는 형질전환 식물을 개발하는 것을 목적으로 한다.

II. *Agrobacterium* 을 이용한 벼의 *ABF3* 유전자 도입

건조나 저온 등의 환경 스트레스는 작물에 있어서 생산량을 감소시키는 가장 큰 요인 중 하나로 한국이나 일본, 중국의 고위도 지역에서는 저온에 의해 벼의 생육이 억제된다. 건조나 저온, 고온, 삼투압 변화 등의 환경 스트레스 조건 하에서는 식물호르몬인 abscisic acid (ABA)의 농도가 증가하여 여러 가지 환경 적응에 반응한다고 알려져 있다(Zeevaart and Creelam 1988, Leung and Giraudat 1998). 환경 적응 반응에 관여하는 ABA-responsive gene의 발현은 transcription factor 에 의해 조절되며, 그 중 하나인 ABF3(ABA-responsive element binding factor 3) 유전자가 over-expression 될 경우 건조, 저온, 고온에 대한 저항성이 증가하는 것으로 알려져 왔다(Kang et al. 2002, Kim et al. 2004a).

본 연구에서는 환경 스트레스에 저항성을 가진 벼를 개발하기 위하여 ABF3 유전자를 벼에 도입하고, 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

식물 재료 및 callus 유도

본 실험에 사용된 벼(*Oryza sativa* L.)는 한국 남부지방에서 일반적으로 재배되고 있는 동진 품종을 이용하였다. 종피를 제거한 완숙 종자를 70% ethanol로 1분간 교반한 후, Tween 20이 200 μ l/L 첨가된 4% sodium hypochlorite 용액에 넣어 15분간 교반하여 표면 살균을 하였다. 표면 살균한 종자를 멸균수로 세척하여 N6 callus induction 배지(Table 1-1)에 치상하였다. 치상한 종자를 25 $^{\circ}$ C, 연속 광조건으로 5일 및 7일 간 배양한 후 배유 및 자엽을 포함하는 유도 초기 callus와, 3주간 배양한 종자에서 유도된 callus를 실험 재료로 사용하여 각각 형질전환율을 비교하였다.

Vector 및 *Agrobacterium* 배양

ABF3 유전자 도입에 사용한 vector는 binary vector인 pCUM-*ubi*:*ABF3*로 T-DNA 내부에 옥수수 polyubiquitine promoter와 *ABF3* 유전자가 삽입되어 있다. 그 외에 선발 marker로서 hygromycin phosphotransferase (*HygR*) 유전자 및 green fluorescence protein (*gfp*) 유전자, β -glucuronidase (*gus*) 유전자가 포함 되어 있다(Fig.1-1). pCUM-*ubi*:*ABF3*가 도입되어 있는 *Agrobacterium*

tumefaciens EHA105를 kanamycin (100mg/ml)와 rifampicin(50mg/ml)이 첨가되어 있는 LB 배지에서 28℃, 20시간 동안 배양하였다.

***Agrobacterium* 감염**

Kanamycin(100mg/ml)과 rifampicin(50mg/ml)이 첨가되어 있는 5ml의 LB 배지에서 자란 *Agrobacterium*을 원심하여 균을 침전시켰다. LB 배지를 제거한 후 30 mg/L의 acetosyringone(3,5-dimethoxy-4-hydroxy-acetophenon, Aldrich)이 포함되어 있는 10ml의 N6 RSP(Table. 1-1) 배지에 종자에서 유도된 callus를 약 1분 간 *Agrobacterium*의 현탁액에 침적하여 감염시켰다. 접종된 callus는 멸균된 여과지로 여분의 수분을 제거한 후 N6 co-culture 배지에 치상하여 10일 간 25℃의 광조건에서 *Agrobacterium*과 공동 배양하였다.

***Agrobacterium* 제거**

10일 간 공동 배양한 callus로부터 *Agrobacterium*을 제거하기 위해서 callus를 멸균수로 세정한 후 carbenicillin 500mg/L가 첨가된 멸균수로 재세정하여 filter paper로 여분의 수분을 제거하였다. 수분을 제거한 callus 및 종자는 carbenicillin 250mg/L가 첨가된 N6AE 배지(Table 1-1)에 치상하여 25℃의 24시간 광조건에서 1주 간 배양하였다.

Shoot 유도 및 형질전환 식물체의 선발

형질전환 식물체를 재분화 시키기 위해서 50mg/L의 hygromycin이 첨가된 shoot 유도 배지에 *Agrobacterium*이 제거된 callus를 치상하고 25℃, 24시간 광조건에서 3-4주 간 배양하였다. 자엽이나 배유와 함께 co-culture를 한 callus는 이 단계에서 자엽 및 배유를 제거하여 callus만을 shoot 유도 배지에 치상하였다. Callus로부터 유도된 shoot를 50mg/L의 hygromycin이 첨가된 root 유도 배지에 치상하고 1~2개월 동안 배양하였다. 정상적인 shoot와 root가 유도된 식물체를 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

Genomic DNA의 추출

본 실험에서 사용된 모든 DNA 추출은 Liu(1995) 방법에 따라 행하였다. 200-300 mg의 잎을 액체 질소로 동결 분쇄해 800µl의 추출 buffer(0.3M NaCl, 0.5M Tris-HCl: pH7. 5, 20mM EDTA: pH8. 0, 0.5% SDS, 5M Urea, 5% phenol)에 넣어 잘 혼합한 후 추출 buffer와 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol

(25:24:1)을 첨가해 약 20초간 교반하였다. 원심분리(실온, 12000rpm, 5 min)하여 상층액을 추출한 후 2배량의 99% ethanol를 넣어 혼합했다. 석출된 DNA를 유리봉으로 꺼내 70% ethanol로 세정하고 원심분리(실온, 12000rpm, 5 min)하여 침전시킨 후 건조시켰다. DNA의 pellet은 0.01 mg/ml의 RNase를 포함한 20 μ l의 1 \times TEbuffer에 용해하였다.

형질전환 식물의 PCR 분석

PCR 분석(polymerase chain reaction analysis, Mullis and Faloona, 1987)은 *hygR* 특이 primer인 (5' -AGA-ACC-TCA-ACC- GGT-GGA-GAG-TG-3') (5' -GGA-GTC-AGA-TCA-GGT-GAC-ATC-TGG-3')를 사용하였다. PCR은 94 $^{\circ}$ C 4분 간 pre-denaturation한 후 denaturation 94 $^{\circ}$ C 30초, annealing 55 $^{\circ}$ C 45초, extension 72 $^{\circ}$ C에서 30초 간 35 cycle 수행하였다. post elongation은 72 $^{\circ}$ C에서 7분 간 반응시켰다. *ABF3* 특이 primer는 (5' -AGA-ACC-TCA-ACC-GGT-GGA-GAG-TG-3') (5' -GGA-GTC-AGA-TCA-GGT-GAC-ATC-TGG-3')를 사용하였다. PCR은 94 $^{\circ}$ C 4분 간 pre-denaturation 후 denaturation 94 $^{\circ}$ C 45초, annealing 56 $^{\circ}$ C 50초, extension 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초 동안 35 cycle 수행하였다. 그 후 post elongation은 72 $^{\circ}$ C에서 7분 반응시켰다. PCR 산물은 0.8% Agarose gel 에서 전기 영동하여 밴드를 확인하였다.

Southern blot 분석

Genomic DNA 를 *BamH I* 으로 처리 하여 0.8% agarose gel에 전기영동한 후 nylon membrane에 전사시켰다. Hybridization은 Southern(1975) 방법에 따라 실험을 수행하였다. PCR로 증폭시킨 *ABF3* probe DNA를 [α -32P]dCTP로 표지한 후 X-ray film에 24시간 동안 노출하였다

T₁세대의 유전 분석

ABF3 형질전환 T₀세대의 식물체를 GMO 격리포장에서 재배한 후 외형적으로 정상적인 종자를 수확할 수 있었던 5계통의 식물체를 이용하여 T₁세대의 분석을 하였다. 수확한 각 계통의 종자의 종피를 제거해 멸균한 후 50mg/L hygromycin 이 함유되어 있는 1/2MS 배지에 종자를 치상하였다. 2주 후 hygromycin에 대한 감수성을 나타내는 개체수와 저항성 개체수를 측정해 분리비를 χ^2 검정을 이용하여 분석하였다.

스트레스 저항성 검증 실험

ABF3 유전자가 도입된 형질전환 식물과 야생형의 동진 벼의 종자를 1/2 MS 배지에 파종하여 25℃, 광조건에서 10일 간 배양하였다. 유묘는 토양에서 순화하여 실험재료로 사용하였다. 저온 스트레스 저항성 실험은 -4℃, 습도 50%의 조건에서 6시간 재배한 후, 5일 동안 온실에서 식물체가 정상적으로 회복되는지 관찰했다.

결과 및 고찰

사용한 조직에 따른 형질전환율

Callus 및 종자를 *Agrobacterium tumefaciens*로 감염시킨 후 50mg/L hygromycin을 포함한 배지에 치상하여 약 1개월 간 배양하고 shoot를 유도하였다(Fig1-1C). 유도된 shoot를 50mg/L hygromycin이 포함된 MS root 유도 배지에 치상한 결과, 야생형 식물인 경우 갈변하여 고사했지만 형질전환 식물체의 경우 뿌리가 유도되는 것이 확인되었다. 그 결과 callus에 감염시키는 방법보다 종자에 감염시킬 경우, 형질전환율이 거의 동일하거나 약간 높게 나타났다(Table 1-2). Callus를 유도하는 데는 3주가 걸리지만, 종자에 감염시킬 경우에는 5~7일간의 배양으로 *Agrobacterium* 감염이 가능하기 때문에 시간을 단축할 수 있다.

형질전환 식물에 도입된 유전자의 검증

Hygromycin에 저항성을 가지는 형질전환 식물체와 야생형 식물체의엽육 조직 DNA를 *hygR* primer를 이용하여 PCR 분석한 결과, 야생형 식물체에서는 band가 검출되지 않았지만 형질전환 식물체에서는 약 1kbp의 위치에 band가 검출되었다(Fig.1-3). *ABF3* primer를 이용하여 PCR 분석을 한 결과, 야생형 식물체로부터는 band가 검출되지 않았지만 형질전환 식물체로부터는 약 480bp의 위치에 band가 검출되었다(Fig.1-4). 이러한 결과는 형질전환 벼의 염색체 DNA 내에 hygromycin 저항성 유전자와 *ABF3* 유전자가 삽입된 것을 증명하고 있다.

또한 genomic DNA를 *Bam*H1로 처리하고 *ABF3* probe를 이용하여 southern blot 분석을 실시한 결과는 Fig1-5와 같다. C의 야생형 식물체에서는 band가 검출되지 않았지만 lane1-4의 모든 형질전환 식물체에서는 band가 검출되었다.

T₁세대의 유전자 분석

형질전환 식물체의 T₁세대 유전자 분리비를 분석한 결과, 모든 계통에서 3 : 1의 분리비가 나타났다(Table 1-3). Particle bombardment 등의 형질전환법을 이용했을 경우 외래 유전자가 염색체 DNA에 정상적으로 삽입되지 않거나, 유전자가 중복되어 식물 염색체 DNA 내에 삽입되는 경우가 있어 후대로의 유전이 mendelism과 일치하지 않는 경우도 있다(Dalton et al. 1995, Altpeter et al. 2005). 그러나 *Agrobacterium*을 사용한 형질전환은 중복되어 삽입되는 유전자 수가 적고, 염색체 DNA에 정상적으로 삽입되는 장점이 있다(Gustavo et al. 1998). 본 연구에서는 유전자가 중복되어 삽입된 개체는 확인되지 않아, mendelism에 따라서 외래 유전자가 유전되는 것이 확인되었다.

스트레스 저항성 검증 실험

저온 스트레스 실험을 한 결과 야생형 식물은 저온 스트레스를 받아 고사하거나 성장이 억제되었지만, 형질전환 식물체는 정상적으로 성장하는 것이 확인되었다(Fig. 1-5). 벼는 저온에 약한 식물이므로 특히 한냉지에서 재배할 때 유묘가 냉해를 받아 큰 피해를 입는다. 그러나 본 연구의 *ABF3* 유전자가 도입된 형질전환 벼는 -4°C 에서도 식물 조직이 동해를 많이 받지 않고, 동시에 야생형벼에 비해서 회복도 빠른 것으로 확인되었다. 지금까지 *ABF3* 유전자의 도입은 *Arabidopsis* (Kang et al. 2002), 상추(Enkhchimeg et al. 2005) 담배(Kim et al. 2004a) 담배(Kim et al. 2004a) 상추, *Agrostis mongolica* (Enkhchimeg et al. 2006) 등에 도입되어 환경 스트레스에 대해 저항성을 갖는다고 보고되었다. 따라서 이러한 벼 품종의 개발은 벼의 유묘기에 냉해 피해를 어느 정도 극복할 수 있는 가능성을 보여준 것이라 생각된다.

