

碩士學位論文

환경 스트레스 내성 잔디의 개발



濟州大學校 大學院

農化學科

田 英 珠

2009年 12月

환경 스트레스 내성 잔디의 개발

指導教授 李 孝 淵

田 英 珠

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

田英珠의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 임 평 옥 (印)

 委員 이 효 연 (印)

 委員 김 인 중 (印)

濟州大學校 大學院

2009年 12月

목 차

요 약	i
표 차례	iv
그림 차례	v
약어	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
식물 재료	5
형질전환에 사용한 <i>Agrobacterium</i> 균주 및 binary vector	5
<i>Agrobacterium</i> 감염	5
<i>Agrobacterium</i> 제거	5
Shoot 유도 및 형질전환 식물체의 선발	6
형질전환 식물의 PCR 분석	6
RT-PCR 분석	7
형질전환 식물체의 건조 저항성 테스트	7
형질전환 식물체의 염 저항성 테스트	8
III. 결과 및 고찰	9
몽고잔디의 <i>Agrobacterium</i> -매개 형질전환	9
형질전환 식물체의 <i>AtSIZ</i> gene의 삽입 및 발현 분석	10
형질전환 식물체의 건조 및 NaCl 스트레스 저항성	11
참고문헌	29
감사의 글	37

요 약

잔디는 축구장, 골프장, 공원 등의 레저 시설뿐만 아니라 도로 주변, 묘지, 하천 제방 등의 피복용으로, 그리고 주택 등의 조경용으로, 그 이용 범위는 광범위하여 매우 높은 경제성을 띠므로 점차 재배면적이 증가하고 있는 추세이다. 몽고잔디와 같은 한지형 잔디는 영양번식 식물로 다른 식물에 비해 단시간에 대량번식이 가능하며, 답압이 지속적으로 가해지는 골프장, 축구 경기장 등 스포츠 그라운드에서도 생육이 우수하다. 또한 우리나라 중부 지방에서 녹화 기간이 약 10개월 이상 지속되기 때문에 외부 공간을 연중 푸르게 조성할 수 있는 장점이 있는 잔디 초종이다.

Agrostis mongolica Roshev.는 한지형 잔디인 크리핑 벤트그래스(*Agrostis stolonifera*)와 유전적으로 매우 유연하며 생육적온이 15~25℃로 고밀도로 성장하며, 질감이 곱고 빠른 생육을 한다는 장점이 있다. 그러나 건조에 견디는 능력이 낮고, 빠른 생육으로 인해 잦은 물주기와 잔디 깎기가 필요하며 잡초에 대한 경쟁력이 낮아 제초제 또한 많이 요구되는 등 관리를 위한 비용과 인력 요구도가 매우 높은 작물이다. 교배를 통한 전통적인 육종 방법으로 건조와 같은 환경스트레스에 대한 저항성을 획득하거나 잡초 방제에 효과적인 형질을 얻는 데는 시간과 노력이 많이 소요되므로 유전자 형질전환을 통한 식물의 분자유종법은 몽고잔디의 취약 형질을 효과적으로 개선할 수 있는 좋은 수단이 될 것으로 기대되고 있다.

전형적인 CCCH형 zinc finger protein을 암호화하는 유전자 *AtSZF1*과 *AtSZF2* (salt-inducible zinc finger)는 애기장대에서 염 스트레스에 의해 mRNA 전사체 수준이 크게 증가하며, 과발현 시 고염에 대한 내성이 크게 증가된 것으로 보고된 바 있다. 본 연구에서는 모델식물에서 유용성이 확인된 애기장대 *AtSZF* 유전자와 선발마커로 *bar* 유전자를 *Agrostis mongolica* Roshev.에 도입하여 환경스트레스에 대한 내성 및 비선택성 제초제 저항성 잔디를 개발하고자 하였다.

형질전환 잔디를 제조하기 위하여 *AtSIZ1*(*Arabidopsis thaliana*

Stress-Induced Zinc finger) 유전자를 포함하는 *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 strain을 *Agrostis mongolica* Roshev. 의 성숙종자에서 유래한 배발생 캘러스에 감염시켰다. 공동배양 후 감염시킨 캘러스는 재분화 및 선발을 위해 1 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L의 phosphinothricin이 포함된 배지에서 단계별로 선발하였으며, 선발된 식물체는 PAT protein detection kit를 사용하여 2차 선발하였다. 선발된 식물체는 genomic-PCR을 수행하여 유전자의 도입을 확인하였으며, RT-PCR을 통해 *AtSIZ* 유전자의 발현을 확인하였다.

유전자 도입과 발현이 확인된 형질전환식물과 야생형 식물은 건조 및 고염에 대한 반응을 분석하기 위해 화분으로 옮긴 후 3주 간 순화시켰다. 건조에 대한 내성을 분석하기 위해 야생형과 형질전환식물 모두 물을 주지 않고 7일 간격으로 한 달간 관찰한 결과, 야생형은 건조 조건 처리 후 21일 째 되는 날에 완전히 고사한 반면 형질전환식물체 (4, 9, 10 lines)들은 건조 처리 후 28일 째에도 생존을 확인할 수 있었다. 건조 조건에서 식물들의 증식 여부를 조사하기 위해 분얼 수를 측정된 결과, 야생형과 형질전환 식물 line 5는 건조처리 후 14일 째까지 증식하다 21일 째에서 고사한데 반해 형질전환식물 line 4, 9, 10은 21일 째까지 정상적으로 증식하다 이후부터 증식이 더더짐을 확인하였다. 건조에 대한 각 식물들의 반응을 정량적으로 분석하기 위해 각 식물체 잎의 수분 함량과 엽록소 함량을 측정하였다. 그 결과, 야생형은 건조처리 14일 이후부터 수분함량 및 엽록소 함량이 급감한데 반해 형질전환식물에서는 수분함량 및 엽록소 함량의 감소가 야생형에 비해 현저하게 적은 것을 확인할 수 있었다.

형질전환식물체들의 염 저항성을 조사하기 위해 야생형과 각 형질전환 식물 line을 증식한 후 여러 NaCl 농도 (0, 100, 200, 300, 500 mM)에서 처리하여 각 처리구의 식물체의 변화를 7일 간격으로 한 달간 관찰하였다. 그 결과, 처리 후 7일 째 되는 날에 고농도 (500 mM)의 처리구에서는 야생형과 일부 형질전환 식물 line들의 잎의 고사가 관찰되었고, 처리 후 14일 째에는 100 mM NaCl 처리구에서도 야생형의 잎에서 고사가 진행되고 있음이 확인되었다. 처리 후 21일 째에는 300 및 500 mM NaCl 처리구에서 전체 식물체의 잎 고사가 확인되었다. 건조처리 하여 한 달이 지난 후에는 100 mM 처리구에서도 야생형은 완전히 고사되었지만 형질전환식물 line에 있어서는 200 mM NaCl 처리구에서도 생존

함을 확인하였다. 이들 결과에서, 애기장대 유래의 *AtSIZ/AtSZF2* 유전자를 도입/발현 시킨 형질전환 몽골리안 벤투그래스는 야생형의 식물에 비해 건조와 염에 대한 저항성이 증진되었음이 확인 되었다.



표 차례

Table 1. *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency for *A. mongolica*



그림 차례

- Fig. 1. Transcriptional regulatory networks of abiotic stress signals and gene expression
- Fig. 2. T-DNA construct of binary vector plasmid pNB96
- Fig. 3. Procedures of *Agrobacterium*-mediated transformation
- Fig. 4. Production of *AtSIZ*-transgenic *Agrostis mongolica* Roshev.
- Fig. 5. PCR analysis of *AtSIZ* gene in transgenic and wild-type *Agrostis mongolica* Roshev. plants.
- Fig. 6. RT-PCR analysis of *AtSIZ* and 18S rRNA gene in transgenic and wild-type *Agrostis mongolica* Roshev. plants.
- Fig. 7. The morphological phenotype of the transgenic and wild-type plants after stop-watering.
- Fig. 8. Tiller number of wild-type and transgenic plants under drought test
- Fig. 9. Water content of wild-type and transgenic plants under drought test
- Fig. 10. Total chlorophyll content of wild-type and transgenic plants under drought test.
- Fig. 11. High-salt tolerance of transgenic plants containing *AtSIZ*.
- Fig. 12. Total chlorophyll content of wild-type and transgenic plants under salt stress.

약어

ABRE	ABA-responsive element
ABA	Abscisic acid
ABF	ABRE-binding factor
AREB	ABRE-binding protein
AtSIZ	<i>Arabidopsis thaliana</i> stress inducible zinc finger
bp	Base pair(s)
CaMV	Cauliflower mosaic virus
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide
cDNA	Complementary DNA
CRT	C-repeat
CBF	C-repeat-binding factor
DREs	Dehydration- or salt stress-responsive elements
DREB	DRE-binding protein
EtBr	Ethidium bromide
kb	Kilo base pair(s)
mRNA	Messenger RNA
mg	Milligram
mM	Millimolar
<i>npt II</i>	Neomycine phosphotransferase II
NOS	Nopaline synthase
PPT	Phosphinothricin
PCR	Polymerase chain reaction
RT-PCR	Reverse transcription-PCR
rpm	Revolution time
NaCl	Sodium chloride
T-DNA	Transfer DNA

I. 서론

높은 염 농도와 가뭄 등에 의한 스트레스는 식물의 성장을 저해하여 많은 중요한 농업 분야에서 수확물의 생산성을 제한하는 요소 중 하나이며 전 세계적으로 농업분야는 심각한 환경 스트레스에 직면해 있다(Zhu, 2002, Ma et al., 2006). 식물의 생산성을 높이기 위해서는 이러한 다양한 환경 스트레스에 내성이 강한 새로운 작물의 개발이 필수적이다. 또한 고농도의 나트륨 이온은 세포내 대사와 이온의 항상성을 저해하기 때문에 식물에 유독하다는 증거가 늘어나고 있는 실정이다(Zhu, 2001, Zhu, 2002, Zhu, 2003). 고착생활은 식물의 가장 중요하고 뚜렷한 특성 중 하나이기도 하지만 환경적인 변화를 견뎌야 한다는 걸 의미하기도 한다. 식물은 건조 및 고염에 대한 적응 반응을 해왔으며 분자적, 세포적 수준에서만뿐만 아니라 형태적, 생화학적 수준에서도 적응 반응을 해야 살아남을 수 있다(Hasegawa et al., 2000, Zhu, 2002). 삼투 스트레스 적응기작을 이해하기 위해 특정한 스트레스에 의해 발현이 유도되는 다수의 유전자들이 분리되었고, 그 특성이 광범위하게 연구되었다. 그 결과, 삼투 스트레스 반응 유전자의 발현을 유도하는 다양한 신호전달 체계가 존재하며 이러한 신호전달 체계는 ABA-의존성 또는 ABA-비의존성 경로를 포함하고 어떤 신호전달 경로는 추위, 고염 및 탈수와 같은 모든 삼투 스트레스 조건에서 공통적으로 작용한다는 것이 밝혀졌다(Knight and Knight, 2001, Zhu, 2002, Shinozaki et al., 2003). ABA는 고염 및 건조 등에 대한 식물의 적응 반응 및 조절 과정에서 중요한 역할을 하며(Zhu, 2001, Zhu, 2002), 스트레스 조건 하에서 ABA-의존적 이거나 ABA-비의존적 경로를 통해 식물 내의 많은 유전자들이 전사수준에서 유도된다(Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000, Xiong et al., 2002, Zhu, 2002, Shinozaki et al., 2003). 이러한 유전자들의 산물들은 식물이 스트레스에 견디게 하는 역할 뿐만 아니라 스트레스 반응에서 유전자의 발현과 신호 변환을 조절하는 기능을 한다(Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006).