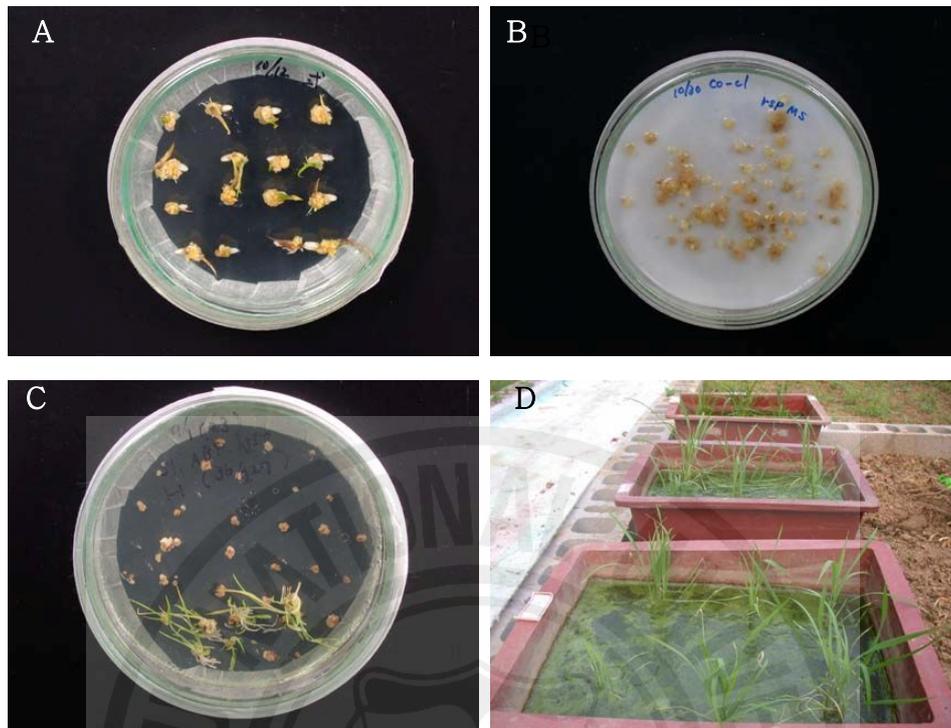


Fig.1-1. Production of transgenic rice (cv. Dong Jin)

- (A) Callus induction from mature seeds (B) Co-cultivation callus with *Agrobacterium*.
 (C) Shoot regenerated from transformed calli on medium containing hygromycin
 (D) Transgenic plant growing in green house

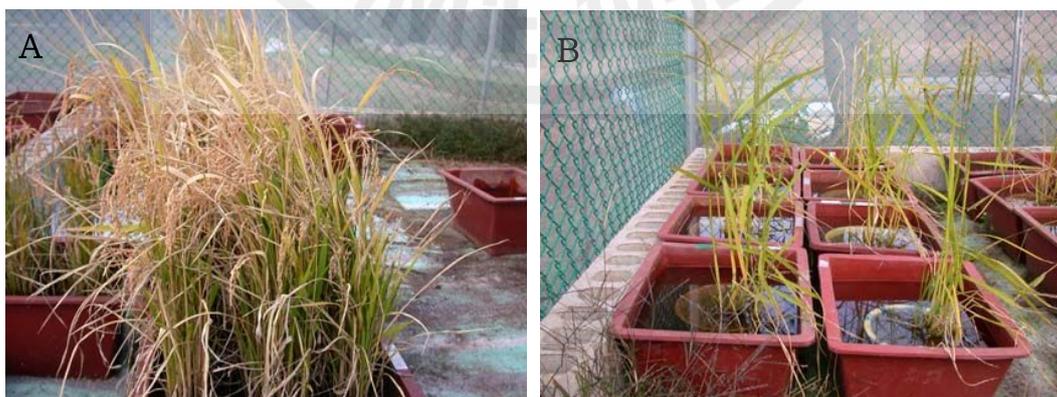


Fig.1-2. Transgenic T₀ and T₁ plant in pot

- (A) Transgenic T₀ plant (B) Transgenic T₁ hygromycin resistant plant.

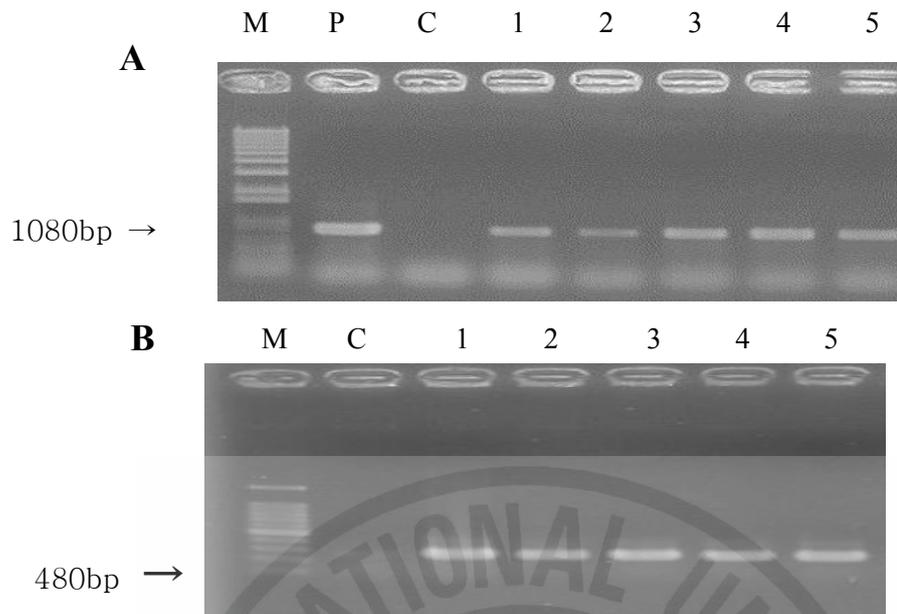


Fig.1-3. PCR analysis using *hygR* gene specific primer (A) and *ABF3* gene specific primer (B) for transgenic of pCUM-*ubq::ABF3*

M: marker ladder, P: plasmid DNA, C: DNA from non-transgenic plants, Lane 1~5: transgenic plants



Fig.1-4. Southern blot analysis of *ABF3* transgenic rice.

C: Control 1~5: Transgenic plants. Genomic DNA digested by *Bam*HI and hybridized with *bar* probe.

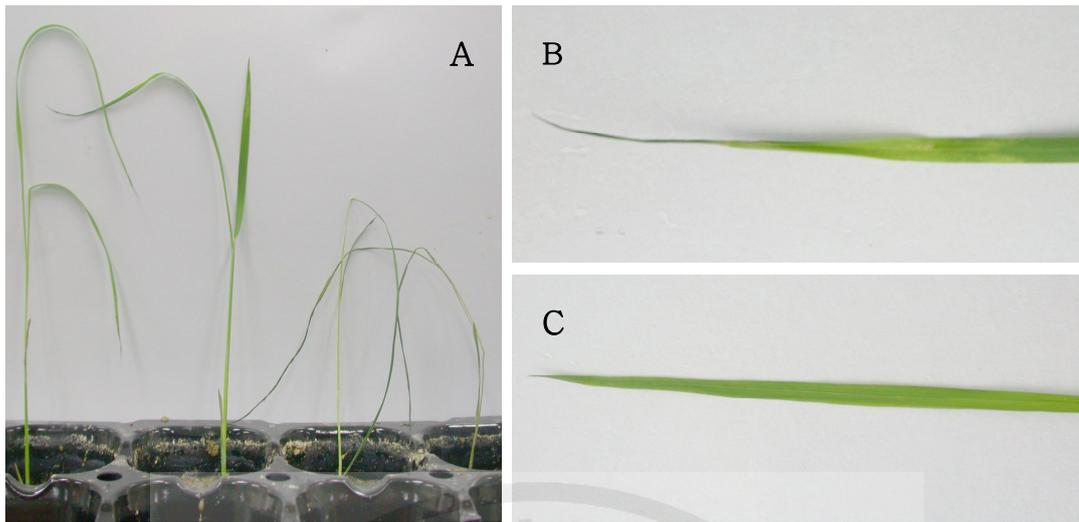


Fig. 1-5. Cold stress test in transgenic and wild- type rice plants

(A) Wild type plants (left) and transgenic plants (right) after 5days in green house.

(B) Leaf of wild-type plant with frost injury **(C)** Leaf of transgenic recovered from frost injury

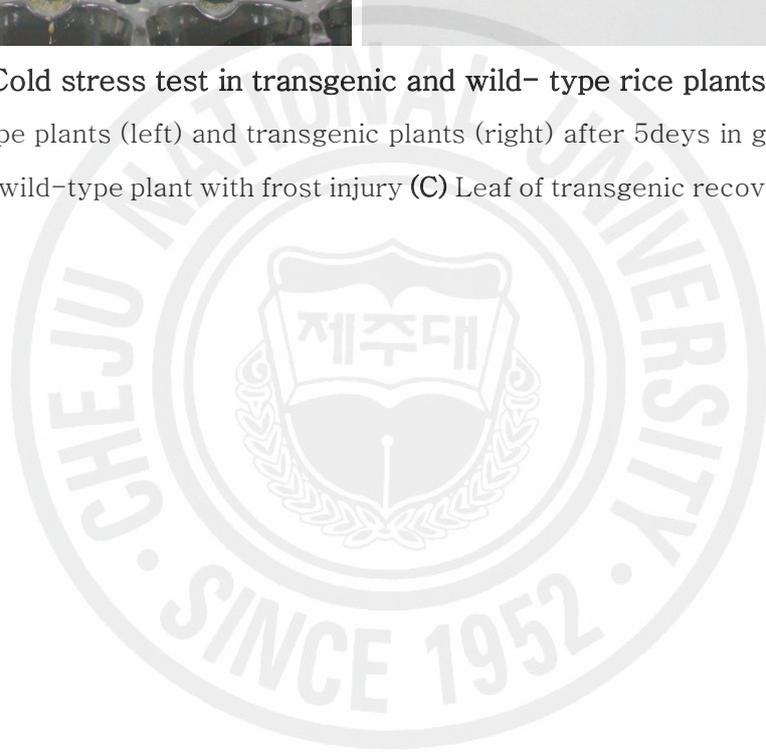


Table 1-1. Media used for tissue culture and transformation of rice (*Oryza sativa* L.)

Medium	Composition
Callus Induction (N6CI)	N6 salts & vitamins, 2mg/L 2,4-D , 100mg/L <i>myo</i> -inositol, 30g/l sucrose , pH 5.8 , gelrite 3g/l
<i>Agrobacterium</i> culture (LB)	10g/l Tryptone, 5g/l Yeast extract, 5g/l NaCl, 1g/l
Co-culture (co-cl)	N6 salts & vitamins (Ca-free), 2mg/L 2,4-D , 30g/l sucrose, 10g/l glucose, 120mg/L betaine, 50mg/L CaCl ₂ ·2H ₂ O , pH 5.2 , 3g/l gelrite , 30mg/L acetosyringone
Callus growth & <i>Agrobacterium</i> elimination (N6AE)	N6 salts & vitamins, 2mg/L 2,4-D, 100mg/L <i>myo</i> -inositol, 30g/l sucrose , pH 5.8, gelrite 3g/l, 250mg/L carbencillin
Selection & shoot induction (MSSI)	MS salts & vitamins, 0.5mg/L NAA, 2mg/L BA, 15g/l sucrose, 30g/l sorbitol, 4g/l casamino acid, 0.5g/l L-proline, pH 5.8, 3g/l gelrite, 250mg/L carbencillin, 50mg/L hygromycin
Root induction (MSRI)	MS salts & vitamine, 30g/l sucrose, 100mg/L <i>myo</i> -inositol, pH 5.8, 8g/l agar, 250mg/L carbencillin, 50mg/L hygromycin

2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; BA, 6-benzyladenine;
NAA, α-naphthaleneacetic acid

Table 1-2. Effect of transformation using callus with seed for co-culture

Tissue used on experiment	Seed No. used for inoculation	Produced transgenic plants
callus ^a	16	16
5days ^b	10	16
7days ^c	10	16

^a 3 weeks old callus without seed and shoot

^b 5 days old callus attached onto seed

^c 7 days old callus attached onto seed

Table. 1-3 Segregation of hygromycin resistance in T₁ progeny

Plant line	Resistant progeny	Expected ratio	χ^2 -value ^a	P-value
Line 1	15.2±0.2	3:1	0.002	0.99
Line 2	14.6±0.77	3:1	0.143	0.72
Line 3	14.3±0.82	3:1	0.029	0.89
Line4	13.9±0.71	3:1	0.212	0.64
Line 5	13.4±0.85	3:1	0.018	0.88

^a χ^2 -values indicate significant fit if the expected ratio

Each value represent mean ±S.E. of three replications.

II. *Agrobacterium* 을 이용한 벼의 human lactoferrin 유전자 도입

Lactoferrin은 transferrin계의 iron-binding glycoprotein의 일종이며 특히 사람의 모유에 고농도로 존재하는 human lactoferrin(HLF)은 유아의 면역력을 증진시키고 철분의 흡수를 조정하거나 세포의 성장을 촉진하는 작용을 한다. 최근 유전공학적 방법을 이용하여 인간의 단백질인 HLF를 식물세포나 동물세포와 같은 곳에 발현시키는 연구가 많이 행해져 왔다. baculovirus system을 이용하거나(Salmon et al 1997) *Aspergillus oryzae*로 발현시킨 연구도 있다(Ward et al 1992). 그러나 *Aspergillus* 로부터 추출한 단백질은 고도로 정제하는 것이 필요하고 독성 검사도 필요하기 때문에 실용성이 높지 않다(Lönnerdal 1996). 쌍자엽 식물인 담배나 감자에서는 HLF의 발현량이 0.1%로 매우 낮았다(Mitra et al 1994, Chong et al 2000). Indica 벼와 같은 단자엽 식물의 경우 particle bombardment와 배유 특이적 발현 promoter를 이용하여 HLF 단백질을 발현시킨 결과 0.5%로 발현량이 높았다고 보고되어 있다(Nandi et al. 2002).

그러므로 본 연구에서는 *Agrobacterium*법을 이용하여 동아시아에서 널리 재배되고 있는 japonica 벼에 HLF 유전자를 도입하여 HLF 단백질의 발현을 분석하였다

재료 및 방법

식물 재료 및 callus 유도

본 실험에 사용된 벼(*Oryza sativa* L.)는 한국 남부지방에서 일반적으로 재배되고 있는 동진 품종을 이용하였다. 완숙 종자의 종피를 제거하여 70% ethanol로 1분 간 교반한 후 Tween 20 200 μ l/L가 첨가된 4% sodium hypochlorite 용액에 15분 간 교반하여 표면 살균을 하였다. 표면 살균한 종자를 멸균수로 세척하고 N6 callus induction 배지(Table 2-1)에 종자를 치상 한 후 25 $^{\circ}$ C, 연속 광조건에서 3주 간 배양하여 callus를 유도하였다. 종자의 자엽 부분을 핀셋으로 제거하고 callus 부분만을 채취하고 이중 갈변된 callus를 제거한 후 실험 재료로 이용하였다.

Vector 및 *Agrobacterium* 배양

Human lactoferrin cDNA 유전자 도입에 사용한 vector는 binary vector인

pCUM-VE9 TFT β 를 사용하였다. T-DNA 내부에 옥수수 polyubiquitine promoter, human lactoferrin(*HLF*) 유전자, *HLF* 유전자의 전후에는 HIV transduction domain(*tat*)가 삽입되어 있다. 그 외에 선발 marker로서 제초제 저항성 유전자인 phosphinothricin acetyl transferase(*bar*) 유전자 및 green fluorescence protein (*gfp*) 유전자가 함유되어 있다(Fig.2-1). 이 VE9-TFT β 가 도입되어 있는 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105를 항생제 kanamycin (100mg/ml)과 rifampicin(50mg/ml)이 첨가되어 있는 LB 배지에서 28 $^{\circ}$ C에서 20시간 동안 배양한 후 그 이상 계대 배양 하지 않고 60% glycerol 용액과 1:1으로 혼합하여 -80 $^{\circ}$ C에 보존하였다.

***Agrobacterium tumefaciens* 감염**

시험관에 kanamycin(100mg/ml)과 rifampicin(50mg/ml)이 첨가되어 있는 LB 배지 5ml를 넣고 배양한 후 원심하여 균을 침전시켰다. LB 배지를 제거한 후 30 mg/L의 acetosyringone(3,5-dimethoxy-4-hydroxy-acetophenon, Aldrich)이 포함되어 있는 10ml N6RSP 배지에 균을 재현탁하였다. 감염시킨 callus를 약 1분 간 *Agrobacterium*의 현탁액에 침적시켰다. 접종된 callus는 멸균된 여과지로 여분의 수분을 제거하였다. N6 co-culture 배지에 여과지를 한 장 깔고 그 위에 callus를 치상 하여 10일 간 25 $^{\circ}$ C의 광조건으로 *Agrobacterium*과 공동 배양하였다.

***Agrobacterium* 제거**

10일 간 공동 배양한 callus로부터 *Agrobacterium*을 제거하기 위해서 callus를 멸균수로 3회 이상 세척한 후 carbenicillin 500mg/L을 첨가하여 세척하였다. Callus는 멸균된 filter paper로 여분의 수분을 제거한 후 carbenicillin 250 mg/L가 첨가된 N6AE 배지(Table 2-1)에 치상하여 1주 간 25 $^{\circ}$ C의 광조건으로 배양하였다.

Shoot 유도 배지에 있어서의 bialaphos 농도의 검토

Agrobacterium 을 감염시킨 callus를 bialaphos가 첨가된 shoot 유도 배지에서 선발하기 위해서 야생형 벼 callus의 bialaphos 감수성을 조사하였다. 0, 1, 2.5, 5mg/L bialaphos가 첨가되어 있는 배지에 벼의 callus를 치상하여 3주 간 배양한 후 callus에 나타난 shoot 수를 조사하였다.

Shoot 유도 및 형질전환 식물체의 선발

Callus로부터 형질전환 식물체를 재분화 시키기 위해서 2.5 mg/L의 bialaphos가 첨가된 shoot 유도 배지에 *Agrobacterium*이 제거된 callus를 치상하고 25°C, 24시간 광조건에서 3~4주 간 배양하였다. Callus로부터 유도된 shoot를 5mg/L의 bialaphos가 첨가된 root 유도 배지에 치상하고 1~2개월 동안 배양하였다. 정상적인 shoot와 root가 유도된 식물체를 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

형질전환 식물체의 제초제 저항성 검증

토양에서 정상적으로 성장한 형질전환 식물체 및 야생형 식물체를 실험 재료로 이용하였다. 충분히 신장한 잎에 5g/L 제초제(herbiace 유효성분 20% 메이지 제과, 일본)를 살포하였다. 그 후 온실에서 자연광 조건에서 재배하였다.

Genomic DNA의 추출

본 실험에서 사용된 모든 DNA 추출은 Liu(1995) 방법에 따라 행하였다. 200-300 mg의 잎을 액체 질소로 동결 분쇄해 800µl의 추출 buffer(0.3M NaCl, 0.5M Tris-HCl: pH7.5, 20mM EDTA: pH8.0, 0.5% SDS, 5M Urea, 5% phenol)에 넣어 잘 혼합한 후 추출 buffer와 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1)을 첨가해 약 20초간 교반하였다. 원심분리(실온, 12000rpm, 5 min)하여 상층액을 추출한 후 2 배량의 99% ethanol을 넣어 혼합했다. 석출된 DNA를 유리봉으로 꺼내 70% ethanol로 세정하고 원심분리(실온, 12000rpm, 5 min)하여 침전시킨 후 건조시켰다. DNA의 pellet는 0.01 mg/ml의 RNase를 포함한 20µl의 1×TEbuffer에 용해하였다.

형질전환 식물의 PCR 분석

PCR 분석(polymerase chain reaction analysis, Mullis and Faloona, 1987)은 *bar* 특이 primer는 forward sequence (5`-GGT-CTG-CAC-CAT-CGT-CAA-CC-3`) 및 reverse sequence (5`-ATC-TCG-GTG-ACG-GGC-ACC-A-3`)를 사용하였다. PCR은 4분 간 pre-denaturation 후 94°C 30초 denaturation, 60°C 45초 annealing, 72°C에서 30초 간 extension 을 해 35cycle 하였다. post elongation은 72°C에서 7분 간 반응시켰다. *HLF* 특이 primer는 forward sequence (5`-AGG-TCG-ACA-TGA-AAC-TTG-TCT-TCC-TC-3`) 및 reverse sequence (5`-AGG-TCG-ACC-TTC-CTG-AGG-AAT-TCA-CA-3`)

를 사용하였다. PCR은 4분 간 pre-denaturation 후 94℃ 45초, 56℃ 50초, 72℃에서 1분 30초동안 35cycle 하였다. 그 후 post elongation는 72℃에서 7분 반응시켰다. 이 PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 전기 영동 하여 밴드를 확인하였다.

Southern blot 분석

Genomic DNA을 *Bam*HI 으로 처리하고 전기 영동을 이용하여 0.8% agarose gel에 분획한 후 nylon membrane에 전사시켰다. Hybridization는 Southern(1975) 방법에 따라 하였다. PCR로 증폭시킨 *HLF* probe DNA를 [α -32P]dCTP로 표지한 후 X-ray film에 24시간 동안 노출시켰다.

SDS-PAGE 및 western blot 분석

형질전환 식물에서의 *HLF* 단백질의 발현을 관찰하기 위해 잎에서 단백질을 추출해서 SDS-PAGE 및 western blotting을 하였다. 각 식물체의 잎을 1g 마쇄 해서 1 ml PBS에 혼합한 후 4℃ 15000 rpm로 15분 간 원심하였다. 상층액을 10%polyacrilamide gel로 전기 영동 해서 0.1% coomassie brilliant blue R-250 으로 염색하였다. Gel을 0.45 μ m nitrocellulose membrane에 전기 blotting 해서 western blot 분석을 하였다. 1차 항체에는 토끼의 *HLF* polyclonal 항체를 2차 항체에는 염소의 alkaline phosphatase conjugated 항 토끼 IgG를 사용하였다.

T₁세대의 유전 분석

HLF 형질전환 T₀세대의 식물체를 GMO 격리포장에서 재배한 후 10 계통의 정상적인 식물체의 종자를 이용하여 T₁세대를 분석하였다. 수확한 각 계통의 종자의 종피를 제거하여 멸균한 후 2.5mg/L bialaphos가 함유되어 있는 1/2 MS배지에 종자를 치상하였다. 2주 후 bialaphos에 감수성 및 저항성을 나타내는 식물체 수를 조사하여 분리비를 χ^2 검정을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

Shoot 유도배지의 최적 bialaphos 농도

Callus를 이용하여 shoot 유도 배지의 bialaphos 농도를 검토한 결과 1mg/L bialaphos가 첨가되어 있는 배지의 callus는 shoot가 유도되었다. 그러나 2.5mg/L에서는 shoot가 유도되지 않았고 callus가 갈변하였다(Table 2-1). 따라서 본 실험의 shoot 유도 배지에는 2.5 mg/L의 bialaphos를 첨가하여 형질전환 식물체를 선발하였다.

형질전환 식물의 선발조건

Callus를 *Agrobacterium tumefaciens*로 감염 시킨 후 2.5mg/L bialaphos를 포함한 배지에 치상하여 약 1개월 간 배양하여 shoot를 유도하였다(Fig.2-2B, Table 2-3). 유도된 shoot를 5 mg/L bialaphos가 포함된 MS root 유도 배지에 치상한 결과 야생형 식물의 경우 식물체가 갈변하여 고사했지만 형질전환 식물체의 경우 뿌리가 유도되는 것이 확인되었다 (Fig.2-2C).

형질전환 식물의 제초제 내성

Bialaphos에 저항성을 가지는 형질전환 식물체 및 야생형 식물체의 잎에 제초제를 살포하고 10일 후에 관찰한 결과 형질전환 식물체의 잎은 외형적으로 피해를 받지않고 정상적으로 성장하였지만 야생형 식물체의 경우 처리 3일 후 부터 잎이 갈변하기 시작하여 10일 후에는 완전히 고사하였다 (Fig.2-3). 이러한 결과는 *bar* 유전자의 형질이 벼에 정상적으로 발현하고 있다는 것을 나타내고 있다.

형질전환 식물의 도입유전자 검출

Bialaphos에 저항성을 가지는 형질전환 식물체 및 야생형 식물체의 엽육 조직 DNA를 *bar* primer를 이용하여 PCR 분석한 결과 야생형 식물체에서는 band가 검출되지 않았지만 형질전환 식물체에서는 약 550 bp의 위치에 band가 검출되었다(Fig.2-4 A). *HLF* primer를 이용하여 PCR 분석을 한 결과 야생형 식물체로부터는 band가 검출되지 않았지만 형질전환 식물체로부터는 약 2.1 kbp의 위치에 band가 검출되었다 (Fig.2-4 B). 이러한 결과는 형질전환 벼의 염색체 DNA 내에 bialaphos 저항성 유전자와 *HLF* 유전자가 삽입된 것을 증명하고 있다. 형질전환 식물체의 잎에서 추출한 genomic DNA를 *Bam*H1로 처리하고 *HLF* probe를 이용하여 southern blot 분석을 실시한 결과는 Fig2-5와 같다. NC의 야

생형 식물체에서는 band가 검출되지 않았지만 lane1-4의 모든 형질전환 식물체에서는 band가 검출되었다.

HLF 단백질발현의 검출

Western blot분석을 한 결과(Fig.2-6) 모든 형질전환 식물이 HLF 단백질을 발현하고 있는 것이 밝혀졌다. H L F 단백질의 밴드는 80kDa 위치에 확인되었다. 48 kDa의 위치에도 큰 밴드를 볼 수 있지만 이것은 H L F 단백질이 분해해서 나타난 물질에 의하는 것이라고 추측되었다.

T₁세대의 유전자 분리비

T₁세대로의 유전자 분리비를 분석하였다. 분석 결과 Line4, 5는 1:1, Line3 은 15:1의 분리비가 나타났다. 그 이외의 계통은 1:3의 분리비가 나타났다. 대부분의 계통은 형질전환된 유전 형질이 정상적으로 후대에 유전하고 있는 것이 확인되었다. *HLF* 유전자 형질전환 벼에 대해 HLF 단백질이 발현해 후대에도 정상적으로 유전하고 있는 것이 확인되었다. 실험에서는 식물의 잎으로부터 단백질을 추출해 발현을 확인했지만 증자로의 HLF 단백질 발현 및 발현량의 확인이 필요하다. 또 HLF의 발현량은 담배 (Mitra et al. 1994, Salmon et al. 1998), 감자 (Chong et al. 2000), indica 벼 (Nandi et al. 2002)를 이용한 연구와 비교해 높지는 않았다. 향후 발현량이 많은 Line의 확보 및 식물로부터 추출한 HLF에 대한 분석이 필요하다.

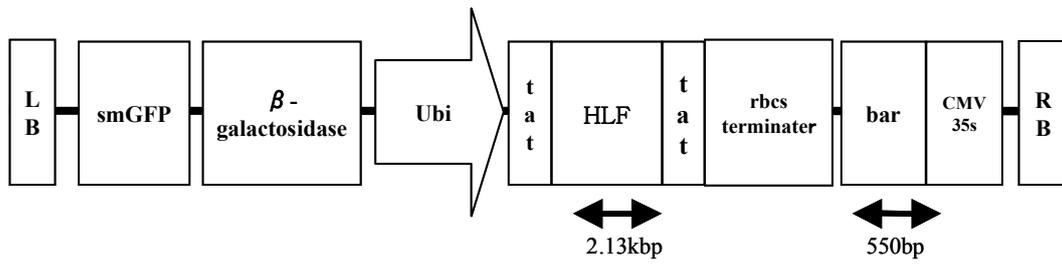


Fig.2-1. Structure of VE-9 TFT β

HLF: human lactoferrin gene, **tat**: transduction domain of human HIV, **bar**: bialaphos resistance gene, **Ubi**: polyubiquitine promoter of maize, Primer for PCR designed to amplify 550bp on *bar* gene and 2.13kb on *HLF* gene.

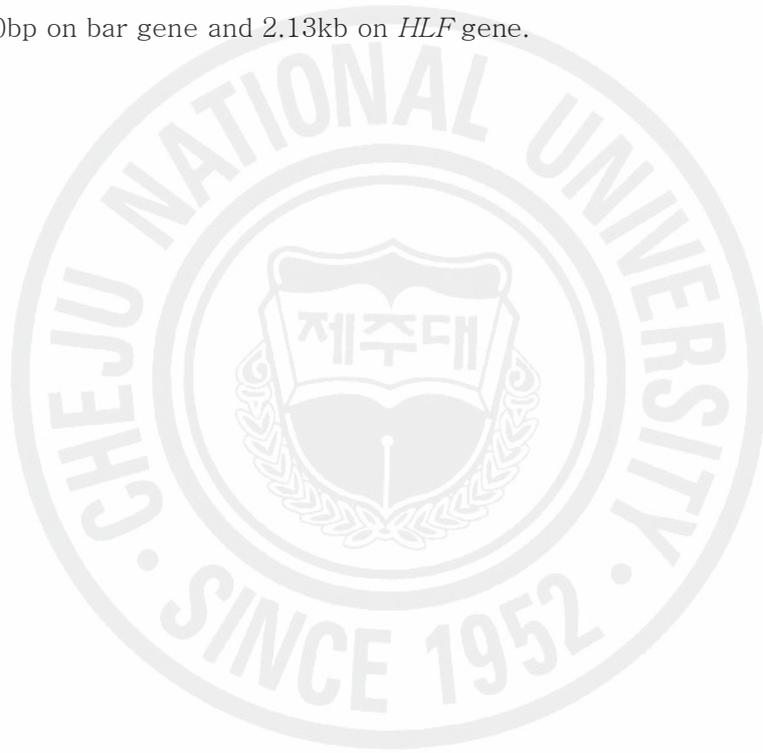


Table 1-1. Media used for tissue culture and transformation of rice

Medium	Composition
Callus Induction (N6CI)	N6 salts & vitamins, 2mg/L 2,4-D, 100mg/L <i>myo</i> -inositol, 30g/l sucrose, pH 5.8 , gelrite 3g/l
Agrobacterium culture (LB)	10g/l Tryptone, 5g/l Yeast extract, 5g/l NaCl, 1g/l
Co-culture (co-cl)	N6 salts & vitamins (Ca-free), 2mg/L 2,4-D, 30g/l sucrose, 10g/l glucose, 120mg/L betaine, 50mg/L CaCl ₂ ·2H ₂ O, pH 5.2 , 3g/l gelrite , 30mg/L acetosyringone
Callus growth & Agrobacterium elimination (N6AE)	N6 salts & vitamins, 2mg/L 2,4-D, 100mg/L <i>myo</i> -inositol, 30g/l sucrose, pH 5.8, gelrite 3g/l, 250mg/L carbencillin
Selection & shoot induction (MSSI)	MS salts & vitamins, 0.5mg/L NAA, 2mg/L BA, 15g/l sucrose, 30g/l sorbitol, 4g/l casamino acid, 0.5g/l L-proline, pH 5.8, 3g/l gelrite, 250mg/L carbencillin,
Root induction (MSRI)	MS salts & vitamins, 30g/l sucrose, 100mg/L <i>myo</i> -inositol, pH 5.8, 8g/l agar, 250mg/L carbencillin, 5mg/l bialaphos

2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid BA, 6-benzyladenine;

NAA, α -naphthaleneacetic acid

Table 2-2. Bialaphos susceptibility of wild type (cv. Dong Jin) callus

	Bialaphos concentration			
	0ppm	1ppm	2.5ppm	5ppm
Callus inducing shoots	16	4	0	0
Efficiency (%) ^a	88.9	22.2	0	0

^a number of callus inducing shoot divide callus number used for experiment

18callis used each experiment

Table 2-3. Transformation efficiency of rice cv. Dong Jin mediated by *A.tumefaciens* EHA105(VE9 TFT β)

Experiment	Number of callus for selection (A)	Number of Bar ^r callus ^a	Number of Bar ^R shoots ^b (B)	Transformation efficiency (B/A \times 100)
1	170	67	4	2.0
2	242	56	35	14.5
3	100	24	11	11.0

^b Shoot longer than 3cm were classified as resistant (Bar^R).