최근에는 애기장대를 이용한 연구에서 스트레스에 의해 유도되는 유전자 발현에 관여하는 *cis*-와 *trans*-acting factors가 널리 분석되어져 왔고(Zhu, 2002,

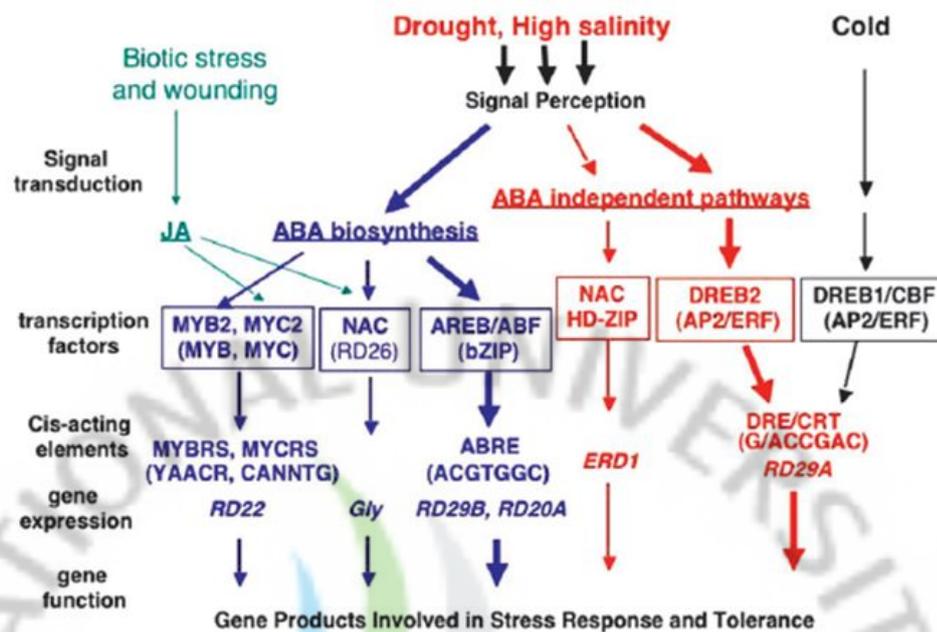


Fig. 1. Transcriptional regulatory networks of abiotic stress signals and gene expression (revised by Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006)

Shinozaki et al., 2003). ABREs (ABA-responsive elements) 와 DREs (dehydration- or salt stress-responsive elements) 는 환경 스트레스에 의해 유도되며 ABA-의존적 유전자와 ABA-비의존적 유전자들의 발현을 조절하는 프로모터 영역에 존재하는 두 개의 주요한 positive *cis*-acting elements 로 알려져 있다(Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994, Shinozaki et al., 2003, Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2005). *RD29A*와 같은 ABA-반응 marker 유전자들은 그들의 프로모터에 DREs 와 ABREs 영역을 포함하고 있으며 ABA-의존적 경로와 ABA-비의존적 스트레스 반응 경로에 의해 활성화될 수 있다(Ishitani et al., 1997). ERF/AP2 family transcription factors인 DREB2s (DRE-binding protein 2) 역시 DRE *cis*-acting element를 가지고 있으며, ABA-비의존적 방법으로 염 혹은 건조 스트레스 반응에 대한 유전자 발현을 조절하는 중요한 transcriptional activators 이다(Liu et al., 1998, Nakashima et al., 2000). Basic leucine zipper(bZIP) family의 transcription factors인

AREB/ABF(ABRE-binding protein/factor)와 ABI5는 ABRE cis-acting element에 결합할 수 있으며 ABA-dependent gene expression에 의해 활성화된다(Choi et al., 2000, Finkelstein and Lynch, 2000, Lopez-Molina and Chua, 2000, Uno et al., 2000, Kang et al., 2002). 이와 같이 전사 조절 인자들은 스트레스 적응 반응에서 스트레스에 대한 반응 유전자들의 전사를 활성화하는 중요한 역할을 한다. 또한 최근의 연구에 의하면, 애기장대 계놈 내에 11개의 단백질들이 유사한 CCCH-type zinc finger motif를 가지며(Kim et al., 2008) 이들 유전자들은 CCCH-type zinc finger family의 하위 그룹에 속하는 것으로 알려져 있다. 이러한 유전자들 중 PEI1으로 알려진 유전자는 배발생을 조절하는 것으로 보고된 바 있고, *SZF1*과 *SZF2*은 식물의 염에 대한 반응을 조절하며, *SZF*를 과발현 시킨 애기장대 식물체는 염 저항성이 증진된 것으로 보고되었다(Li and Thomas, 1998, Sun et al., 2007).

Agrostis mongolica Roshev. (*A. mongolica*) 는 포복경으로 증식을 하며 크리핑 벤투그래스와 유전적으로 유연한 관계에 있는 식물이다(Vergara and Bughrara, 2003). 이 식물은 몽고 내에서 중요한 풍토성 벤투그래스이며, 골프 코스, 정원, 독 방제용으로 널리 사용된다. 다른 많은 벤투그래스 종과 마찬가지로, *A. mongolica* 는 생육적온이 15~25°C 정도로 고밀도로 성장하며 부드러운 감촉, 밝은 녹색, 빠른 생육을 장점으로 꼽을 수 있다. 그러나 건조하고 뜨거운 기후에서는 생육이 정지하고 상해를 입거나 심지어는 죽을 수도 있는 단점이 있다. 또한 빠른 생육으로 인해, 매일 물주기를 해야 하며 주기적으로 살충제 및 살균제를 뿌려줘야 한다. 또한 잡초에 대한 경쟁력이 매우 낮아 잡초 방제를 위한 제초제 살포량도 많아 환경오염을 유발할 수 있으며, 관리를 위한 비용 및 인력 요구도가 매우 높은 작물이다. 교배를 통한 전통적인 육종 방법으로 환경 스트레스에 대한 저항성을 획득하거나 잡초 방제에 효과적인 형질을 얻는 데는 시간과 노력이 많이 소요되므로 유전자 형질전환을 통한 식물의 분자육종법은 몽고잔디의 취약 형질을 효과적으로 개선할 수 있는 좋은 수단이 될 것으로 기대되고 있다.

그러므로 본 연구에서는 애기장대 유래의 *AtSIZ/AtSZF2* 유전자를 도입하여 건조 및 염 스트레스에 대한 내성이 증진된 형질전환 잔디를 제조함과 동시에

선발 마커로 *bar* 유전자를 사용하여 비선택성 제초제에 대한 내성을 갖고 있는 잔디를 개발하여 관리 및 인력 요구도가 낮은 잔디를 개발하는 것을 목적으로 하였다.



II. 재료 및 방법

식물 재료

몽고잔디(*A. mongolica*)의 배발생 캘러스 증식 및 식물체 재분화는 이미 보고된 바 있는 방법을 이용하였다(Enkhchimeg et al., 2005). 몽고잔디의 종자에서 유래한 배발생 캘러스는 캘러스 증식 배지에 치상하여 25℃, 암조건에서 2주마다 계대 배양하며 증식시켜 형질전환 실험 재료로 사용하였다.

형질전환에 사용한 *Agrobacterium* 균주 및 binary vector

AtSIZ 유전자 도입에 사용한 vector는 binary vector인 pNB96으로 T-DNA 내부에 dual 35S promoter와 35S terminator 사이에 *AtSIZ* 유전자가 삽입되어 있다. 그 외에 선발 marker로서 비선택성 제초제 저항성을 나타내게 하는 phosphinothricin acetyltransferase gene (*bar*) 유전자가 포함 되어 있다 (Fig. 2).

Agrobacterium 감염

20 ml의 LB 배지에서 O.D.₆₀₀=0.6~0.8 정도로 자란 pNB96이 도입되어 있는 *Agrobacterium*을 원심하여 균을 침전시켜 LB 배지를 제거한 후 100 mg/L의 acetosyringone (3,5-dimethoxy-4-hydroxy-acetophenon, Aldrich)과 20 mg/L의 pluronic F68 이 포함되어 있는 40 ml의 감염배지에 재현탁 한 후 배발생 캘러스를 침적하여 110rpm, 28℃에서 10분 간 감염시켰다. 접종된 캘러스는 멸균된 여과지로 여분의 수분을 제거한 후 공동배양 배지에 치상하여 3~5 일 간 25℃, 암조건에서 배양하였다.

Agrobacterium 제거

공동 배양한 캘러스로부터 *Agrobacterium*을 제거하기 위해서 캘러스를 멸균수로 세정한 후 1000 mg/L cefotaxime이 첨가된 멸균수로 재세정하여 filter paper로 여분의 수분을 제거하였다. 수분을 제거한 캘러스는 250 mg/L

cefotaxime이 첨가된 캘러스 증식 배지에 치상하여 25℃, 암조건에서 1주 간 배양하였다.

Shoot 유도 및 형질전환 식물체의 선발

형질전환 식물체를 재분화 시키기 위해서 1 mg/L의 phosphinothricin이 첨가된 shoot 유도 배지에 *Agrobacterium*이 제거된 캘러스를 치상하고 25℃, 광조건에서 2주 간 배양하였다. 캘러스로부터 유도된 정상적인 shoot를 3 mg/L의 phosphinothricin이 첨가된 shoot 유도 배지에 계대배양하고 식물체의 길이가 5cm 이상 자라면 5 mg/L의 phosphinothricin이 첨가된 root 유도 배지에서 root를 유도하였다. 정상적인 shoot와 root가 유도된 식물체를 토양에 이식하여 온실에서 재배/증식 하였다.

형질전환 식물의 PCR 분석

5 mg/L의 phosphinothricin이 첨가된 root 유도 배지에서 뿌리를 형성한 형질전환 후보체에 *AtSIZ* gene이 도입되었는지를 확인하기 위해 genomic-PCR 분석을 수행하였다. Total genomic DNA는 형질전환 후보체와 야생형 몽고잔디의 잎 조직으로부터 CTAB method (Murray and Thomson 1980)를 이용해 추출하였다. 총 20 μ l의 PCR 반응액에 앞에서 추출한 25 ng genomic DNA, 2mM MgCl₂가 포함된 Taq polymerase buffer, 25 mM dNTP, 1U Taq DNA polymerase(TAKARA, Japan)와 10 pM의 primers를 사용하였다. 약 1.8kb 크기의 *AtSIZ* gene을 증폭하기 위한 primer로는 5' forward primer(5'-TTATGCCACAATCTGCTGCTCAT-3') 와 3' reverse primer(5'-ATGTGCGGTGCAAAGAGCAAC-3')를 사용하였다. PCR 반응은 95℃ 5분 간 pre-denaturation 후 denaturation (95℃, 1분), annealing (60℃, 1분), extension (72℃, 2분) 의 조건에서 35 cycle 수행하였다. 그 후 post elongation은 72℃에서 10분 반응시켰다. PCR 산물은 1% Agarose gel 에서 전기 영동하여 EtBr 염색한 후 밴드를 확인하였다.

RT-PCR 분석

식물의 잎 조직을 미리 액체질소로 냉각된 막자 사발에 넣고 시료가 해동되지 않도록 액체 질소를 부어가며 완전한 분말형태가 될 때까지 분쇄하였다. 분쇄된 잎 조직을 멸균된 1.5 ml tube에 담고 Trizol Reagent(Invitrogen)를 이용하여 제조사의 실험 프로토콜에 따라 total RNA를 추출하였다. First cDNA strand 합성 및 RT-PCR은 Access RT-PCR System (Promega)을 이용하여 제조사의 지시대로 수행하였다. 최종 부피 10 μ l의 반응액은 1 μ g의 total RNA, 1 μ l AMV/Tfl reaction buffer, 1 μ l dNTP mixture, 2 μ l MgCl₂ (25 mM), 1 μ l oligo dT primer, 0.5 μ l RNase inhibitor, 0.4 μ l AMV reverse transcriptase가 포함되도록 제조하였다. *AtSIZ* 유전자의 발현 여부를 확인하기 위해 사용한 oligonucleotide primers는 상기의 genomic-PCR에 기술한 set를 사용하였다. Standard control로는 18S rRNA에 특이적인 primer set (5'-ATGATAACTCGACGGATCGC-3'와 5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3')를 사용하였다. PCR은 상기의 genomic-PCR부분에 기술한 조건과 동일하게 수행하였으며, 1% agarose gel에서 전기영동하여 밴드를 확인하였다.