^a Survived callus number on the medium containing bialaphos

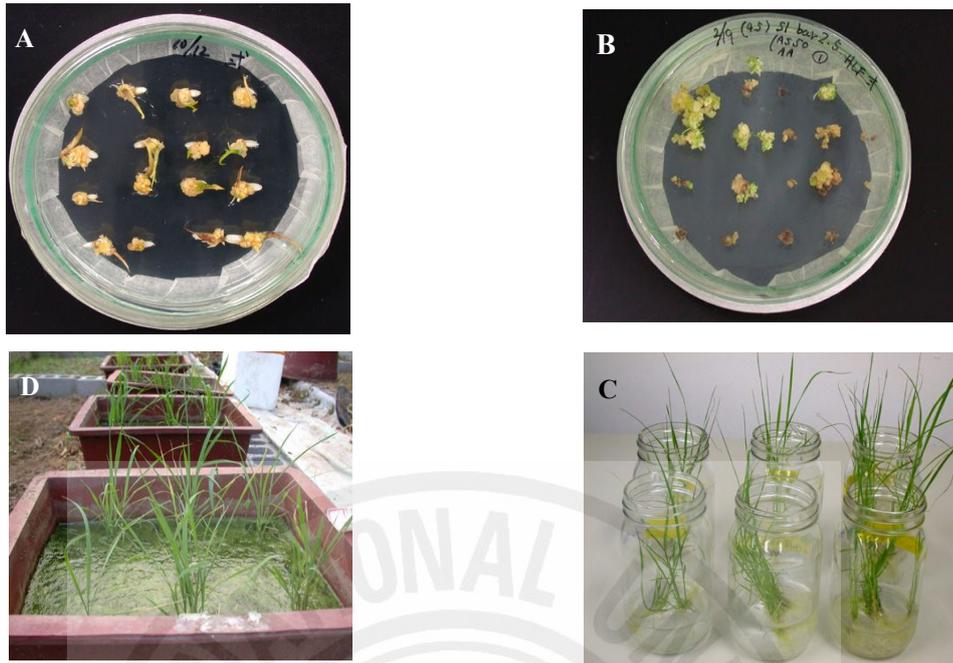


Fig. 2-2. Production of transgenic plants in rice.

- (A) Induced callus from mature seed, (B) Shoot formed on regeneration media containing 2.5mg/L bialaphos, (C) Hardening transformants with well developed shoot and root, (D) Transgenic rice in green house



Fig.2-3. Effect of bialaphos on transgenic plant and control plant.

Non-transgenic plant (left) and HLF transgenic plant (right) leaves were sprayed with herbicide (Meiji herbiace)5g/L, non-ransgenic plant was died while transgenic plant survived.

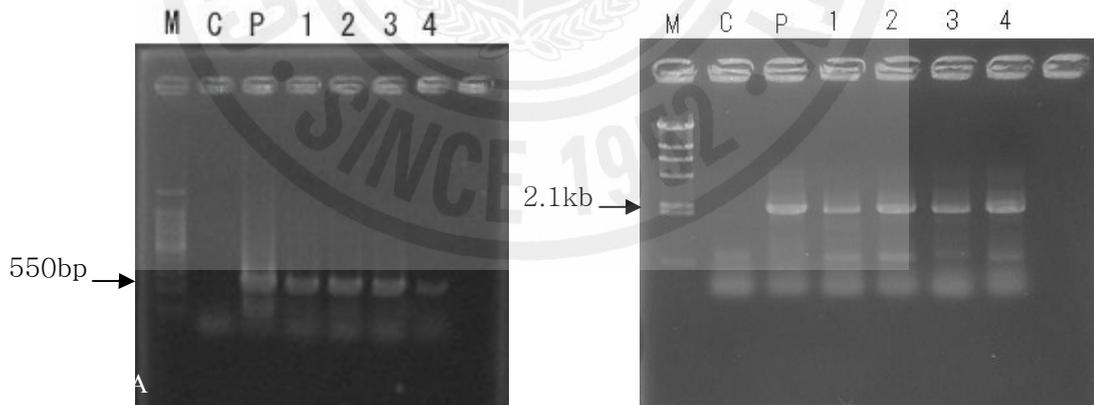


Fig.2-4. PCR analysis using *Bar* gene primer (A) and *HLF* gene primer (B) for transgenic of pCUM-VE9 TFT β .

Lane M: marker ladder Lane C: DNA from non-transgenic plants Lane P: plasmid DNA
Lane 1~4: transgenic plants

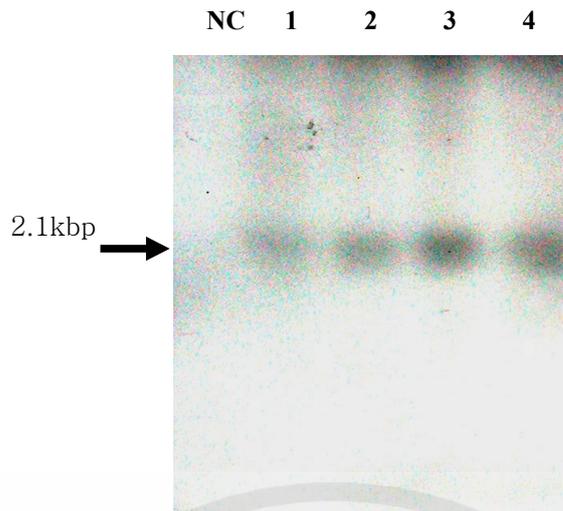


Fig.2-5. Southern blot analysis of transgenic (Lines 1-4) and control (NC) plants.

20 μ g genomic DNA from young leaf was digested with *Bam*HI and hybridized to *HLF* probe (2.1kbp).



Fig.2-6. Western blot analysis of human lactoferrin protein used transgenic rice leaf.

Line1: molecular marker **Line2:** protein from non-transgenic plant, **Lines3-6:** protein from transgenic rice plants. Human lactoferrin protein expression was detected on 80KD.

Table 2-4. Segregation of bialaphos resistance in T₁ progeny of transgenic

Lines	No. of seed tested ^a	No. of Bar ^R ^b	Ratio (R:S)	Expected ratio	χ^2 value ^c	P-value
1	20	14	2.3 : 1	3 : 1	0.26	0.61
2	20	16	4.0 : 1	3 : 1	0.26	0.61
3	20	19	19 : 1	15 : 1	0.05	0.82
4	20	11	1.2 : 1	1 : 1	0.20	0.65
5	20	12	1.5 : 1	1 : 1	0.80	0.37
6	20	16	4.0 : 1	3 : 1	0.26	0.61
7	20	15	3.0 : 1	3 : 1	0.00	1.00
8	20	14	2.3 : 1	3 : 1	0.26	0.61
9	20	13	1.9 : 1	3 : 1	1.06	0.30
10	20	14	2.3 : 1	3 : 1	0.26	0.61

^a Seeds were cultured on 1/2 MS medium containing 5mg/L bialaphos for 2 weeks.

Each experiment was replicated three times.

^b Seedlings longer than 5cm were classified as resistant (Bar^R).

^c χ^2 -values indicate significant fit to the expected ratio.

III. *Agrobacterium*을 이용한 *Zoysia japonica*의 음지 회피성 억제 유전자 도입

들잔디의 형질전환 연구는 현재 PEG법을 이용한 GUS 유전자의 도입이나 *Agrobacterium*을 이용한 제초제 내성 유전자의 도입에 대한 연구가 보고 되어 있다(Inokuma et al. 1998, Toyama et al. 2002). 그러나 *Agrobacterium*을 이용한 들잔디의 형질전환율은 다른 식물에 비해 매우 낮았으며 농업적으로 유용한 유전자를 이용한 형질전환 연구도 다른 잔디 품종과 단자엽 식물에 비해 많지 않다 (Bettany et al. 2003, Li and Qu 2004, Luo et al. 2004). 들잔디 재배 관리 시 가장 큰 문제는 잡초 제거, 잔디깎기, 병해, 저온에서의 휴면에 의한 갈색화 등이 있으며 그 중 잡초 제거는 노동력이 필요할 뿐만 아니라 제초제 살포에 의한 환경오염 문제도 심각한 실정이다. 또한 골프장과 같이 잔디를 고밀도로 재배 하였을 경우 식물이 웃자라게 되어 잔디깎기 횟수가 증가할 뿐만 아니라 시비량이 증가하며 병해가 자주 발생하게 된다. 그러므로 본 연구에서는 이러한 단점을 극복하기 위해 Oat phytochrome A mutant 유전자를 잔디에 도입하였다. Oat phytochrome A mutant 유전자는 귀리에서 클로닝된 광시그널 전달 유전자인 oat phytochrome A 유전자의 시그널 전달에 관여하는 영역의 sequence를 개량한 것으로 식물체에 도입하였을 경우 식물체의 웃자람을 억제하는 기능을 가지고 있다 (Kim et al. 2004b).

본 연구에서는 웃자람을 억제하는 것과 동시에 제초제 저항성을 나타내는 식물체를 개발하기 위하여 oat phytochrome A mutant 유전자와 제초제 저항성 유전자인 *bar* 유전자를 잔디에 도입하였다.

재료 및 방법

식물 재료 및 callus 유도

본 실험에서는 한국이나 일본에서 일반적으로 재배되고 있는 들잔디(*Zoysia japonica* steud.) 를 사용하였다. 완숙 종자로부터 유도된 callus로부터 정상적인 식물을 재분화하는 organogenic callus만을 선발해 MS callus 증식 배지에 치상해 배양하였다(Fig.3-2). 증식된 callus를 약 2주 후 새로운 MS callus 증식 배지에 치상하여 4일 간 전배양한 후 형질전환에 사용하였다.

Vector 및 *Agrobacterium* 배양

형질전환에 사용한 유용 유전자는 음지 회피성 억제 유전자인 귀리의 oat phytochrome A mutant S598A 및 oat phytochrome A triple mutant 유전자이다. 이 유전자를 *Arabidopsis*에 도입하면 660nm보다 긴 파장의 빛을 흡수하는 phytochrome A가 발현하여 식물의 웃자람이 억제되거나 식물체 잎의 수가 증가됨이 확인되었다(Kim et al. 2004b). Oat phytochrome A mutant S598A cDNA 유전자의 형질전환에 사용한 binary vector는 V-F2를 사용하였다. Vector의 T-DNA 내부에 비선택성 제초제 내성 유전자인 phosphinothricin acetyl transferase (*bar*) 유전자 및 green fluorescence protein (*gfp*) 유전자가 포함되어 있다(Fig.3-1). 이 V-F2가 도입되어 있는 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105를 항생제 kanamycin (100mg/ml), rifampicin(50mg/ml)이 첨가된 LB 배지에서 28℃에서 20시간 동안 배양한 후 그 이상 계대배양 하지 않고 60% glycerol 용액과 1 : 1으로 혼합하여 -80℃에 보존하였다.

Agrobacterium tumefaciens 감염

시험관에 kanamycin(100mg/ml), rifampicin(50mg/ml)이 첨가된 LB 배지 5 ml를 넣고 배양한 후 원심하여 균을 침전시켰다. LB 배지를 제거한 후 100 mg/L의 acetosyringone(3,5-dimethoxy-4-hydroxy-acetophenon, Aldrich) 및 0.02%의 pluronic F68이 포함되어 있는 10ml MSRSP 배지에 균을 재현탁 하였다. 감염시킬 callus를 약 1분 간 *Agrobacterium*의 현탁액에 침적시켰다. 접촉된 callus는 멸균된 filter paper로 여분의 수분을 제거하였다. MS co-culture 배지에 여과지를 한 장 깔아 그 위에 callus를 치상하여 10일 간 25℃의 광조건으로 *Agrobacterium*과 공동 배양하였다.

Agrobacterium 제거

10일 간 공동 배양한 callus로부터 *Agrobacterium*을 제거하기 위해서 callus를 멸균수로 세정한 후 carbenicillin 250mg/L가 첨가된 멸균수로 3회 이상 세정해서 filter paper로 여분의 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 callus는 carbenicillin 250 mg/L가 첨가된 MSCE 배지에 치상하여 1주 간 25℃의 광조건으로 배양하였다(Fig. 3-3).

Co-culture 배지의 pH검토

Co-culture 배지의 pH가 *Agrobacterium*의 감염율에 미치는 영향을 검토하였

다. *Agrobacterium* EHA101 pIG-121을 사용해 2 종류의 배지에서 유도된 callus를 각각 감염시켜 pH 5.8 및 pH 7.0의 co-culture 배지에서 배양하였다. 10일간 co-culture하여 *Agrobacterium*을 제거한 후 염색하고 GUS 유전자의 발현을 비교하였다.

Shoot 유도 및 형질전환 식물체의 선발

Callus로부터 형질전환 식물체를 재분화 시키기 위해서 2 mg/L의 bialaphos가 첨가된 shoot 유도 배지에 callus를 치상하였다. 25°C의 광조건으로 3-4주 간 배양한 후 선발된 shoot는 5mg/L의 bialaphos가 첨가된 root 유도 배지에 치상하여 1~2개월 동안 배양하였다. 충분히 성숙한 식물체는 peat moss와 perlite를 3 : 1의 비율로 혼합한 토양에 심어 온실 내에서 재배하였다.

형질전환 식물체의 제초제 저항성 검정

제초제 저항성 검정은 형질전환 식물체와 야생형 잔디를 실험 재료로 이용하였다. 충분히 신장한 잎에 5 g/L 농도의 bialaphos계 제초제(유효 성분 20% 메이지 제과, 일본)를 사용하였다. 그 후 온실에서 24시간 광조건으로 재배하였다.

Genomic DNA의 추출

본 실험에서 사용된 모든 DNA 추출은 Liu(1995) 방법에 따라 행하였다. 200-300 mg의 잎을 액체 질소로 동결 분쇄해 800 μ l의 추출 buffer(0.3M NaCl, 0.5M Tris-HCl: pH7. 5, 20mM EDTA: pH8. 0, 0.5% SDS, 5M Urea, 5% phenol)에 넣어 잘 혼합한 후 추출 buffer와 동량의 phenol/chloroform/isoamilalcohol (25:24:1)을 첨가해 약 20초 간 교반하였다. 원심분리(실온, 12000rpm, 5 min)하여 상층액을 추출한 후 2 배량의 99% ethanol을 넣어 혼합했다. 석출된 DNA를 유리봉으로 꺼내 70% ethanol로 세정하고 원심분리(실온, 12000rpm, 5 min)하여 침전시킨 후 건조 시켰다. DNA의 pellet은 0.01 mg/ml의 RNase를 포함한 20 μ l의 1 \times TE buffer에 용해하였다.

형질전환 식물의 PCR 분석

PCR 분석(polymerase chain reaction analysis, Mullis and Faloona, 1987)은 *bar* 특이 primer는 forward sequence (5`-GGT-CTG-CAC-CAT-CGT-CAA-CC-3`) 및 reverse sequence (5`-ATC-TCG-GTG-ACG-GGC-ACC-A-3`)를 사용하였고 oat phytochrome A mutant S598A 유전자에 특이적인

primer에는 forward sequence (5`-GTT-GTC-AAG-ATG-AAG-AGC-3`) 및 reverse sequence (5`-CAC-CAA-CTT-ATG-GAC-AGT-3`)를 사용하였다. PCR은 4분 간 pre-denaturation 후, 94℃ 30초 denaturation, 61℃ 45초 annealing, 72℃ 30초 extension을 35 cycle 하였다. 그 후 post elongation는 72℃로 7분, 반응시켰다.

Southern blot 분석

DNA 25µg를 *Bam*HI, *Hind*III, *Pst*I, *Sca*I으로 처리하고 전기 영동을 이용하여 0.8% agarose gel에 분획한 후 nylon membrane에 전사시켰다. Hybridization는 Southern(1975) 방법에 따라 시행하였다. PCR로 증폭시킨 *bar* probe DNA를 [α -³²P]dCTP로 표지 한 후 X-ray film에 24시간 동안 노출하였다.

형질전환 식물의 RT-PCR 분석

RT-PCR에는 progema사의 Access RT-PCR System을 사용하였다. 1µg total RNA, 2.5µl AMV/Tfi 5Reaction buffer, 0.5µl 10mM dNTP Mixture, 1µM MgSO₄ 2.5µl primer, 0.5µl AMV reverse transcriptase, 0.5µl Tfi DNA polymerase 를 혼합해 RT-PCR에 사용하였다. 대조 실험에는 303bp 의 크기의 18s rRNA을 증폭시키는 primer (5'-ATG-ATA-ACT-CGA-GGG-ATC-GC-3') 및 (5'-CCT-CCA-ATG-GAT-CCT-CGT-TA-3')를 사용하였다. RT-PCR은 cDNA 합성 조건 45℃ 50분, hot start 는 94℃ 2분, 94℃ 30초, 61℃ 45초, 72℃ 30초에 35 cycle 했다. 그 후 post elongation는 72℃로 7분동안 반응시켰다.

Northern blot 분석

식물의 잎으로부터 Tri-reagent (MRC, Inc., Cincinnati, OH)를 사용해, Total RNA를 추출하여 northern blot 분석에 사용했다. 30µg의 Total RNA을 2µl 10× MOPS, 4µl formaldehyde, 10µl formamide와 혼합해 65℃에서 15분 간 반응시킨 후 3분 간 얼음으로 냉각하였다. 이 혼합액을 2.2M formaldehyde를 포함한 1.2% agarose gel에서 50V의 전압으로 3시간 전기 영동 했다. blotting 및 hybridization은 Southern 분석과 같은 방법을 이용하였다.

SDS-PAGE 및 Western blot 분석

형질전환 식물에서의 oat phytochrome A mutant 단백질의 발현을 관찰하기 위

해 앞에서 단백질을 추출해 SDS-PAGE 및 western blotting을 하였다. 각 식물체의 잎 0.5 g을 마쇄해 0.5ml PBS에 혼합한 후 4℃, 15000 rpm로 15분 간 원심하였다. 상층액을 10% polyacrilamide gel로 전기 영동 해서 0.1% coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다. Gel을 0.45µm nitrocellulose membrane에 전기 blotting 해서 western blot 분석을 하였다. 1차 항체에는 토끼의 Oat phytochrome A mutant polyclonal 항체를, 2차 항체에는 염소의 alkaline phosphatase conjugated 항 토끼 IgG를 사용하였다.

형질전환 식물의 형태적 분석

형질전환체 및 야생형 식물체를 온실에서 재배한 후 잎의 길이, 줄기의 길이, 포복경의 수를 조사하여 oat phytochrome A mutant S598A의 발현이 식물체에 미치는 영향을 조사하였다.

결과 및 고찰

Co-culture 배지의 pH

Co-culture배지의 pH에 따른 형질전환 효율을 조사한 결과, 기존에 사용되었던 pH5.2보다 pH7.0에서 GUS 발현이 높았다(Fig.3-2, Table 3-1). 이것은 낮은 pH조건에서 *Agrobacterium*의 *Vir* 유전자 발현을 유도하여 형질전환 효율을 높인다는 이전의 연구(Godwin et al. 1990)와 상반되는 결과로 본 연구에서는 pH7.0에서 *Agrobacterium*이 활발하게 증식하여 형질전환율을 높였을 것으로 생각된다. 이러한 결과를 바탕으로 oat phytochrome A mutant 유전자의 도입에서 pH7.0의 co-culture 배지를 사용하였다(Table 3-2).

형질전환 식물의 선발조건

Callus를 *Agrobacterium tumefaciens*로 감염 시킨 후 2.5mg/L bialaphos를 포함한 배지에 치상하고 약 1개월 간 배양하여 shoot을 유도하였다(Fig.3-5A). 유도된 shoot는 5 mg/L bialaphos가 포함된 MS root 유도 배지에 치상하여 식물체를 선발하였다. (Fig3-5B) root 유도 배지에 치상한 야생형 식물의 경우 같변되어 식물체가 고사했지만 형질전환 식물체의 경우 뿌리가 유도되는 것이 확인되었다. 이처럼 bialaphos를 shoot 유도단계부터 적용하여 2단계로 선발하였을 때 형질전환률은 1.8%에서 최대 2.8%였다(Table 3-3).

형질전환 식물체의 제초제 저항성

Bialaphos에 대한 저항성을 가지는 형질전환 식물체와 야생형 식물체의 잎에 제초제를 살포하여 1주 후에 관찰한 결과, 형질전환 식물체의 잎에는 변화가 나타나지 않았다(Fig.3-6A). 야생형 식물의 경우 처리 3일 후부터 잎의 갈변이 시작되어 10일 후에는 완전히 고사하였다(Fig.3-6B). 이러한 결과는 *bar* 유전자의 유전 형질이 잔디에서 정상적으로 발현하고 있는 것을 보여준 것이다.

형질전환 식물의 도입유전자 검출

Bialaphos에 대한 저항성을 가지는 형질전환 식물체 및 야생형 식물체의 잎 조직 DNA를 *bar* primer를 이용해 PCR 분석을 하였다. 그 결과 야생형 식물체에서는 band가 검출되지 않았지만 형질전환 식물체로부터는 약 550bp의 위치에 band가 검출되었다 (Fig.3-7A, Fig.3-8A). Oat phytochrome A primer를 이용해 PCR 분석을 한 결과, 야생형 식물체에서는 band가 검출되지 않았지만 형질전환 식물체에서는 약 540bp 위치에 band가 검출되었다(Fig.3-7B, Fig.3-8B). 이러한 결과는 형질전환된 잔디의 염색체 DNA내에 bialaphos 저항성 유전자와 oat phytochrome A mutant 유전자가 삽입된 것을 증명하고 있다.

Fig3-10과 같이 oat phytochrome A mutant S598A genomic 형질전환 식물의 DNA를 *Bam*HI로 제한 효소 처리하여 *bar* probe를 이용해서 southern blot 분석을 실시했다. 그 결과 lane1, 3, 4, 7, 9 모든 형질전환 식물체에서 band가 검출되었다. Lane7에서는 유전자의 중복 삽입이 관찰되었다.

도입유전자의 mRNA 발현 검출

RT-PCR의 분석 결과 *18s* rRNA primer를 사용했을 경우에는 야생형 식물도 band가 확인되었지만 *bar* primer를 사용했을 경우에는 형질전환 식물만 band가 나타났다(Fig 3-11). 모든 형질전환 식물로부터 *bar* 유전자의 발현이 확인되었다.

Northern blot 분석 결과(Fig3-10) 모든 형질전환 식물체로부터 *bar* 유전자가 발현되었다. 특히 line 1, 4의 식물은 다른 line과 비교해서 발현량이 많은 것이 확인되었다.

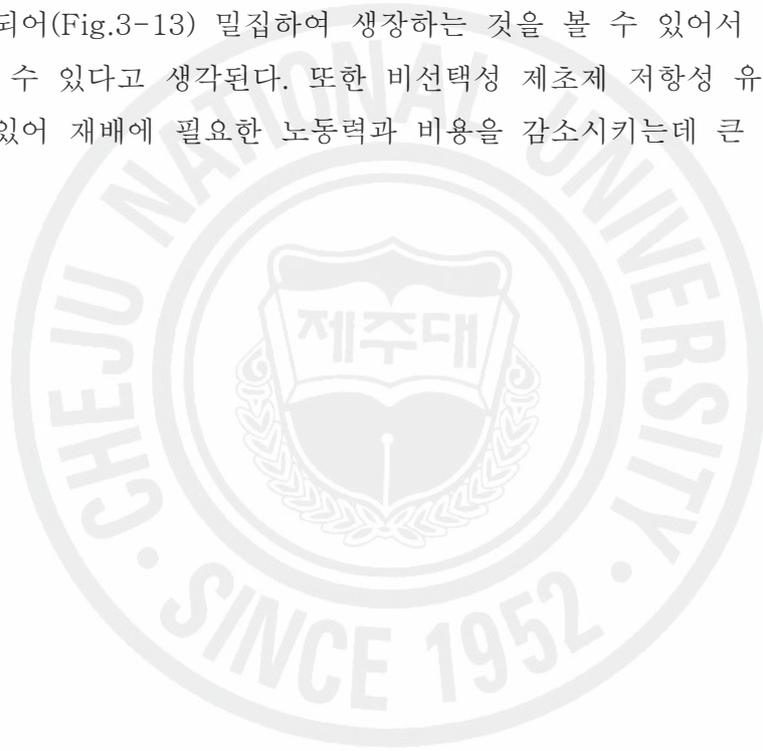
형질전환 식물의 단백질 발현

SDS-PAGE 및 western blot 분석을 한 결과, 모든 형질전환 식물이 oat phytochrome A mutant S598A 단백질을 발현하고 있는 것이 밝혀졌다

(Fig.3-12). Southern blot 분석 결과 같은 계통인 것으로 밝혀진 line 3, 4, 9 중 line 9는 다른 2개체보다 단백질 발현이 높게 나타났다. Line1 및 7은 각각 독립한 계통이고 단백질의 발현양도 많았다.

형질전환 식물체의 형태학적 특징

형질전환 식물체와 야생형 식물체의 형태적 차이를 비교한 결과(Table 3-4) 형질전환체는 야생형에 비하여 초고가 40~110mm 낮고, 엽장이 50% 이상 감소하고, 포복경이 최대 2배 이상 발생하는 것이 관찰되었다. 형질전환 식물은 웃자람이 억제되어(Fig.3-13) 밀집하여 성장하는 것을 볼 수 있어서 잔디깎기의 횟수를 줄일 수 있다고 생각된다. 또한 비선택성 제초제 저항성 유전자도 동시에 도입되어 있어 재배에 필요한 노동력과 비용을 감소시키는데 큰 역할을 한다고 생각된다.