형질전환 식물체의 건조 저항성 테스트

3개월령의 형질전환식물과 야생형 식물체를 온실에서 일주일에 2회씩 물을 주며 약 3주간 재배/증식 한 후 물 공급을 중단하여 건조 저항성 테스트를 수행하였다. 25±3°C, 상대습도 60±10%, 18시간의 광주기로 조절되는 온실에서 물 공급 중단 후부터 28일간 식물체의 변화를 관찰하였다. 건조 조건에서 식물체의 증식정도를 확인하기 위해 각 식물체의 tiller number를 일주일 간격으로 측정하였다. 형질전환체와 야생형 식물체 잎의 수분함량을 조사하기 위해, 이미 보고된 바 있는 Hsieh et al.(2002)의 방법에 따라, 일주일 간격으로 각 식물체로부터 5장의 잎을 채취하여 중량을 측정한 후 각 샘플을 80°C에서 72시간 건조시킨 후 건조 중량을 측정하여 각 식물의 수분함량을 조사하였다. 엽록소 함량을 조사하기 위해 일주일 간격으로 각 식물체로부터 3장의 잎을 채취하여 2.5 mM의 sodium phosphate가 첨가된 80% acetone 수용액에 침지한 후 Porr et al.

(1989)에 기술된 방식으로 측정/계산하였다.

형질전환 식물체의 염 저항성 테스트

3개월령의 형질전환식물과 야생형 식물체를 온실에서 일주일에 2회씩 물을 주며 약 3주간 재배/증식 한 후 염 저항성 테스트를 수행하였다. $25\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대 습도 $60\pm 10\%$, 18시간의 광주기로 조절되는 온실에서 NaCl 농도가 각각 0, 100, 200, 300, 500 mM이 되게 희석한 물 2L에 각 식물체 화분을 침지한 후 일주일 간격으로 tiller 수와 잎의 수분 함량, 엽록소 함량을 측정하였다.



III. 결과 및 고찰

몽고잔디의 *Agrobacterium*-매개 형질전환

몽고잔디(*A. mongolica*)의 배발생 캘러스를 이용한 *Agrobacterium* 매개 형질전환 방법은 이미 보고된 바 있는 방법을 이용하였다(Enkhchimeg et al., 2005). 약 1600개의 배발생 캘러스에 *AtSIZ* gene을 포함하고 있는 *A. tumefaciens*를 감염시켜 공동배양 및 균 제거 과정을 거쳤다(Fig. 3). 감염시킨 캘러스를 1~5 mg/L PPT가 포함되어 있는 선발 배지에 치상한 동안, PPT-resistant 캘러스는 초록색을 띠고 multiple shoots를 형성하며 증식하였다. 반면에 PPT-sensitive 캘러스는 암갈색을 띠며 고사하였다(Fig. 4. A). 본 실험에서는 선발 마커로 제초제 저항성 유전자인 *bar* gene을 사용하였으므로, 형질전환 효율은 감염시킨 캘러스 수당 만들어진 PPT-resistant shoots수로 계산하였다(Table 1.). 그 결과, 세 번의 형질전환 실험에 대한 형질전환 효율은 약 12% 정도였으며, 이러한 효율은 기존에 벤투그래스의 *Agrobacterium* 매개 형질전환 효율 7.4% (Yu et al., 2000), 36.7% (Chai et al., 2004), 36.2% (Luo et al., 2004), 19.4% (Han et al., 2005) 등에 비해 조금 낮았다. 이는 동일한 식물 캘러스를 사용한 Enkhchimeg et al.(2005)의 보고에 비해서도 낮은 수치인데, 이는 선발마커로 사용한 PPT에 대한 캘러스의 민감성이 hygromycin보다 높기 때문일 것으로 예상된다. ABA 합성에 관여하는 *VuNCED1* 유전자를 *Agrobacterium* 매개로 형질전환한 이전 연구에서도 벤투그래스(*Agrostis palustris* L.) 캘러스가 PPT에 민감하여 배지에 10 mg/L만 첨가하여도 증식이 억제되며, 20 mg/L PPT가 첨가된 배지에서는 shoot의 재분화가 억제되어 형질전환된 shoot를 얻을 수 없다는 보고(Aswath et al., 2005)가 있다. 또한 단일 transformed cell로부터 callus가 처음 만들어지고, 그 callus로부터 shoot가 재분화될 때 non-transformed buds가 transformed cell의 옆에 형성될 수 있으며 transformed cell을 보호하거나 nursing 하기 때문에(Orlikowska and Nowak, 1997) 배양하는 동안 escape를 최소화하기 위한 노력이 필요했다. 재

분화 과정에서 PPT-resistant 캘러스는 multiple shoot를 형성하였고(Fig. 4. B) 이들 shoot를 핀셋으로 각각 분리하여 선발한 결과, 같은 캘러스에서 유래한 shoot일지라도 PPT에 대해 저항성을 가지는 것과 저항성을 가지지 않는 것이 존재하였다(Fig. 4. C). 이 결과는 형질전환된 캘러스들은 형질전환 세포와 비형질전환 세포가 공존하는 chimera임을 알 수 있고, 한 callus에서 분화된 shoot들은 각기 독립된 형질전환 식물로 발달할 가능성이 있음을 시사한다. 또한 PPT 선발배지에서 root를 형성한 개체를 PAT detection kit를 사용해 선발 마커의 단백질 수준에서의 발현을 확인한 결과, PAT positive를 나타낸 개체들과 PAT negative를 나타낸 개체들이 공존하였다(Fig. 4. D). 이는 Enkhchimeg et al.(2008)의 보고에서 제시된 바와 같이 선발 마커로 PPT를 사용하여 형질전환을 하였을 경우 escape가 나올 가능성이 높기 때문인 것으로 추정됨과 동시에 각 형질전환 후보체들간의 PAT단백질의 발현정도의 차이에 따른 결과일 가능성도 있을 것으로 생각된다.

형질전환 식물체의 *AtSIZ* gene의 삽입 및 발현 분석

Dual 35S promoter의 조절 하에 있는 애기장대 유래의 *AtSIZ* gene을 몽고 잔디에 도입하였다. 형질전환 식물체의 genomic DNA 내부에 *AtSIZ* gene이 삽입되었는지 확인하기 위해 PPT로 1차 선발된 식물체 중 PAT-positive 인 개체들의 genomic-PCR을 수행하였다. PCR 산물을 전기영동을 한 결과, 모든 형질전환 식물체에서 1.8 kb의 *AtSIZ* 밴드가 검출된 반면 야생형 식물체에서는 밴드가 검출되지 않았다(Fig. 5). 이 결과 PAT-positive인 형질전환 식물체에는 *AtSIZ* gene이 도입되어 있음을 알 수 있었다. 또한 삽입된 *AtSIZ* gene의 발현을 확인하기 위해 RT-PCR 분석을 수행하였다. 정상 조건에서 키운 야생형과 형질전환 식물체의 잎에서 추출한 total RNA를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과, internal control로 사용한 18S rRNA는 형질전환체와 야생형에서 유사하게 발현한 반면, *AtSIZ* gene은 야생형 식물체에서는 발현되지 않고(Fig. 6 WT lane) 형질전환 식물체들에서는 발현하고 있음(Fig. 6, lane A, 1~11)을 확인할 수 있었다.

형질전환 식물체의 건조 및 NaCl 스트레스 저항성

AtSIZ gene의 발현이 형질전환체의 건조 저항성에 영향을 미치는지 알아보기 위해 형질전환 식물체와 야생형 식물체를 정상 조건에서 3개월 간 키운 후, 건조와 염 스트레스 조건에 노출시켰다. 스트레스가 없는 조건에서는 이들 식물체의 생육 및 발달은 차이를 보이지 않았다. 이들 식물체의 건조 저항성을 비교하기 위해 한 달간 물을 주지 않은 채 7일 간격으로 관찰한 결과, control로 사용한 야생형과 형질전환체 5번 line은 처리 후 14일째 되는 날부터 잎의 고사가 시작되었으며(Fig. 7. C) 21일이 지나자 완전히 고사했다(Fig. 7. D). 반면 형질전환체 11번 line은 처리 후 한 달이 되자 고사하였으며(Fig. 7. E), 다른 형질전환 식물체 line 4, 9, 10번은 처리 후 한 달이 지난 후에도 여전히 생존함을 관찰할 수 있었다(Fig. 7. E). 건조 조건에서 식물들의 증식 여부를 조사하기 위해 분얼 수를 측정한 결과, 야생형과 형질전환 식물 line 5는 건조처리 후 14일째까지 증식하다 21일째에서 고사한데 반해 형질전환식물 line 4, 9, 10은 21일째까지 정상적으로 증식하다 이후부터 증식이 더디짐을 확인하였다(Fig. 8.). 건조 처리한 식물체의 생리적인 변화를 분석하기 위해 잎의 수분함량과 엽록소 함량을 조사하였다. 그 결과, 야생형의 수분 함량 및 엽록소 함량은 급격히 감소한 반면 형질전환체 line들의 수분 함량 및 엽록소 함량은 천천히 감소하였다(Fig. 9, 10). 이들 결과에서 *AtSIZ* 가 도입된 형질전환 잔디는 야생형에 비해 건조 스트레스에 대한 저항성이 증진되었음이 확인되었다.

또한 형질전환 잔디의 염 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위해 야생형과 각 형질전환 식물line들에 NaCl을 0, 100, 200, 300, 500 mM의 농도로 처리하고 한 달간 식물체들의 변화를 관찰/조사하였다. 그 결과 염 처리 후 7일이 지나자 고농도의 NaCl 처리구에서는 야생형뿐만 아니라 형질전환 식물 line 1, 2번에서도 잎의 고사가 관찰되었다(Fig. 11. B). 처리 14일 후에는 100 mM의 NaCl 처리구에서 야생형 식물체의 잎의 고사가 보였으며 (Fig. 11. C) 21일 후에는 300 mM과 500 mM NaCl 처리구 각각에서 야생형과 형질전환 식물이 모두 고사하였다(Fig. 11. D). 200 mM NaCl 처리 후 28일이 지난 식물체들의 염 저항성을 비교한 결과, 야생형 잔디는 고사하였으나 형질전환 식물 line 4, 5, 9

번은 여전히 생존/증식하고 있음이 관찰되었다(Fig. 11. E). NaCl 스트레스 처리 후 야생형 잔디와 형질전환 잔디의 수분함량과 엽록소 함량을 측정한 결과, 건조 스트레스 처리 후의 결과와 같이 야생형 잔디의 수분 함량과 엽록소 함량은 급격히 감소하였으나 형질전환식물 line들에서는 수분 및 엽록소 함량이 천천히 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 12). 이들 결과에서 *AtSIZ* 형질전환 식물들은 야생형식물체보다 염 스트레스에 대한 저항성이 향상되었음을 알 수 있었다. 이는 *AtSIZ/AtSZF2*를 과발현시킨 애기장대가 염에 대한 저항성이 높아졌다는 보고(Sun et al., 2007)와 일치하는 결과이다.

애기장대 유래의 *AtSIZ* gene을 도입한 형질전환 잔디line의 건조 및 염 스트레스 저항성을 조사한 결과, *AtSIZ/AtSZF* gene을 과발현시킨 형질전환 *A. mongolica* 는 건조 뿐만 아니라 염에 대한 저항성도 향상 되었음이 확인되었다.