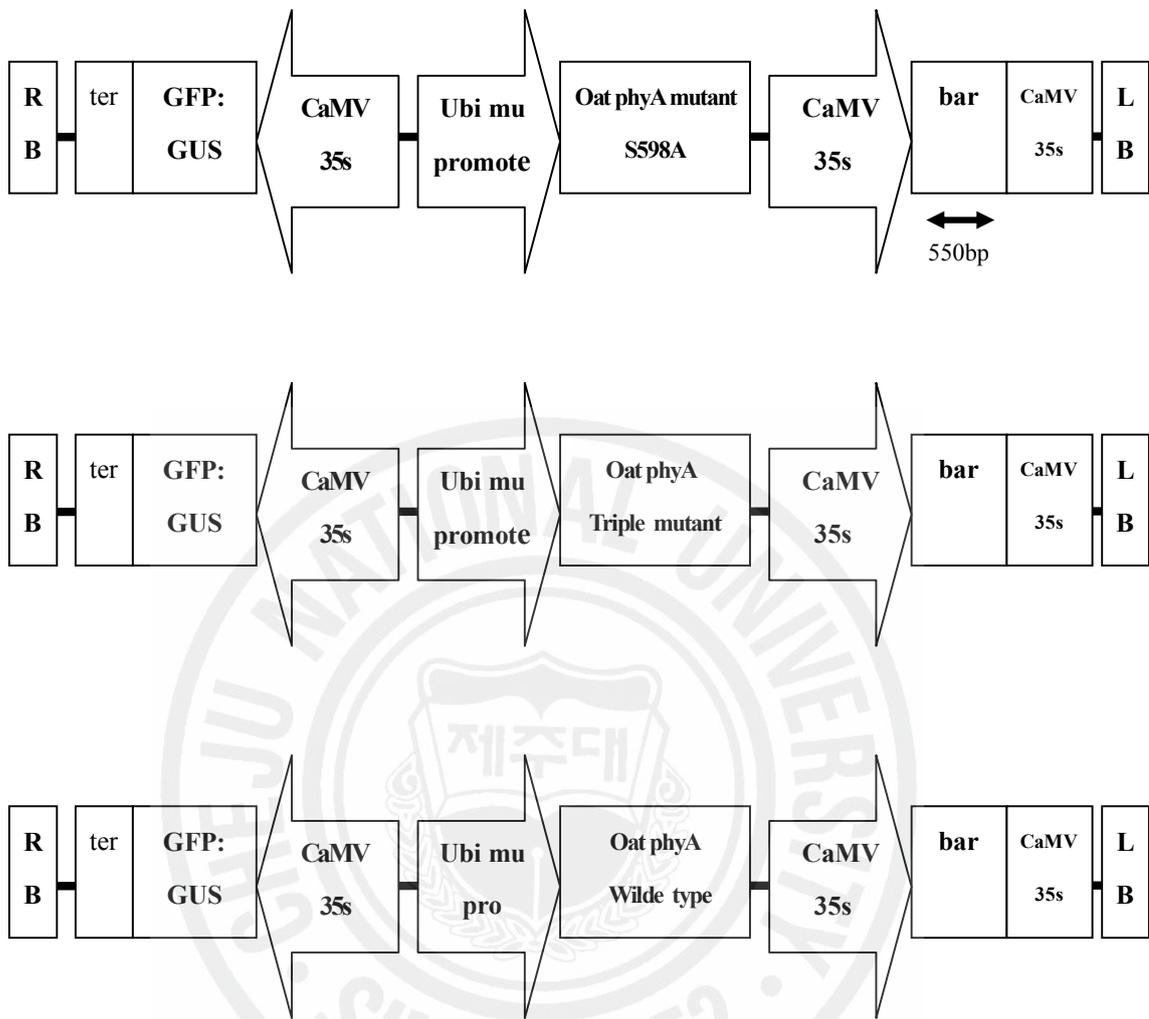


Fig.3-1. Structure of pCambia3301::Ubi m pro

GFP: green florescence protein gene GUS: β -glucuronidase gene Bar: bialaphos resistance gene containing Ubi mu pro: polyubiquitine promoter of maize, CaMV35s: cauliflower mosaic virus 35s promoter

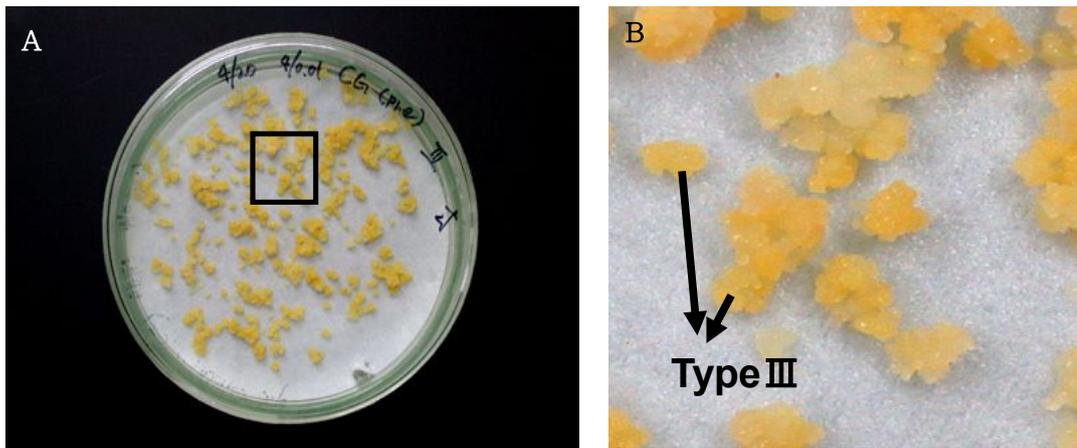


Fig.3-2. Callus propagation (A) and Type III callus selection (B)



Fig.3-3. *Agrobacterium* infection to *Zoysia japonica* callus.

(A) *Agrobacterium* cells in MS resuspension medium (B) type III callus using for infection (C) callus in *Agrobacterium* solution (D) dehydration (E) transfer co-cultivation medium (F) co-culture under light condition

Table 3-1. Effect of pH during co-culture period on transformation efficiency

callus growth medium	pH of co-culture medium	No.of blue spot /100 callus
MSCG1 ^a	7.0	155.6±61.0
MSCG2 ^b	7.0	139.0±50.3
MSCG1 ^a	5.2	10.4±6.4
MSCG2 ^b	5.2	26.0±7.6

^a Callus growth 1 (MSCG1) MS salts and vitamins, 30 g l⁻¹ sucrose, 1 mg l⁻¹ 2,4-D, 0.4 mg l⁻¹ Kinetin, 2 g l⁻¹ gelrite, pH 5.8

^b Callus growth 2 (MSCG2) MS salts and vitamins, 30 g l⁻¹ sucrose, 4 mg l⁻¹ 2,4-D, 0.01 mg l⁻¹ BA, 2 g l⁻¹ gelrite, pH 5.8

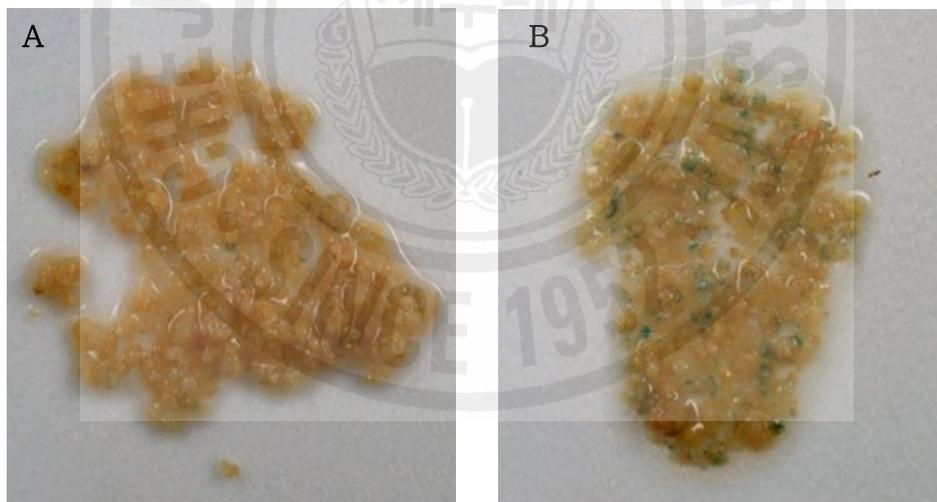


Fig.3-4. Effect of pH during co-culture period on transformation efficiency

Callus was developed on MSCG1 media and used for co-cultivated.

(A) pH 5.2 co-culture media used for infection (B) pH 7.0 co-culture media used for infection

Table 3-2. Media used in transformation system

Callus induction (MSCI)	MS salts and modified vitamins (4 mg l ⁻¹ thiamine– HCl), 30 g l ⁻¹ , 100mg l ⁻¹ α- ketoglutaric acid, 2mg l ⁻¹ 2,4-D, 0.2 mg l ⁻¹ BA, 2 g l ⁻¹ gelrite, pH 5.8
Callus growth 1 (MSCG1)	MS salts and vitamins, 30 g l ⁻¹ sucrose, 1 mg l ⁻¹ 2,4-D, 0.4 mg l ⁻¹ Kinetin, 2 g l ⁻¹ gelrite, pH 5.8
Callus growth 2 (MSCG2)	MS salts and vitamins, 30 g l ⁻¹ sucrose, 4 mg l ⁻¹ 2,4-D, 0.01 mg l ⁻¹ BA, 2 g l ⁻¹ gelrite, pH 5.8
Agrobacterium resuspension (MSAS)	CaCl ₂ free MS salts and vitamins, 30 g l ⁻¹ sucrose, 10g l ⁻¹ D-glucose 0.01mg l ⁻¹ BA, 0.02% plonic F68, 50 mg l ⁻¹ AS, pH 7.0
Co-culture (MSCO)	MSAS plus 2g l ⁻¹ gelrite , pH 7.0
Callus growth and <i>Agrobacterium</i> Elimination (MSAE)	MSCG2 plus 250 mg l ⁻¹ carbenicillin
Shoot induction and pre-selection (MSSI)	MS salts and vitamins, 30 g l ⁻¹ maltose, 1mg l ⁻¹ BA, 2g l ⁻¹ gelrite, 250mg l ⁻¹ carbenicillin, 2 mg l ⁻¹ bialaphos , pH 5.8
Root induction and selection	MS salts and vitamins, 30 g l ⁻¹ sucrose, 2g l ⁻¹ gelrite, 250mg l ⁻¹ carbenicillin, 5 mg l ⁻¹ bialaphos , pH 5.8

2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; BA, 6-benzyladenine;

AS, acetosyringone

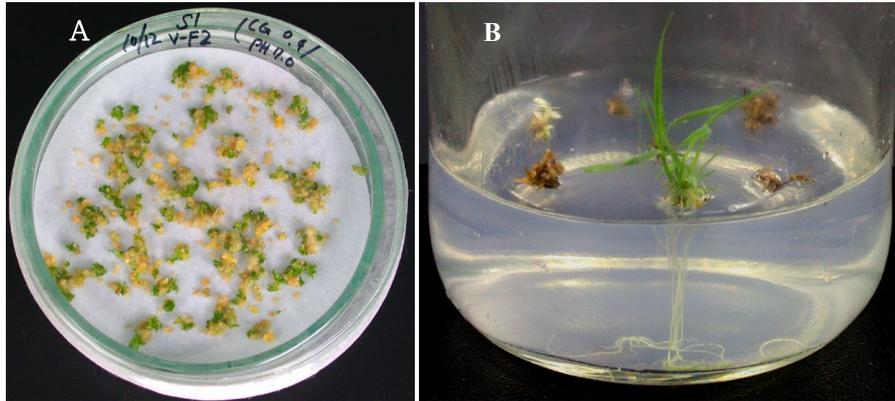


Fig.3-5. Induction of shoot and root

A: inducing shoot after 4 weeks culture on shoot induction medium with 2mg/L bialaphos **B:** rooting from shoot on root induction medium with 5mg/L bialaphos

Table 3-3. Transformation efficiency of Zoysiagrass

	Number of infected callus	Produced BarR calli with shoot	Produced BarR plants	Transformati on efficiency (%)
Oat PhyA mutant S598A	2250	468	43	1.9
Oat PhyA Triple mutant	425	25	12	2.8
Oat PhyA Wilde type	440	28	8	1.8

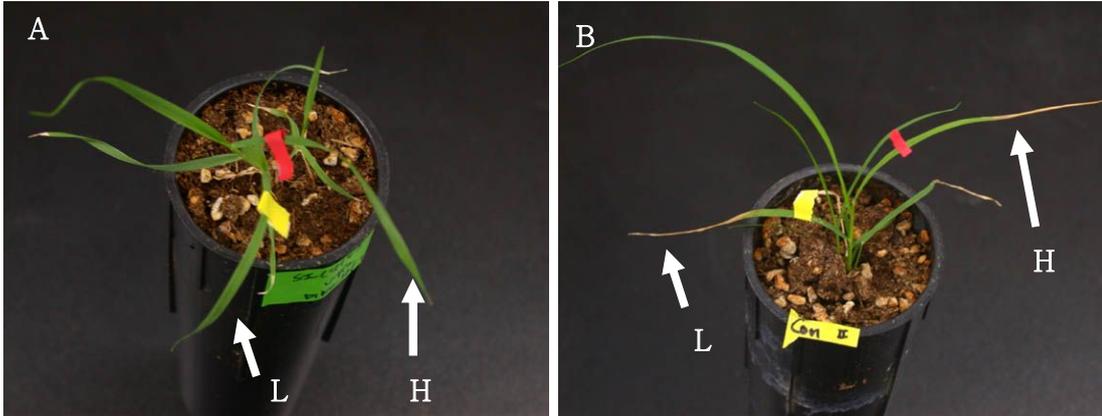
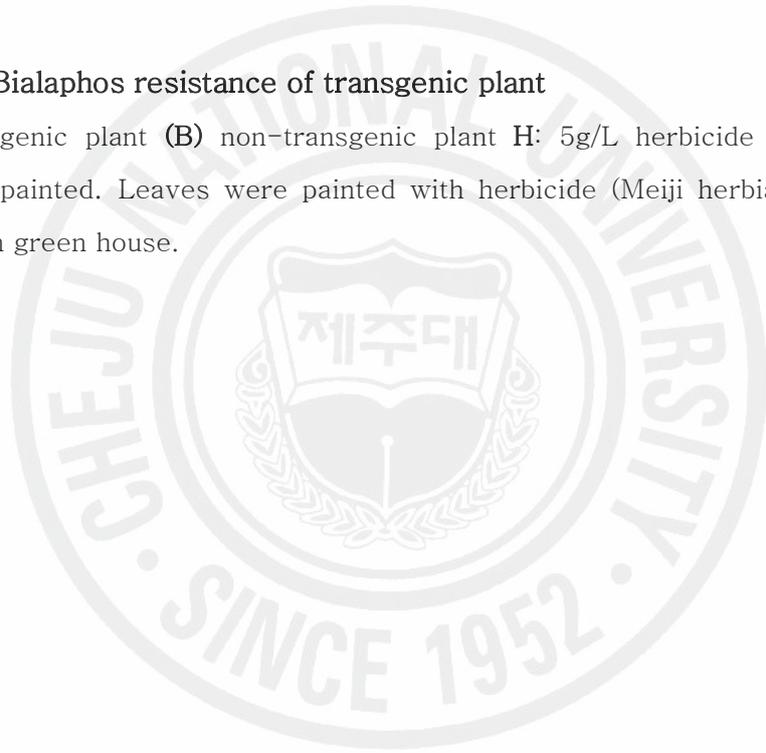


Fig.3-6. Bialaphos resistance of transgenic plant

(A) Transgenic plant (B) non-transgenic plant H: 5g/L herbicide painted L: 1g/L herbicide painted. Leaves were painted with herbicide (Meiji herbicide) and 10days cultured in green house.



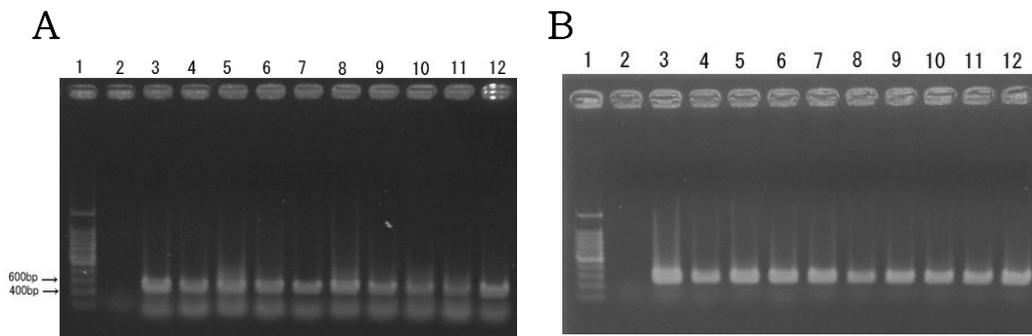


Fig.3-7. PCR analysis using oat phytochrome A mutant S598A zoysiagrass genomic DNA

(A) *bar* gene specific primer using S598A genomic DNA **(B)** oat phyA gene specific primer using S598A genomic DNA **Lane 1:** 100bp DNA ladder marker **Lane 2:** DNA from non-transgenic plant **Lane 3:** Plasmid DNA **Lane 4~12 :** transgenic plants.