식물이 주변 환경의 변화에 반응하는 과정에는 많은 유전자들과 생화학적-분자적 기작이 관여하며 유전자의 transcription과 그 하위 유전자들이 활성화되는 등 multiple signaling pathway에 의해 조절된다. 최근에는, 작물의 생산성을 유지 및 증진시키기 위해 이러한 조절 유전자를 식물체 genome 내로 도입하여 환경 스트레스 저항성을 증진시키는 연구가 많이 이루어지고 있다.

DREB(dehydration-responsive transcription factors)와 CBF1(C-repeat binding factors)은 스트레스에 의해 유도되어 DRE와 CRT *cis*-acting element에 결합하는 transcription factor로, Arabidopsis의 CBF1유전자를 과발현한 식물에서 cold-related genes의 발현이 확인되었고, 순화하지 않은 애기장대에서도 freezing tolerance가 증가되었다는 보고가 있다(Jaglo-Ottosen et al., 1998). 또한 같은 family인 CBF3 유전자를 애기장대에서 과발현시킨 결과, freezing tolerance가 증가하였으며, CaMV 35S promoter 와 *RD29A*에서 유래한 DRE-containing promoter의 조절 하에 각각 애기장대에 형질전환시킨 결과, 냉동(freezing), 수분, 염 스트레스에 대한 저항성이 증가했다는 보고들이 있다(Gilmour, S. J. et al., 2000, Kauga, M. et al., 1999, Liu, Q. et al., 1998). 그 외에도 애기장대 CBF3는 담배(Kasuga, M. et al., 2004)와 배추(*Brassica napus*, Jaglo, K. R. et al., 2001, Zhang, J. Z. et al., 2004)에서 과발현 시켰을 때, 애기장대 CBF1은 35S promoter 조절 하에 애기장대(Gilmour, S. J. et

al., 2000, Jaglo-Ottosen et al., 1998), 토마토(Hsieh, T. H. et al., 2002, Hsieh, T. H. et al., 2002, Lee, J. T. et al., 2003), 딸기(Owens, C. L. et al. 2002), 배추(Jahlo, K. R. et al., 2001, Zhang, J. Z. et al., 2004)) 등 쌍자엽 식물에 과발현되었을 때 freezing 및 drought 에 대한 저항성이 증가되었다. 또한 애기장대 유래의 DREB1A/CBF3를 *RD29A* promoter의 조절 하에 단자엽 식물인 wheat(Pellegrineschi, A. et al., 2004), tall fescue(Zhao, J. et al., 2007)에서 과발현된 경우 건조 저항성이 증진된 보고도 있다. 반대로 단자엽 식물인 벼의 OsDREB1A와 옥수수 ZmDREB1은 각각 애기장대에서 과발현되어 건조저항성을 나타내었다(Dubouzet, J. G. et al., 2003, Qin, F. et al., 2004).

bZIP(basic leucine zipper) transcription factor인 ABRE-binding protein(AREB)/ABRE-binding factor(ABF)는 ABA-responsive gene 발현에서 주요한 cis-acting element인 ABRE(ABA-responsive element)에 결합할 수 있고, ABA-dependent gene들의 발현을 활성화시킨다. 애기장대 유래의 AREB2/ABF4의 과발현은 애기장대 식물체의 건조, 염, chilling, freezing, heat 에 대한 저항성을 증진(Kang et al., 2002, Kim, S. et al., 2004)시키고, 애기장대 유래의 ABF3가 과발현된 경우 쌍자엽 식물인 상추(Enkhchimeg et al., 2005)뿐만 아니라 단자엽 식물인 벼(Oh et al., 2005)와 몽고잔디(*Agrostis mongolica*, Enkhchimeg et al., 2006)에서 건조에 대한 저항성이 증진되었다는 보고도 있다.

또한 zinc finger motif를 가진 콩에서 유래한 cold-inducible zinc finger protein SCOF1을 애기장대와 담배에 형질전환한 결과, 저온(cold) stress에 대한 저항성이 증진되었고(Kim et al., 2001), 애기장대 유래의 C2H2 type zinc finger protein인 STZ 역시 애기장대에 과발현시켜 건조 저항성이 증진되었다(Sakamoto, H. et al., 2004)는 보고가 있다. CCCH type zinc finger motif의 분자적 기작은 아직 명확하게 규명되지는 않았으나 식물계에서 가장 잘 알려진 CCCH-type zinc finger protein인 애기장대의 HUA1은 꽃의 생식기관에서 발견되었으며 AG pre-mRNA에 결합하여 processing을 촉진하는 것으로 알려져 있다(Li et al., 2001, Cheng et al., 2003). 또한 벼의 CCCH-type zinc finger protein인 OsDOS는 잎의 노화 지연과 연관되어 있다(Kong et al., 2006). 최근

의 연구에 의하면, 애기장대 genome 내에 유사한 CCCH-type zinc finger motif를 가진 것으로 알려진 11개의 protein 중 SOMNUS는 종자의 발아에 관여하며(Kim et al., 2008), PEI1으로 알려진 유전자는 배발생을 조절하는 것으로 보고된 바 있고, AtSZF1과 AtSZF2은 식물의 염에 대한 반응을 조절한다(Li and Thomas, 1998; Sun et al., 2007).

본 실험에 사용한 *AtSIZ/AtSZF2*는 salt stress에 의해 유도되며, *AtSZF1*과 염기서열상으로 고도의 상동성을 보이고, 발현 패턴의 유사성으로 보아 *AtSZF1*과 마찬가지로 *AtSZF2* 역시 핵에 존재하며 salt stress에 대한 regulator로서 반응에 관여한다(Sun et al., 2007). 그러나 위 보고에서는 애기장대에서 35S::*AtSZF1* 과발현 시켰을 때 염에 대한 저항성만 확인되었고, 건조 반응에 대한 *AtSZF*의 기능에 대한 보고는 없었다. 본 연구에서는 애기장대에서 유래한 *AtSIZ/AtSZF2* gene을 과발현 시킨 형질전환 *A. mongolica*를 제조하였고 이들 형질전환 잔디들은 염 스트레스 뿐만 아니라 건조 스트레스에도 저항성이 증진되었음을 확인하였다. 본 연구의 결과에서 *AtSIZ/AtSZF*는 쌍자엽 식물 뿐만 아니라 단자엽 식물에서도 삼투 스트레스에 대한 저항성을 개선할 목적으로 이용할 수 있음이 시사되었다.

*A. mongolica*의 *Agrobacterium*-매개 형질전환에 대한 이전 보고에는, 몽골리안 벤투그래스는 아열대성인 제주도의 open field에서 5년 간 생육해도 야생형과 형질전환 잔디 모두 임성을 나타내지 않았다고 언급되어 있다. 몽고잔디(*A. mongolica*)가 제주도의 기후에서 불임을 나타내는 것은 제주도의 자연조건이 몽고잔디의 개화에 적합하지 않기 때문일 것이라 추측된다. 몽고잔디는 다른 잔디류와 마찬가지로 무성생식을 통해 빠르게 증식할 수 있으므로 불임이라는 특성이 이 품종을 이용하는데 있어서 단점으로 작용하지는 않을 것이다. 이는 오히려 형질전환 식물에 대한 환경단체들의 반대 이유 중 하나인 화분비산에 의한 유전자의 자연계로의 확산을 근본적으로 차단할 수 있는 장점이 있다고 볼 수 있다. 몽고잔디는 자가 수분을 하고, 풍매성이며, 이중 교배 종(Belanger et al., 2003)이기 때문에 불임이라는 특성은 종내와 종간 교배를 통한 유전자의 이동으로 야기될 수 있는 환경 위해성에 대한 염려도 줄일 수 있다. 그러므로 몽고잔디는 유용유전자 도입을 위한 target 작물로도 유용한 식물이라 할 수 있다.

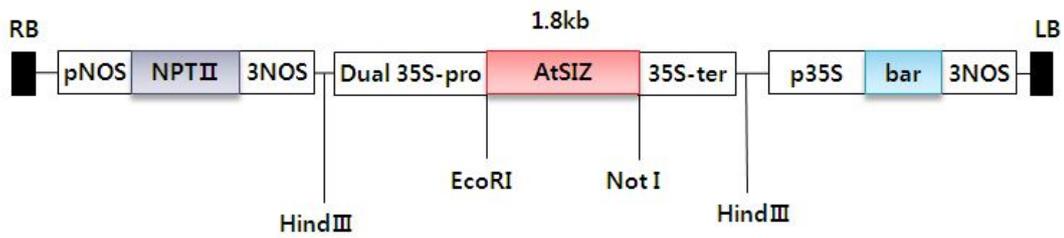


Fig. 2. T-DNA construct of binary vector plasmid pNB96.

RB, right border; LB, left border; pNOS, NOS promoter; 3NOS, NOS terminator; p35s, CaMV 35S promoter; Dual 35D-pro, dual 35S promoter; 35S-ter, CaMV 35S terminator; NPTII, neomycin phosphotransferase II ; bar, phosphinothricin acetyltransferase gene

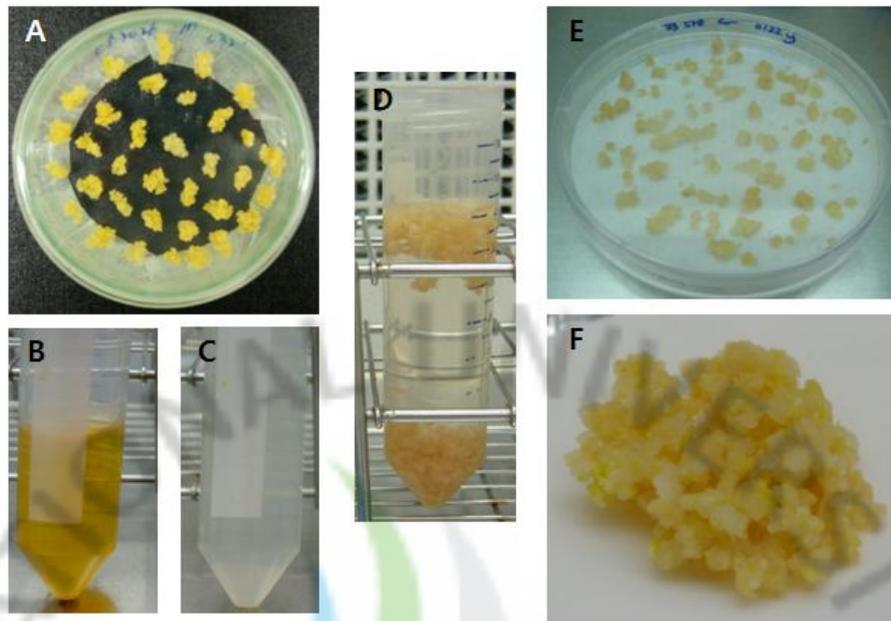


Fig. 3. Procedures of *Agrobacterium*-mediated transformation

A, Pre-cultivation in dark for 3days; B, *Agrobacterium* culture final O.D.₆₀₀=0.3~0.4; C, Re-suspension ; D, Infection; E, Co-cultivation on solid medium in dark for 3~5days; F, *Agrobacterium* elimination