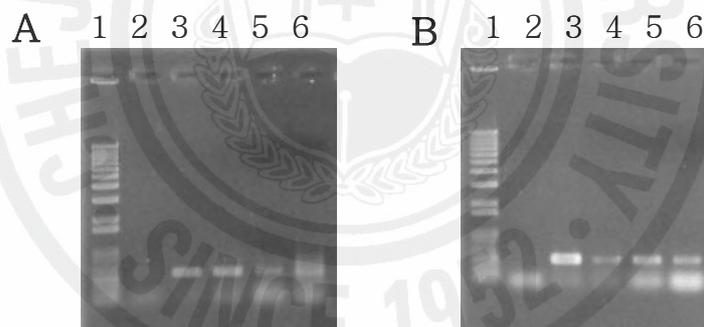


Fig.3-8. PCR analysis using oat phytochrome A wild type and oat phytochrome A triple mutant zoysiagrass genomic DNA

(A) Oat phyA gene specific primer using phyA wild type triple mutant genomic DNA **(B):** *bar* gene specific primer using oat phyA wild type and triple mutant genomic DNA **Lane1:** 1Kbp DNA maker **Lane2:** DNA from non-transgenic plant **Lane3:** Plasmid DNA **Lane4,5:** oat phyA wild type transgenic plants **Lane4:** oat phyA triple mutant transgenic plant

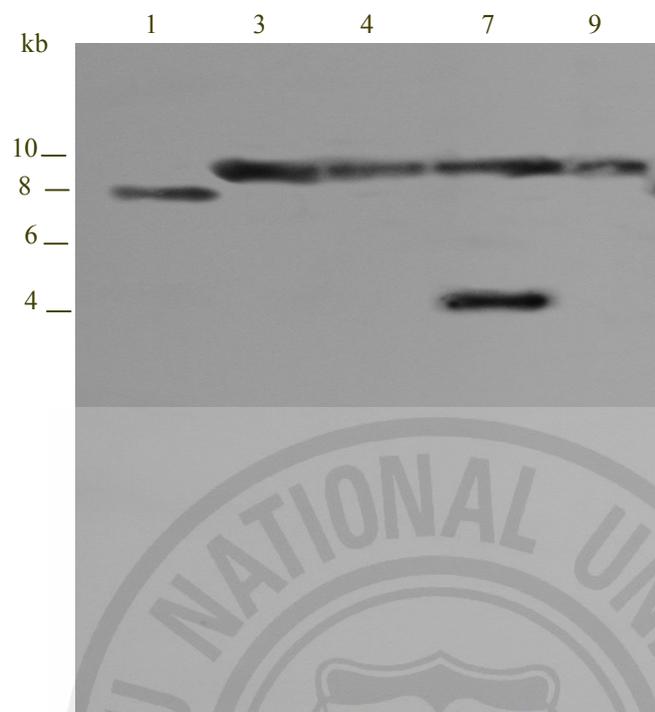


Fig.3-9. Southern blot analysis of S598A transgenic zoysiagrass.
Lane 1-9 : transgenic plants. Genomic DNA digested by *Bam*HI and hybridized to *bar* probe

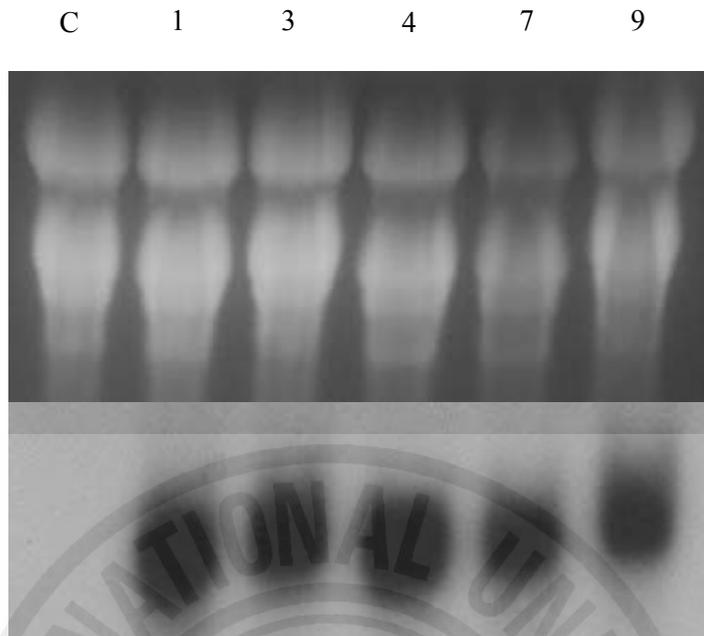


Fig.3-10. Northern blot analysis of PhytochromeA mutant S598A transgenic plants

C: wild type plant Lane1-9: transgenic plant. *bar* gene was used as probe.

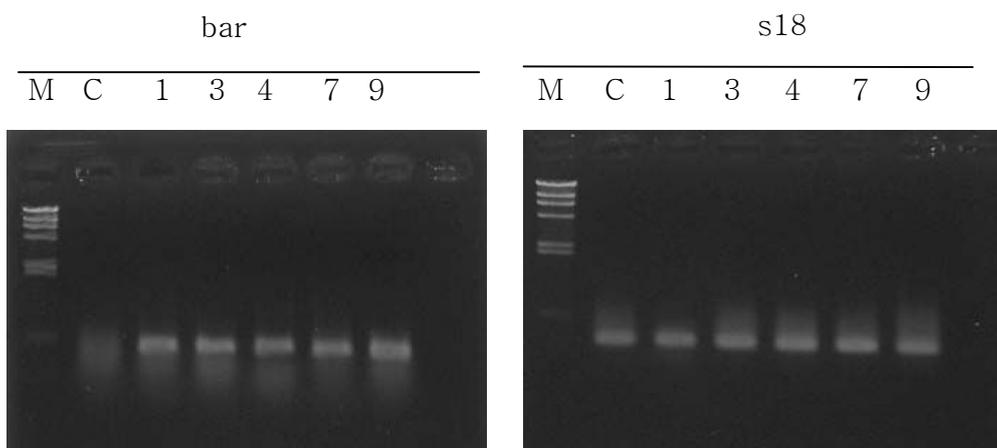


Fig.3-11 RT-PCR analysis of V-F2 transformed zoysiagrass

bar: used *bar* gene specific primer **s18:** used s18 rRNA gene specific primer

M: λ HindIII marker **C:** wild type plant **1-5:** transgenic plants

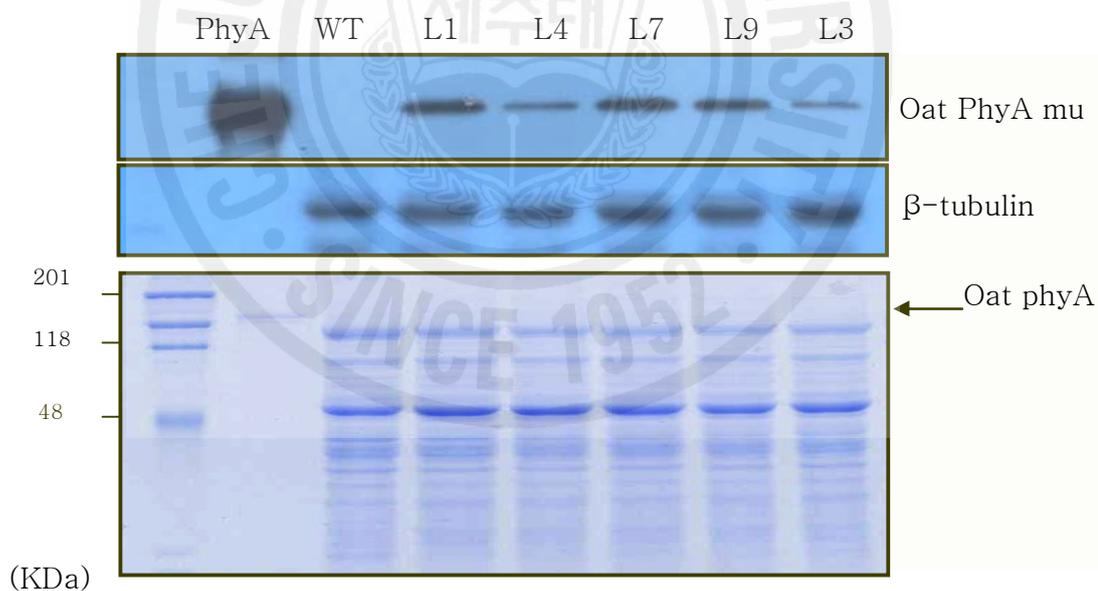


Fig.3-12. SDS-PAGE and Western blot analysis of S598A transgenic zoysiagrass. Lane phy A: oat phy A control, **Lane WT:** wild-type zoysiagrass, **Lane 1-3:** transgenic plants β -tubulin is compare to amount of loaded protein

Table 3-3. Mophological difference between transgenic and non-transgenic plants

	Plant height (mm)	Leaf blade length ^a (mm)	Tiller number
control	163±16.0	245±21.6	1.6±1.34
Line1	95	40.3±4.1	2.3±0.63
Line3	115	87.0±15.4	2.6±0.68
Line4	115	87.0±5.6	1.2±0.20
Line7	53	58.8±6.6	3.8±0.80
Line9	85	81.0±17.3	3.8±0.48

^a Leaf blade length was measured longest leafs on the plants.

Each value represents mean ± S.E of 5 replicates.



Fig.3-13. Mature transgenic plants grown without mowing
(A) and (C) Control plants from seedling (B) and (D) Transgenic plants of oat phyA mutant S598A gene

IV. 종합 고찰

지금까지 단자엽 식물의 형질전환 효율을 높이기 위한 다양한 방법들이 개발되어 왔으나 형질전환 효율은 매우 낮은 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 농업적으로 중요한 작물 중의 하나인 벼와 들잔디를 이용하여 형질전환 효율을 높이기 위한 연구를 수행하였다. 벼의 형질전환에는 embryogenic callus을 이용한 방법이 주로 사용되고 있으나(Lee et al. 1998, Kumria et al. 2001, Huang et al. 2002, Nandy et Al. 2002). 본 연구에서는 callus 유도 초기 단계의 배 조직을 형질전환에 사용하여 실험에 필요한 시간을 단축시켰다. 이 방법은 callus를 유도하는데 시간이 걸리는 들잔디와 kentucky bluegrass 등 (Kusano et al. 2003)의 식물에 적용하게 되면 형질전환 실험에 필요한 시간을 크게 줄일 수 있을 것으로 기대된다. 또한 벼의 형질전환 식물 선발 과정 중 재분화 초기단계에 고농도의(5mg/l) bialaphos를 첨가하면 형질전환된 세포 내에서 bialaphos 저항성 유전자 또는 PAT(Phosphinothricin acetyltransferase)의 발현이 약하거나 충분하지 않기 때문에 bialaphos에 의해 재분화가 억제되는 것으로 추정된다. 그러나 bialaphos를 사용하지 않고 재분화를 유도하면 chimera 식물이 나타나거나 선발 escape의 문제가 발생하게 되므로 선발 초기에는 저농도의 bialaphos를 사용하여 선발하는 것이 효율적이라고 생각된다.

이러한 결과를 이용하여 bialaphos의 농도를 단계적으로 조절하여 잔디 형질전환 식물체를 선발한 결과 이전의 연구 (Toyama et al. 2002) 보다 형질전환율이 높게 나타났고 이러한 연구 결과는 향후 형질전환율 및 재분화율이 낮은 식물의 선발에 유효한 방법이라고 생각된다. 또한 *Agrobacterium*의 감염은 약산성 조건 하에서 촉진되는 것으로 알려져 있으나 Li(2002)등에 의하면 식물과 균종에 따라 최적 pH가 다르다는 것이 밝혀졌다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 잔디의 형질전환에 co-culture 배지의 pH가 미치는 영향을 검토한 결과, 기존에 사용하였던 pH(pH5.8)와는 달리 pH7.0에서 형질전환율이 가장 높게 나타났다. 본 연구에서는 상기의 연구 결과들을 바탕으로 벼 및 잔디의 형질전환을 수행하였다.

지금까지 ABF3, CBF3 등 많은 스트레스 저항성 유전자가 발견되었다 (Jagro-Ottosen et al. 1998, Choi et al. 2000, Kang et al. 2002). 특히 ABF3 유전자는 CBF3 등의 유전자와 비교해 저온 스트레스에 대한 저항성이 약한 것으로 보고되어 있으나(Oh et al. 2005) ABF3 유전자가 도입된 상추(Enkhchimeg et al. 2005 and 2006)를 조사한 결과 저온에 대한 저항성이 있는 것이 밝혀졌다. 또한

본 연구에서 개발한 벼에서도 저온 스트레스 저항성이 나타나는 것으로 확인되었다. 그 밖에 형질전환 기술을 이용하여 인간에 유용한 물질을 생산시키는 연구도 많이 진행되어 왔다. 그 중 *HLF* 유전자는 지금까지 고구마 세포, 감자, 담배, *indica* 벼 등에서 개발되어 왔으나(Salmon et al. 1998, Chong et al. 2000, Nandy et al. 2002, Min et al. 2006), *HLF* 유전자 이외에 복합 기능 유전자를 동시에 도입한 연구는 없었다. 본 연구에서는 벼의 *HLF* 유전자와 제초제 저항성 유전자가 동시에 도입된 복합 형질을 가진 식물체를 개발하여 분석하였으며, 그 결과 두 유전자 모두 발현하는 것을 확인하였다. 그러나 western blot 분석 결과, *HLF* 단백질뿐만 아니라 48Kda에 또 하나의 단백질이 존재하는 것이 밝혀졌다. 이와 같은 현상은 담배의 *HLF* 형질전환 식물체에서도 나타났으며(Mitra et al. 1994) 이것은 *HLF*가 분해되어 발생한 lactoferricine 인 것으로 추정된다.

Phytochrome A 는 660nm의 빛을 흡수하여 signal을 전달하지만(Smith H 2000), 본 실험에 이용한 oat phytochrome A mutant는 660nm 이상의 빛을 흡수해 signal을 전달하여 음지 회피성 현상이 나타나는 것으로 알려져 있다 (Kim et al. 2004b). Oat phytochrome A mutant 유전자가 도입된 형질전환 들잔디를 분석한 결과, 야생형 식물과 비교하여 초고가 낮고, 엽장이 짧으며, 포복경의 수가 많아지는 것이 관찰되었으며, 이것은 쌍자엽 식물인 *Arabidopsis*를 사용한 이전의 연구 결과와 유사하다(Kim et al. 2004b). 동시에 도입된 제초제 저항성 유전자의 정상적인 발현도 확인되었다.

이상의 결과, 본 연구에서 개발된 스트레스 및 제초제 저항성 등의 복합 형질을 가진 형질전환 식물체들은 학문적인 연구뿐만 아니라 농업적으로도 유용한 기능을 가지고 있기 때문에 향후 분자 육종식물의 개발에 많은 도움이 될 것으로 기대된다.

v. 적요

*Agrobacterium*은 식물 형질전환에 널리 이용되어 온 방법 중 하나이며, 특히 쌍자엽 식물의 형질전환에 널리 이용되어 왔다. 단자엽 식물인 벼에서도 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환이 성공적으로 이루어지면서 잔디, 옥수수 등과 같은 식물에서도 널리 이용되고 있다. 본 연구에서는 *Agrobacterium* 을 이용하여 *ABF3* 와 human lactferrin 유전자를 벼에 형질전환하였고 들잔디의 음지내성을 향상시키기 위해 oat phytochrome A mutant 유전자를 형질전환하였다.

환경 스트레스 저항성 유전자 인 *ABF3* 를 벼에 형질전환한 결과 30개체 이상의 hygromycin 저항성 식물체가 선발되었으며, 이것들을 분석한 결과 유전자가 정상적으로 삽입되어 발현된 것을 확인할 수 있었다. 형질전환 후 후대에서도 정상적으로 유전되는 것이 관찰되었다. 형질전환 식물과 야생형 식물을 비교한 결과 저온에 대한 저항성이 확인되었다. 또한 human lactoferrin 유전자를 벼에 형질전환한 결과 40개체 이상의 bialaphos 저항성 식물체가 선발되었으며 유전자가 정상적으로 삽입되어 HLF 단백질이 식물체 내에서 발현하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 형질전환 후대 식물에서도 정상적으로 유전되고 있는 것이 관찰되었다.

들잔디의 음지 내성을 향상시키기 위해 oat phytochrome A mutant 를 형질전환한 결과 1.8~2.8%의 효율로 형질전환 식물이 선발되었다. 또한 PCR 분석 및 northern blot, southern blot 분석을 실시해 유전자의 도입 및 발현을 확인하였고 western blot 분석을 실시해 oat phytochrome A mutant 단백질의 발현을 확인하였다. 잔디의 형태를 비교한 결과 oat phytochrome A mutant S598A 유전자가 도입된 식물체는 야생형 식물에 비해 식물체의 높이가 낮고 잎의 길이가 짧았으며 포복경이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

VI. 참고 문헌

- Altpeter F, Baisakh N, Beachy R, Bock R, Capell T, Christou P, Daniell H, Datta K, Datta S, Dix PJ, Fauquet C, Huang N, Kohil A, Mooibroek A, Nicholson L, nguyen TT, Nugent G, Raemakers K, Romano A, Somers DA, Stoger E, Taylor N, Visser R (2005) Particle bombardment and the genetic enhancement of crop: myths and realities. *Molecular Breeding* 15: 305-327
- Gastanaduy A, Cordano A, Graham GG (1990) Acceptability, tolerance, and nutritional value of a rice-based infant formula. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 11: 240 -246.
- Chai B, Sticklen M B (1998) Applications of biotechnology in turfgrass genetic improvement. *Crop Sci.* 38: 1320-1338.
- Cheng M, Fry J E, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan Y (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 115: 971-980.
- Choi HI, Hong JH, Ha JO, Kang JY, Kim SY (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *Biol Chem* 275: 1723-1730
- Chong DK, Langridge WH (2000) Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants, *Transgenic Res.* 9: 71-78
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sin* 18: 659-668

- Dalton SJ, Bettany AJE, Timms E, Morris P (1995) The effect of selection pressure on transformation frequency and copy number in transgenic plants of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.)
- De Cleene M, Deley J (1976) The host range of crown gall. Bot. Rev. 42: 389–466.
- Dong J, Teng W, Buchholz WG, Hall T C (1996) *Agrobacterium* –mediated transformation of Javanica rice. Mol. Breeding 2: 267–276.
- Enkhchimeg V, Bae TW, Riu KZ, Kim SY, Lee HY (2005) Overexpression of Arabidopsis ABF3 gene enhances tolerance to drought and cold in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.). Plant Cell Tissue Organ Cult 83: 41–50
- Enkhchimeg V, Bae TW, Riu KZ, Yun PY, Park SY, Lee CH, Kim SY, Lee HY (2006) Transgenic *Agrostis mongolica* Roshev. With enhanced tolerance to drought and heat stresses obtained for *Agrobacterium*–mediated transformation. Plant Cell Tiss Organ Cult 87: 109–120
- Ge Y, Norton T, Wang ZY (2006) Transgenic zoysiagrass (*Zoysia japonica*) plants obtained by *Agrobacterium*–mediated transformation. Plant cell Rep 25: 792–798
- Godwin I, Todd G, Ford-Lloyd B, Newbury J (1990) The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacteriu*–mediated transformation vary according to plant species. Plant Cell Reports 9: 671–675
- Riva GA, González-cabrera J, Vázquez-Padrón R, Ayra-Pardo (1998) *Agrobaterium tumefaciencie*: a natural tool for transformation. Electronic Journal of Biotechnology 3: 118–133

- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6: 271–282.
- Inokuma C, Sugiura K, Cho C, Okawara R, Kaneko S (1996) Plant regeneration from protoplasts of Japanese lawngress. *Plant Cell Rep.* 15: 737–741.
- Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T. (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol* 14: 745–750
- Jagro-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104–106
- Jordan ET, Hatfield PM, Hondred D, Talon M, Zeevaart JA, and Vierstra RD (1995) Phytochrome A overexpression in transgenic tobacco. Correlation of dwarf phenotype with high concentrations of phytochrome in vascular tissue and attenuated gibberellin levels. *Plant Physiol* . 107: 797–805
- Kang JY, Choi HI, Im MY, Kim SY (2002) *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling *Plant Cell* 14: 343–357
- Kim JB, Kang JY, Kim SY (2004a) Over-expression of a transcription factor regulating ABA-responsive gene expression confers multiple stress tolerance. *Plant Biotech J* 2: 459–466
- Kim JI, Kozhukh GV, Song PS. (2002) Phytochrome-mediated signal transduction pathways in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298: 457–463

- Kim JI, Shen Y, Han YJ, Park JE, Kirchenbauer D, Soh MS, Nagy F, Schäfer E, Song PS (2004b) Phytochrome phosphorylation modulates light signaling by influencing the protein-protein interaction. *The Plant Cell* 16: 2629-2640
- Kumria K, Waie B, Rajam MV (2001) Plant regeneration from transformed embryogenic callus of an elite indica rice via *Agrobacterium*. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 67: 63-71
- Lee HY, Lee CH, Kim HI, Han WD, Choi JE, Kim JH, Lim YP (1998) Development of bialaphos-resistant transgenic rice using *Agrobacterium tumefaciens*. *Korean Society of Plant Tissue Culture* 25: 285-288
- Lee, L. (1996) Turfgrass biotechnology. *Plant Sci*: 115, 1-8
- Leung J, Giraudat J (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 199-222
- Li L, Qu R (2004) Development of highly regenerable callus lines and biolistic transformation of turf-type common bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.]. *Plant Cell Rep* 22:403-407
- Li L, Jia Y, Hou Q, Charles TC, Nester EW, Pan SQ (2002) A global pH sensor: *Agrobacterium* sensor protein ChvG regulates acid-inducible genes on its two chromosome and ti plasmid. *PNAS* 99: 12369-12374
- Liu YG, Mitukawa M, Oosumi T (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA junctions by thermal asymmetric interlacted PCR. *Plant J.* 8:457-463
- Lönnerdal B, Iyer S (1995) Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annus. Rev. Nutr* 15: 93-110

- Luo H, Hu Q, Nelson K, Longo C, Kausch AP, Chandlee JM, Wipff JK, Fricker CR (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) transformation using phosphinothricin selection results in a high frequency of single-copy transgene integration. *Plant Cell Rep* 22: 645–652
- Kusano M, Toyama K, Bae CH, Riu KZ, Lee HY (2003) Plant regeneration and transformation of kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) via the plant tissue culture *Korean J. Plant Biothech* 30: 115–121
- Mitra A, Zhang Z, (1994) Expression of human lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial proteins. *Plant Physiol.* 106: 977–981
- Mullis KB, Faloona FA (1982) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed reaction. *Method Enzymol* 155: 335–350
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497
- Oh SJ, Song SI, Kim YS, Jang HJ, Kim SY, Kim M, Kim YK, Nahm BH, Kim JK (2005) *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiol* 138:341–351
- Salmon V, legrand D, Georges B, Slomianny MC, Coddeville B. Spik G, (1997) Expression and characterization of human lactoferrin production in the Baculovirus expression system. *Protein Express. Purif.* 9: 203–210
- Salmon V, Legrand D, Slomianny MC, Yazidi IE, Spik G, Gruber V, Bournat P, Olganier B, Mison D, Theisen M, Merot B (1998) Production of human lactoferrin in transgenic tobacco plants. *Protein Expression and Purification* 13: 127–135

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Santarem E R, Trick H N, Essig JS, Finer JJ (1998) Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Rep.* 17: 752-759.
- Smith H (2000) Phytochrome and light signal perception by plants – an emerging system. *Nature* 407: 585-591
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517
- Stachel SE, Messens E, Van Montagu M, Zambryski P (1985) Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318: 624-629.
- Toyama K, Bae CH, Kang JG, Lim YP, Adachi T, Riu KZ, Song PS, Lee HY (2003) Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol Cells* 16:19-27
- Toyama K, Bae CH, Seo MS, Song IJ, Lim YP, Song PS, Lee HY (2002) Overcoming of barriers to transformation in monocot plants. *Journal of Plant Biotechnology* 4: 135-141
- The rice full-length cDNA consortium (2003) Collection, mapping, and annotation of over 28,000cDNA clones from japonica rice *Science* 301: 376-379

- Park JI, Lee YK, Chung WI, Lee IH, Choi JH, Lee WM, Ezura H, Lee SP, Kim IJ (2006) Modification of sugar composition in strawberry fruit by antisense suppression of an ADP-glucose pyrophosphorylase. *Molecular Breeding* 17: 269-279
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:11632-11637
- Salmon V, Legrand D, Slomianny MC, Yazidi EI, Spik G, Gruber V, Bournat P, Olganier B, Mison D, Theisen M, Merot B (1998) Production of human lactoferrin in transgenic tobacco plants. *Protein Exp. Purif.* 13 127-135.
- Yu TT, Skinner DZ, Liang GH, Trick HN, Huang B, Muthukrishnan S (2000) Agrobacterium-mediated transformation of creeping bentgrass using GFP as a reporter gene. *Hereditas* 133:229-233
- Zeevaart JAD, Creelam RA (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annus. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 39: 439-473

감사의 글

본 논문을 위해서 끝까지 정확한 지도를 해주시고, 연구만이 아닌 한국에서의 생활에 대해 많은 배려와 지원을 해주신 지도 교수인 이효연 교수님께 감사의 마음을 전합니다. 또, 학문적인 면뿐만 아니라 많은 배려를 해주신 심사 위원인 류기중 교수님, 김인중 교수님, 그리고 제주대학교 농화학과 교수님들께도 감사드립니다. 본 연구에 사용한 유전자를 제공해주시고 기술적인 지원, 조언을 해 주신 제주대학교 송필순 교수님, 전남대학교 김정일 교수님, 한림대학교 임성렬 교수님께 감사드립니다. 또한 한국 유학 기회를 주신 순천대학교의 교수님들과 유학 후에도 따뜻하게 격려해 주신 오사카부립대학 아다치 타이지 명예교수님, 오사카부립대학 농학부 하라다 지로우 교수님, 다이몬 히로유키 교수님께 깊이 감사드리겠습니다. 저의 변변치 않은 한국어에도 불구하고 많은 이야기를 나누 연구실의 윤필용 박사님, 신윤희 선배님, 부경환 선배님, Chandrasekhar 박사님, 배태웅 선배님, 이도승 선배님, 최수정 선생님, Enkhichimeg V. 박사님, 고미영 선생님, 송인자 박사님, 서미숙 박사님, Pam Chi Hoa, Burenjargal, 오성은, 전영주, 양대화, 장경인, 양성년, 우종수, 강지연, 고승희, 강은주, 김해든과 그 외 많은 선배님과 후배들, 그리고 이은아를 비롯한 나에게 한국에 대해서 많은 것을 가르쳐 준 친구들에게 진심으로 감사드립니다. 마지막으로 오랜 세월을 걸친 유학 생활을 지지해 준 가족에게 감사를 전합니다.

本論文のために最後まで的確な指導をして下さり、研究だけではなく韓国での生活において多くの配慮、支援をして下さった指導教授である李孝淵教授に多大な感謝の気持ちを捧げます。また、学問的な面だけにとどまらず多くのご配慮をいただいた審査委員の柳基中教授、金仁中教授を始めとする済州大学 農化学科の先生方に謝意を示すとともに、本研究に使用した遺伝子の提供や技術的な支援、助言をして下さった済州大学 宋必淳教授 全南大学 金楨一教授、翰林大学 林成烈教授に御礼申し上げます。さらに韓国留学の機会をいただいた順天大学の先生方、留学後も暖かく激励し続けて下さった大阪府立大学 足立泰二 名誉教授、大阪府立大学 農学部 原田二郎教授、大門弘幸教授に深く感謝いたします。私の拙い韓国語にもかかわらず多くのことを語り合った 済州大学 生命工学部植物生命工学研究室の尹弼勇博士、申潤浩先輩、夫景渙先輩、Chandrasekher 博士、裴泰雄先輩、李道昇先輩、崔秀禎先生、Enkhichimeg V. 博士、宋仁子博士、徐美淑博士、高美英先生、Pam Chi Hoa、Burenjargal、呉星恩、田英珠、金大化、宋譚永、張慶仁、梁成年、禹宗受、姜知研、高承希、姜垠朱、金ヘドゥン その他多くの先輩、後輩達、李銀娥を始め私に韓国について多くのことを教えてくれた友人に心から感謝します。最後に長年にわたる留學生活を支えてくれた家族に深く感謝します。