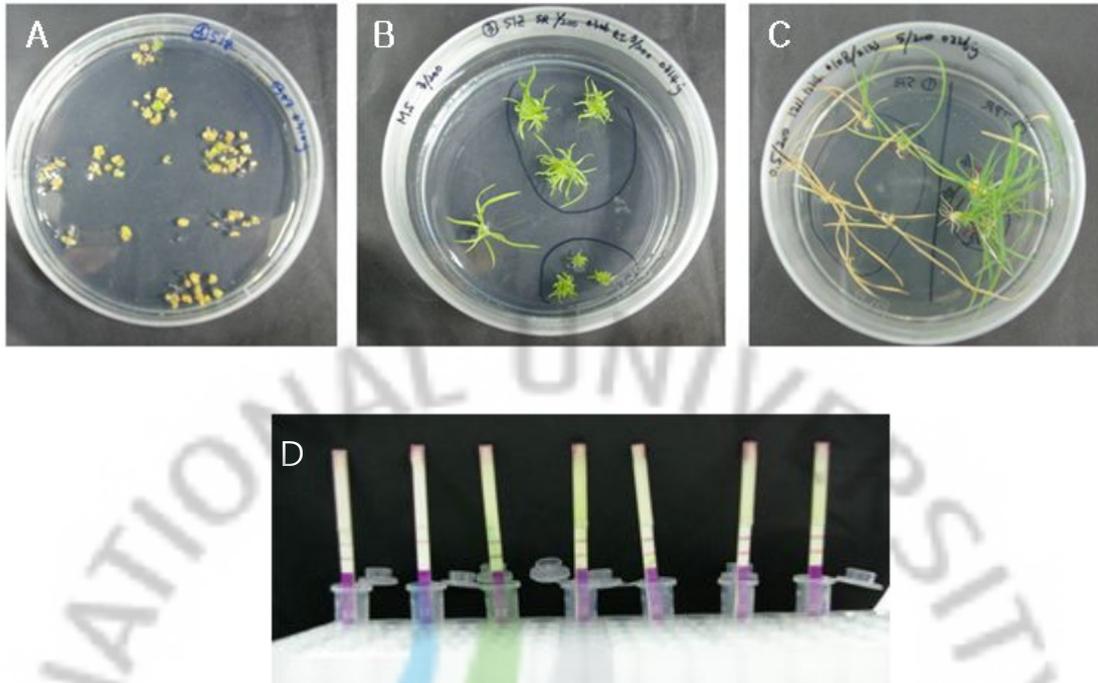


Fig. 4. Production of *AtSIZ*-transgenic *Agrostis mongolica* Roshev.

A, Callus growth in PPT-containing medium (1 mg/l PPT); B, Multiple shoot formation in PPT-containing medium (3 mg/l PPT); C, Root formation in PPT-containing medium (5 mg/l PPT); D, PAT protein detection

Table 1. *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency for *A. mongolica*

	No. infected calli	No. PPT-resistant shoots(%)
1	507	73 (14.4%)
2	513	53 (10.3%)
3	609	76 (12.5%)



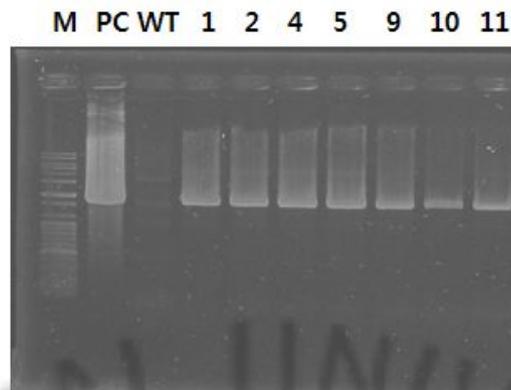
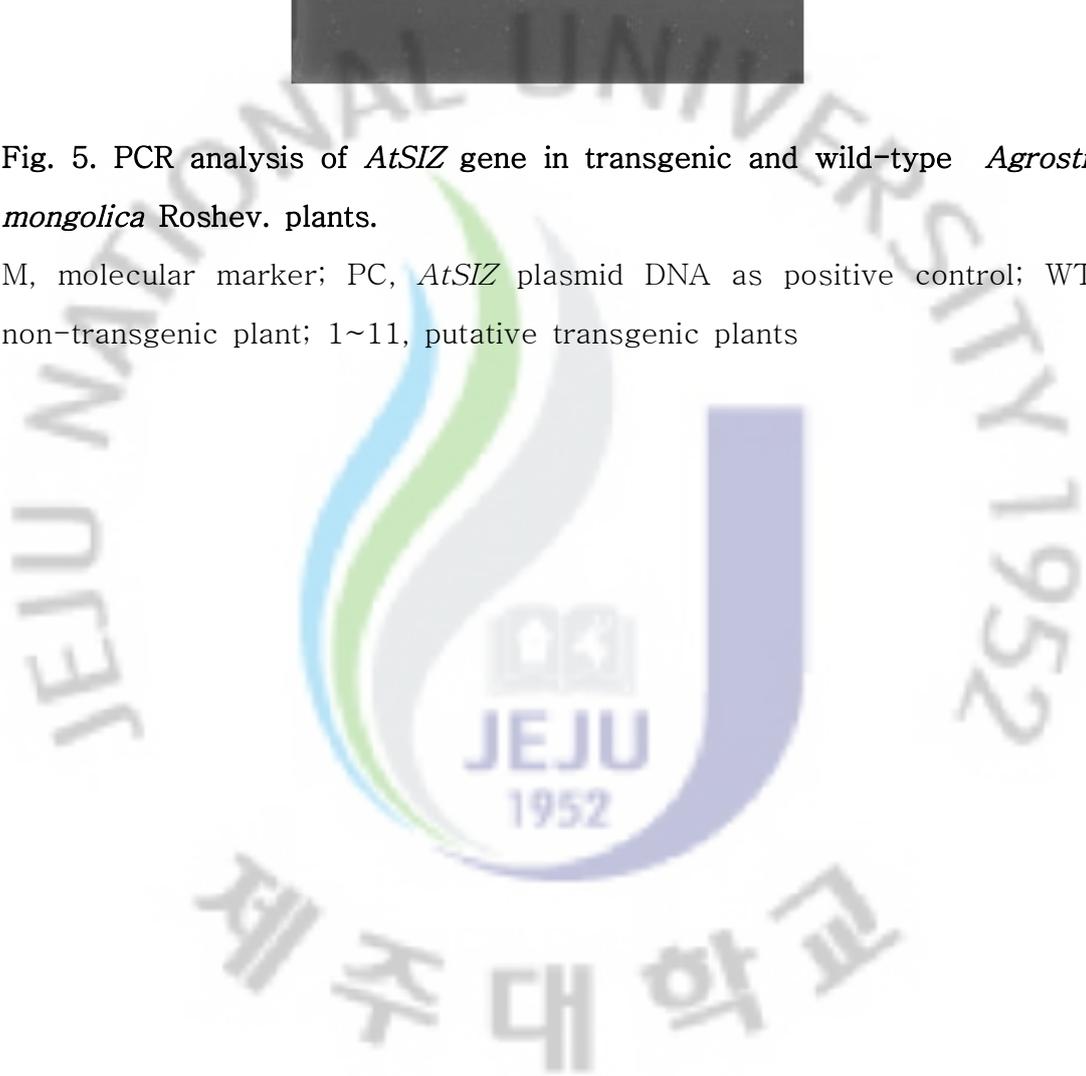


Fig. 5. PCR analysis of *AtSIZ* gene in transgenic and wild-type *Agrostis mongolica* Roshev. plants.

M, molecular marker; PC, *AtSIZ* plasmid DNA as positive control; WT, non-transgenic plant; 1~11, putative transgenic plants



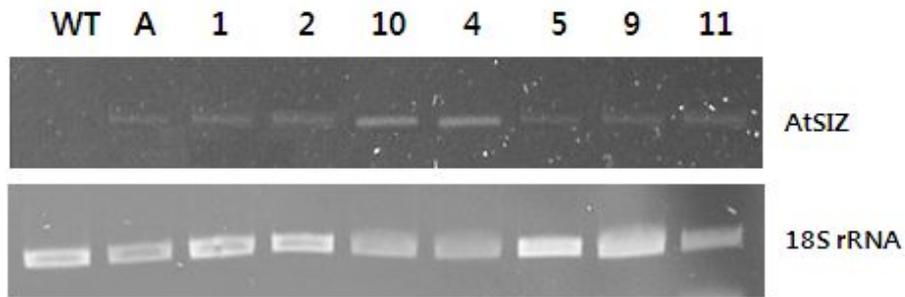
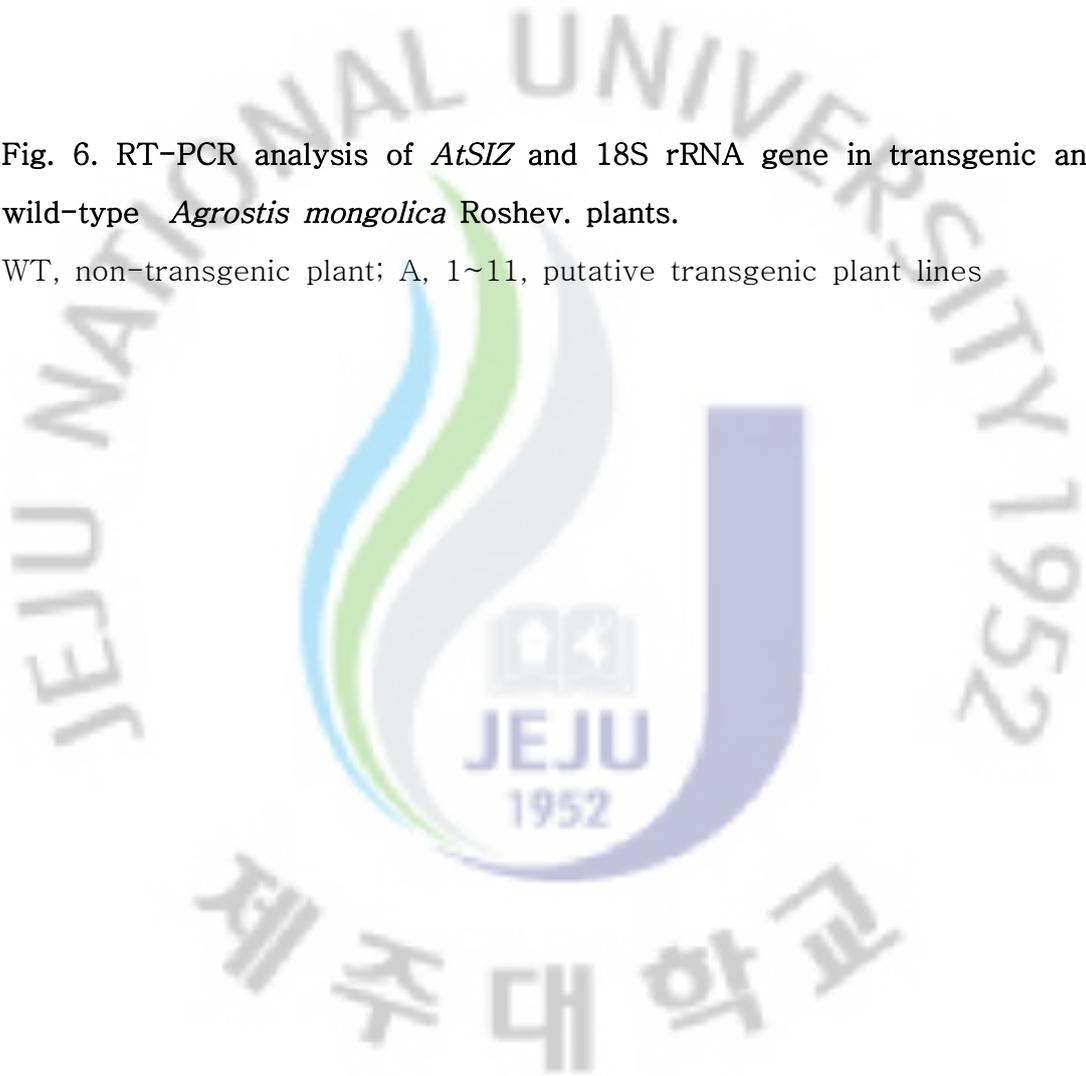


Fig. 6. RT-PCR analysis of *AtSIZ* and 18S rRNA gene in transgenic and wild-type *Agrostis mongolica* Roshev. plants.

WT, non-transgenic plant; A, 1~11, putative transgenic plant lines



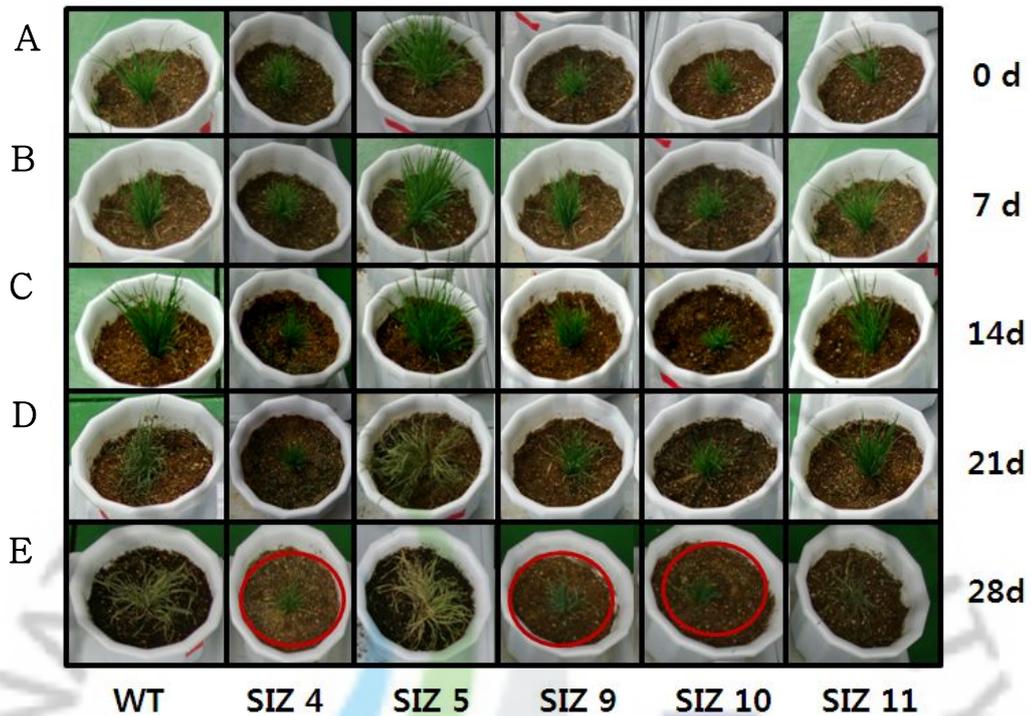


Fig. 7. The morphological phenotype of the transgenic and wild-type plants after stop-watering.

The plants were grown in soil in separate pots for 21 days under temperature controlled green house conditions. Afterward, watering was withdrawn and photographs were taken after 0(A), 7(B), 14(C), 21(D), 28(E) days of drought.

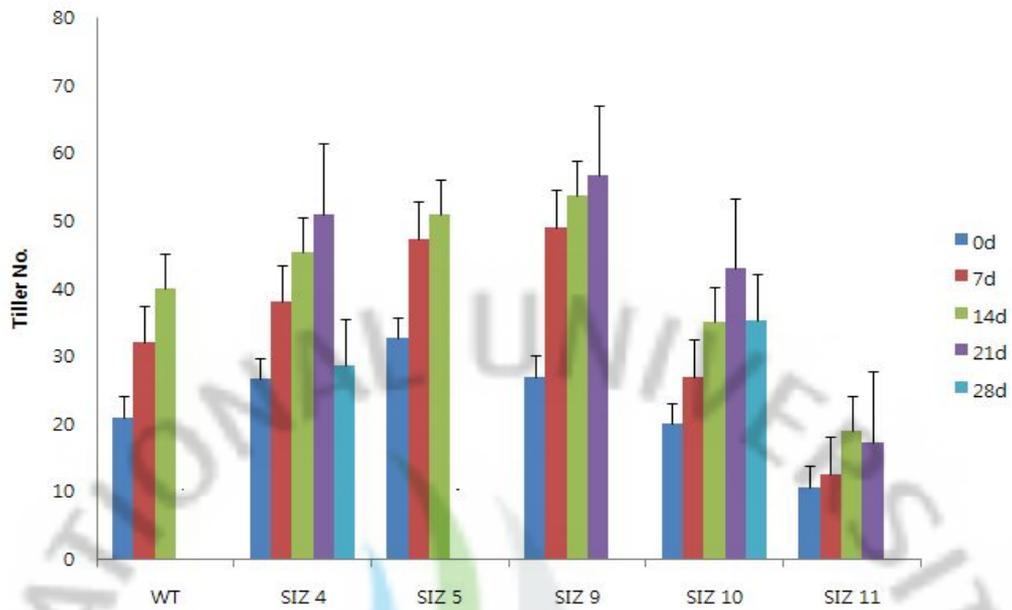


Fig. 8. Tiller number of wild-type and transgenic plants under drought test

Each tiller number of tested-plants were measured at 0, 7, 14, 21 and 28 days after water withholding. Each value represents the mean of tested three plants. Bars refer to standard error.

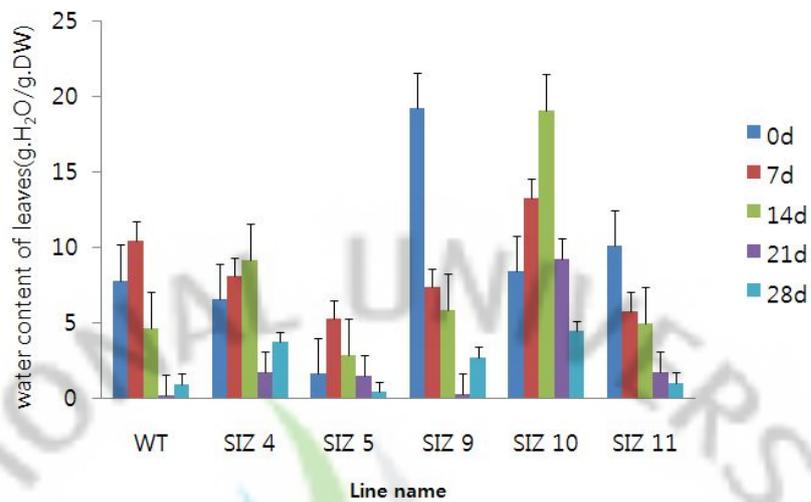


Fig. 9. Water content of wild-type and transgenic plants under drought test

Each water content of tested-plants leaves were measured at 0, 7, 14, 21 and 28 days after water withholding. Each value represents the mean of tested three plants. Bars refer to standard error.

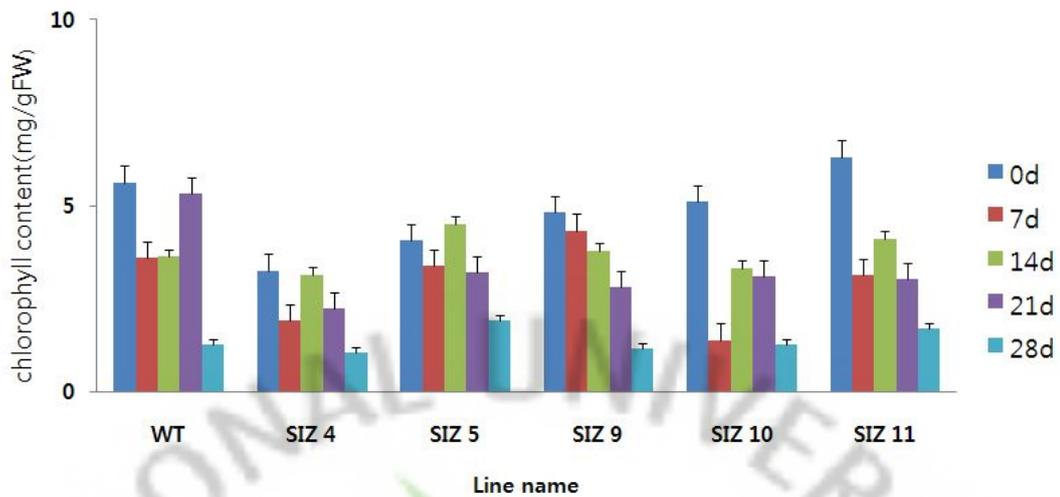


Fig. 10. Total chlorophyll content of wild-type and transgenic plants under drought test.

Each chlorophyll content of tested-plants leaves were measured at 0, 7, 14, 21 and 28 days after water withholding. Each value represents the mean of tested three plants. Bars refer to standard error.

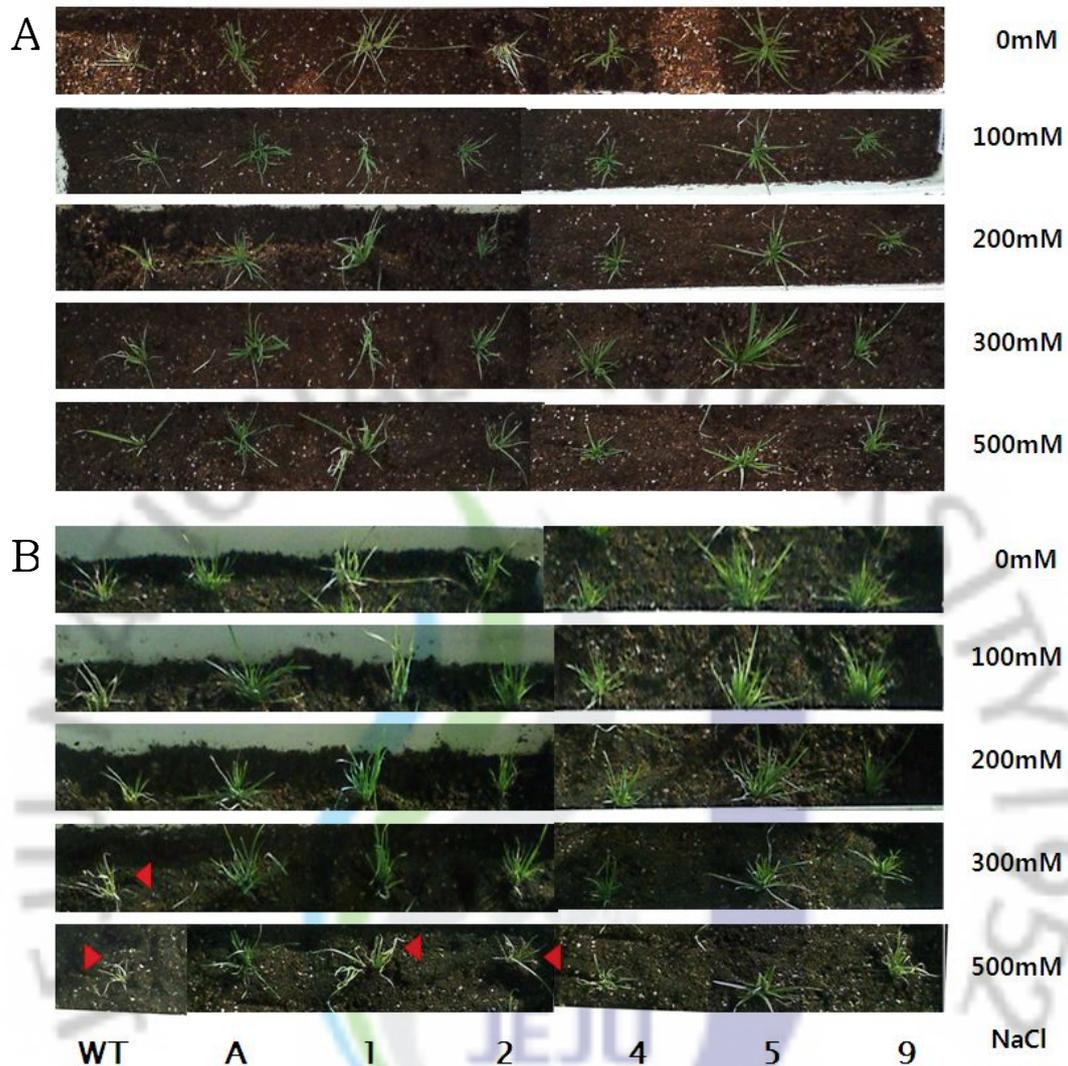


Fig. 11. High-salt tolerance of transgenic plants containing *AtSIZ* (continued).

For experiment, 7 plants, representing different lines, were grown in soil in one pot for 21 days under temperature controlled green house conditions. Afterward, those plants were soaked in various concentrations of NaCl solutions for 2 days and photographs were taken after 0(A), 7(B), 14(C), 21(D), 28(E) days of salt treatment.

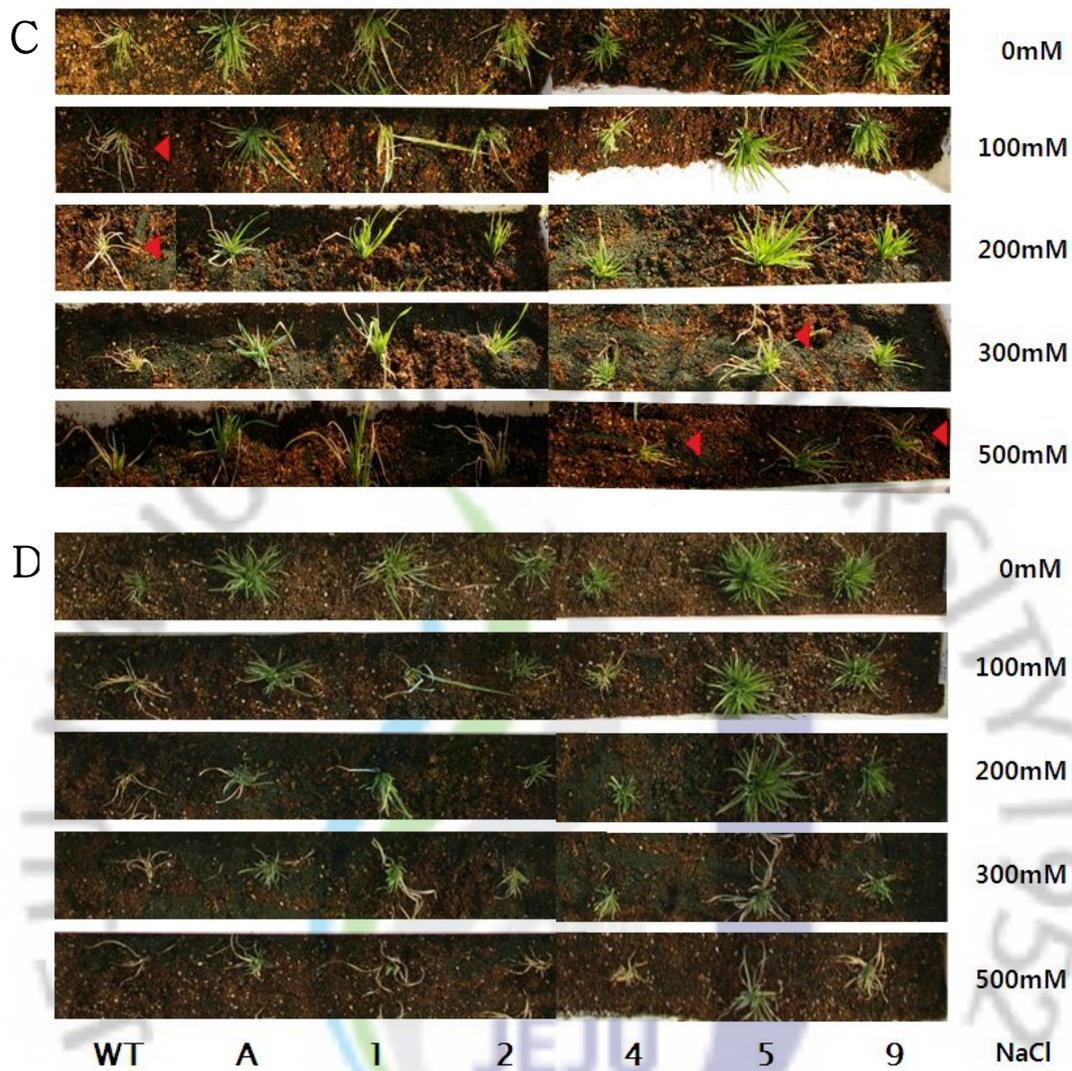


Fig. 11. High-salt tolerance of transgenic plants containing *AtSIZ* (continued).

For experiment, 7 plants, representing different lines, were grown in soil in one pot for 21 days under temperature controlled green house conditions. Afterward, those plants were soaked in various concentrations of NaCl solutions for 2 days and photographs were taken after 0(A), 7(B), 14(C), 21(D), 28(E) days of salt treatment.

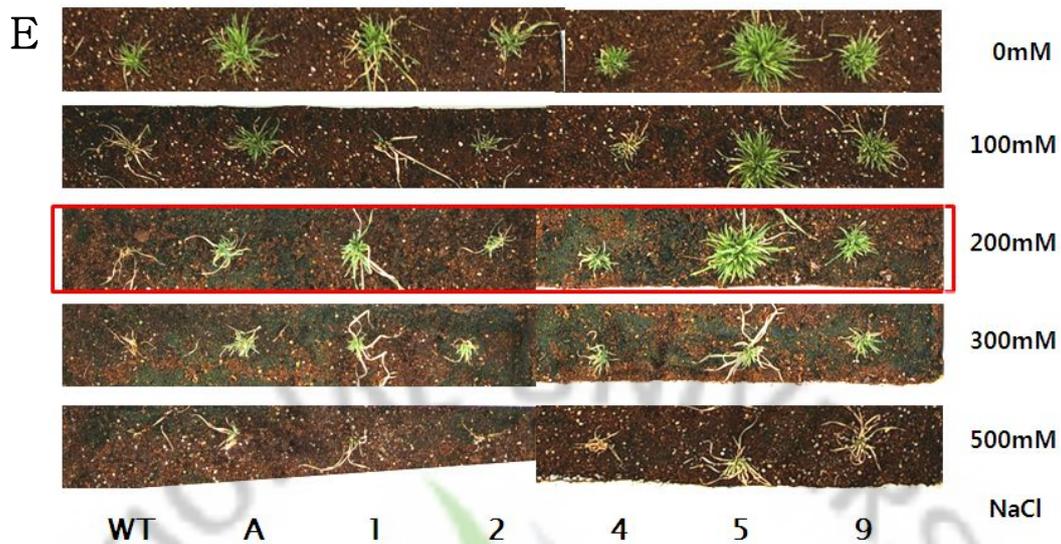


Fig. 11. High-salt tolerance of transgenic plants containing *AtSIZ*.

For experiment, 7 plants, representing different lines, were grown in soil in one pot for 21 days under temperature controlled green house conditions. Afterward, those plants were soaked in various concentrations of NaCl solutions for 2 days and photographs were taken after 0(A), 7(B), 14(C), 21(D), 28(E) days of salt treatment.

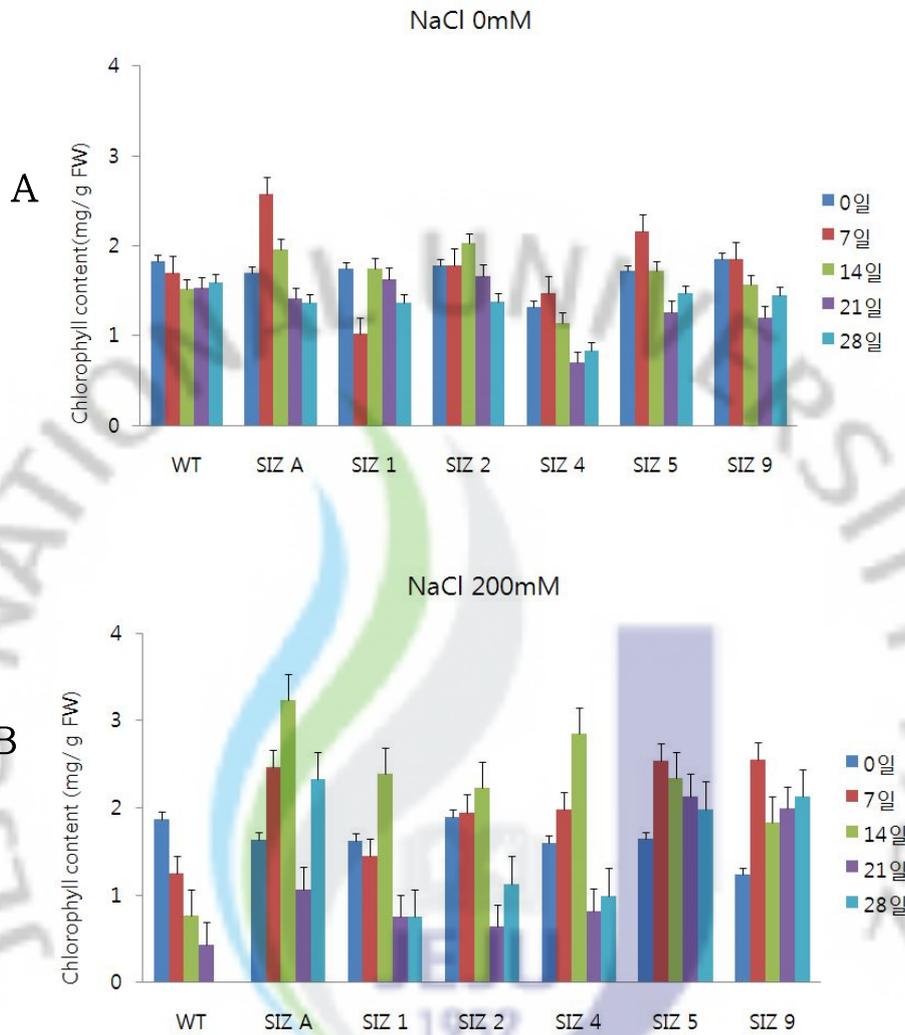


Fig. 12. Total chlorophyll content of wild-type and transgenic plants under salt stress.

Each chlorophyll content of tested-plants leaves were measured at 0, 7, 14, 21 and 28 days after salt treatment(A, 0 mM NaCl; B, 200 mM NaCl). Each value represents the mean of tested plants. Bars refer to standard error.

IV. 참고문헌

- Belanger, F.C., T.R. Meagher, P.R. Day, K. Plumley and W.A. Meyer. 2003. Interspecific hybridization between *Agrostis stolonifera* and related *Agrostis* species under field conditions. *Crop Sci.* 43: 240-246.
- Chai ML, Senthil KK, Kim DH (2004) Transgenic plants of colonial bentgrass from embryogenic callus via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 77:165-171
- Cheng Y, Kato N, Wang W, Li J, Chen X.(2003) Two RNA binding proteins, HEN4 and HUA1, act in the processing of AGAMOUS pre-mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *Dev. Cell* 4:53-66.
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY.(2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J. Biol. Chem* 275:1723-1730.
- Dubouzet, J. G. et al. (2003) *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high salt-, and cold-responsive gene expression. *Plant J.*, 33, 751-763.
- Enkhchimeg V, Bae TW, Song IJ, Kim KM, Lim YP, Lee HY (2008) Herbicide-resistant Transgenic Mongolian Bentgrass (*Agrostis mongolica* Roshev.) obtained by *Agrobacterium*-mediated Transformation. *Korean journal of breeding science* 40(2) : 128-135
- 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 from

Agrobacterium-mediated transformation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 87:109-120

Finkelstein RR, Lynch TJ. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* (2000) 12:599-609.

Gilmour, S. J. et al. (2000) Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol.*, 124, 1854-1865.

Han N, Chen D, Bian HW, Deng MJ, Zhu MY (2005) Production of transgenic creeping bentgrass *Agrostis stolonifera* var. *palustris* plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using hygromycin selection. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 81:131-138

Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K. and Bohnert, H.J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463-499.

Hsieh, T. H. et al. (2002) Heterology expression of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant*

Hsieh, T. H. et al. (2002) Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiol.*, 130, 618-626.

Ishitani M, Xiong L, Stevenson B, Zhu J.-K.(1997) Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell* 9:1935-1949.

J Zhao, W Ren, D Zhi, L Wang, G Xia (2007) *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 bestowed transgenic tall fescue increased tolerance to drought stress. *Plant Cell Rep.*

- Jaglo, K. R. et al. (2001) Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiol.*, 127, 910-917.
- Jaglo-Ottosen, K. R. et al. (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*, 280, 104-106.
- 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
- Kasuga, M. et al. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.*, 17, 287-291.
- Kasuga, M. et al. (2004) A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible *rd29A* promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant cell physiol.*, 45, 346-350
- Kim DH, Yamaguchi S, Lim S, Oh E, Park J, Hanada A, Kamiya Y, Choi G. (2008) SOMNUS, a CCCH-type zinc finger protein in *Arabidopsis*, negatively regulates light-dependent seed germination downstream of PIL5. *Plant Cell*.20(5):1260-1277
- Kim SJ. et al., (2007) *Agrobacterium*-mediated high-efficiency transformation of creeping bentgrass with herbicide resistance. *Journal of plant biology*. 50: 577-585
- Kim, J. C. et al. (2001) A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. *Plant J.*, 25, 247-259.
- Kim, S. et al. (2004) ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple

- stress tolerance. *Plant J.*,40, 75–87
- Knight, H. and Knight, M.R. (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* 6: 262–267.
- Knight, H., Veale, E.L., Warren, G.J. and Knight, M.R. (1999) The *sfr6* mutation in *Arabidopsis* suppresses low-temperature induction of genes dependent on the CRT/DRE sequence motif. *Plant Cell* 11: 875–886.
- Kong, Z., Li, M., Yang, W., Xu, W. and Xue, Y. (2006) A novel nuclear-localized CCCH-type zinc finger protein, OsDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice. *Plant Physiol.* 141: 1376–1388.
- Lee, J. T. et al. (2003) Expression of *Arabidopsis* CBF1 regulated by an ABA/stress inducible promoter in transgenic tomato confers stress tolerance without affecting yield. *Plant Cell Environ.*, 26, 1181–1190.
- Li, J., Jia, D., and Chen, X. (2001). HUA1, a regulator of stamen and carpel identities in *Arabidopsis*, codes for a nuclear RNA binding protein. *Plant Cell* 13: 2269–2281.
- Li, Z., and Thomas, T.L. (1998). PEI1, an embryo-specific zinc finger protein gene required for heart-stage embryo formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 383–398.
- Li, Z., and Thomas, T.L. (1998). PEI1, an embryo-specific zinc finger protein gene required for heart-stage embryo formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 383–398.
- Liu J, Zhu J.-K.(1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* 280:1943–1945.
- Liu, Q. et al. (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10, 1391–1406

- Lopez-Molina L, Chua N.-H.(2000) A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 41:541-547.
- 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
- Ma, S., Gong, Q. and Bohnert, H.J. (2006) Dissecting salt stress pathways. *J. Exp. Bot.* 57: 1097-1107.
- Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Seki M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K.(2000) Organization and expression of two *Arabidopsis DREB2* genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol. Biol* 42:657-665.
- 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
- Orlikowska, T., Nowak, E. (1997) "Factors affecting transformation of gerbera" *Acta Hort.* 447: 619-621
- Owens, C. L. et al. (2002) CBF1 orthologs in sour cherry and strawberry and the heterologous expression of CBF1 in strawberry. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 127, 489-494.
- Pellegrineschi, A. et al. (2004) Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. *Genome*, 47, 493-500.
- Qin, F. et al. (2004) Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene

- expression in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol.*, 45, 1042–1052.
- RJ Porra, WA Thompson, PE Kriedemann(1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvent: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochem. Biophys. Acta.*
- Sahi C. Singh A. Kumar K. Blumwald E., Grover A. (2006) Salt stress response in rice: genetics, molecular biology, and comparative genomics. 6:263–284
- Sakamoto, H. et al. (2000) Expression of a subset of the Arabidopsis Cys2/His2-type zinc-finger protein gene family under water stress. *Gene.* 248: 23–32
- Sakamoto, H. et al. (2004) Arabidopsis Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiol.*, 136, 2734–2746.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 217–.223.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*: 1–7
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Seki, M. (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 410–417.
- Sun J, Jiang H, Xu Y, Li H, Wu X, Xie Q, Li C. (2007) The CCCH-type zinc finger proteins AtSZF1 and AtSZF2 regulate salt stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 48(8):1148–1158.
- 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.
- Vergara GV, Bughrara SS (2003) AFLP analyses of genetic diversity in bentgrass. Crop Sci 43:2162-2171
- Wang W., Vinocur B., Altman A.(2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperature: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta. 218:1-14
- Xiong, L., Schumaker, K.S. and Zhu, J.-K. (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. Plant Cell 14 Suppl.: S165-S183.
- Xu Q., Huang B.(2000) Growth and physiological responses of creeping bentgrass to changes in air and soil temperatures. Crop sci. 40:1363-1368
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.(1994) A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. Plant Cell 6: 251-.264.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.(2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress responsive promoters. Trends Plant Sci. 10: 88-94.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.(2006) Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Annu. Rev. Plant Biol. 57: 781-803.
- 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
- Zhang, J. Z. et al. (2004) From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. Plant Physiol., 135, 615-621.
- Zhang. Y., Mian A.R., Bouton J. H.(2006) Recent molecular and genomic

studies on stress tolerance of forage and turf grasses. *Crop sci.*
46:497-511

Zhu, J.-K. (2001) Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 401-406.

Zhu, J.-K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 247-.273.



감사의 글

남들보다 긴 석사 과정이 이제 끝이 보인다 생각하니 길었던 시간에 비해 내가 공부를 많이 안했구나 하는 부끄러움이 고개를 듭니다. 학문적으로도, 인간적으로도 성숙할 수 있는 기회였지만, 무엇보다도 제 자신의 능력과 한계를 인정하고 조율하는 게 참 힘든 과정이었습니다. 그 과정을 지나오는 동안 저를 이끌어 주신 많은 분들께 일일이 찾아뵙지 못하고 이렇게 지면으로나마 대신 감사의 마음을 전하고자 합니다.

피펫 사용법조차도 모르던 제가 생명공학이라는 분야를 우연히 접한 이후 심사숙고 끝에 석사과정에 진학할 결심을 굳힐 수 있게 연구의 비전을 보여주신 이효연 교수님께 감사드립니다. 남들보다 느린 타고난 천성을 안타까워 하시면서도 늘 연구의 집중력을 높이는 조언을 아낌없이 주신 임평옥 교수님께는 죄송함과 감사의 마음을 같이 드립니다. 대학원 수업 중 연구하는 사람으로서의 태도에 대한 일침을 가해주신 류기중 교수님, 4년이란 긴 석사과정을 끝까지 마무리 지을 수 있게 격려와 조언을 해주시고 토론의 재미를 알게 해주신 김인중 교수님, 연구를 위한 자료조사의 힘을 알려주신 김소미 교수님, 사상누각의 지혜를 알려주신 김재훈 교수님, 열린 시야의 중요성을 알려주신 김찬식 교수님께도 감사드립니다. 영어 기피증을 해소하고 식물의 반응에 대한 깊이있고 재미있는 지식을 알려주신 송필순 교수님, 실험실에서뿐만 아니라 필드에서 일어나는 여러 식물에 대한 애정과 열정을 보여주신 아다치 교수님, 연구의 재미뿐만 아니라 연구자로서 비전을 창출해야 함을 보여주신 박세필 교수님께도 감사드립니다. 그리고 연구 수행이 늦어져 늘 애가 탔을 이동희 박사님께는 진심으로 사죄의 말씀드립니다. 연구 틈틈이 드는 호기심과 의구심을 풀어주신 강홍규 교수님, 시간에 지지않게 응원해주신 분석의 달인 김준기 교수님, 특히 연구 내내 부드러운 말로 보여주신 가르침과 조언, 흔들리지 않게 희노애락을 같이 해주신 선현진 교수님, 한결같은 모습으로 응원해주신 배태웅 박사님, 동갑이지만 조언을 구할 때 찾게 되는 송인자 박사님께도 감사드립니다.

임신 중에도 열심히 실험을 가르쳐주고 가신 잉키치백 박사님, 토론 및 엽기 행

각 동기 니시구치, 후배지만 언니같이 기뻐던 유정이, 아기 이쁘게 키우시고 고맙습니다. 우리 실험실 식구들-포기는 없다는 대화, 독하게 실험하는 은정이, 최강 산삼 체력 준영이, 맥가이버 옥철이, 새침때기 보화, 막둥이 하나, 매너남 태건이, 웃음보 미영언니, 최장신 민재-만언니임에도 불구하고 자주 챙겨주지 못하고, 도움만 받은 것 같습니다. 모두 최상의 결과를 얻고 나갈 수 있길 바랍니다. 그리고 무거운 건 죄다 들어준 주성이, 닳은 꼴 헤지도 각자의 자리에서 혹은 더 나은 진로로 최선을 다하길 바랍니다. 처음 타 학과 생활에 적응할 수 있도록 도와준 대학원 선배 및 동기들-멀리서 늘 응원해준 경하, 아기아빠 상협이, 딸랑이 승엽이, 야무진 윤정이, 입학동기이자 졸업동기가 된 여진이, 최수정 선생님과 학과 조교 선생님들께도 감사의 뜻을 전합니다.

그리고 과학교육과 정충덕 교수님과 오홍식 교수님께도 감사드립니다. 학부 때 늘 놀러 다니며 피했었는데, 뒤늦은 공부에도 철들었다고 웃으며 격려해주신 덕분에 용기 내어 공부할 수 있었습니다.

순천대학교 진일두 교수님, 결혼 전 홀로 찾아간 제게 주신 숙제 덕분에 제 진로에 대해 진지한 고민을 할 수 있었습니다. 감사합니다.

그리고 공부하는 내내 묵묵히 내 의견을 존중해주신 우리 엄마, 서른 넘어 백수로 공부하는 내게 몰래 용돈 찢러 주며 자랑스럽다 말해주는 우리 오빠랑 남동생, 그리고 정많은 올케들과 귀여운 조카들-유정, 지훈이까지 어떤 상황에서도 내 편인 가족이 있어 든든했습니다.

이쁜 내 새끼라며 언제나 반겨주시는 할머니, 부족한 저를 사랑으로 안아주시던 여수 어머니와 아버지, 마무리가 중요하다며 다독여주신 모든 시댁 식구들, 제가 그리던 대가족이 생겨 정말 좋습니다.

그리고 마지막으로 위기의 순간마다 함께 해주며 얼마든지 기댈 어깨를 내어준 내 남편 용택씨, 복덩이 예은이와 함께 하는 매일매일이 버라이어티하지만 결혼 전부터 지금까지 당신 만나길 정말 잘했다고 생각합니다. 사랑합니다.

미처 언급하지 못했지만 저를 아끼고 격려해주시는 모든 분들께 감사드리며 앞으로 부끄럽지 않은 모습으로 열심히 노력하겠습니다.

전영주 드림