

# 이탈리안 라이그래스의 형질전환에 미치는 몇 가지 요인의 영향

이상훈 · 우현숙 · 이병현

경상대학교 응용생명과학부 · 농업생명과학연구원

## Factors Affecting Genetic Transformation of Italian Ryegrass

S. H. Lee, H. S. Woo and B. H. Lee

Division of Applied Life Science-Institute of Agriculture and Life Science,  
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

### ABSTRACT

A system for the production of transgenic plants has been developed for Italian ryegrass(*Lolium multiflorum* Lam.) via *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic callus. Mature seed-derived calli were infected and co-cultured with *Agrobacterium* EHA101 carrying standard binary vector pIG121Hm encoding the hygromycin phosphotransferase(HPT), neomycin phosphotransferase II (NPTII) and intron-containing  $\beta$ -glucuronidase(intron-GUS) genes in the T-DNA region. The effects of several factors on transformation and the expression of the GUS gene were investigated. Inclusion of 200 $\mu$ M acetosyringone(AS) in inoculation and co-cultivation media lead to a significant increase in stable transformation efficiency. Increasing *Agrobacterium* cell density up to 1.0 in OD<sub>600</sub> during infection increased transformation efficiency of embryogenic calli. The highest transformation efficiency was obtained when embryogenic calli were inoculated with *Agrobacterium* in the presence of 0.1% Tween20 and 200 $\mu$ M AS. Hygromycin resistant calli were developed into complete plants via somatic embryogenesis. GUS histochemical assay and PCR analysis of transgenic plants demonstrated that transgenes were integrated into the genome of Italian ryegrass.

(Key words : *Agrobacterium*, Forage crop, Italian ryegrass, Transgenic forage)

### I 서 론

이탈리안 라이그래스(*Lolium multiflorum* Lam.)는 사료가치가 높고 단기간에 높은 수량을 올릴 수 있어서 여러 번 수확할 수 있을 뿐만 아니라, 가축의 기호성이 좋고 소화율이 높아서 가축생산성이 좋으며 당분 함량이 높아서 청에 이용, 방목이용, 건초조제, 사일리지 및 곤포사료 조제이용 등 소 사육에 있어서 그 용도가 다양하여 재배적 가치가 매우 높은 사료작물이다(Park 등, 1987). 우리나라에 있어서 이탈리안 라이그래스는 남부지방에 있어서 대표적인 사료작물로서 많이 재배되고 있으며, 전 세계적으로도 유럽 및 아시아의 온대지역에 널리 분

포하는 일년생 또는 월년생의 사료작물로서 널리 재배되고 있는 초종이다(Hides 등, 1993; Isselstein, 1993). 그러나 이탈리안 라이그래스는 여러 가지 사료작물로서의 장점에도 불구하고 우리나라에서 재배될 경우, 여름철의 고온기에 생육이 저하되는 하고의 피해가 있고, 저온에도 약하여 겨울철 1월 최저 평균기온이 -5 $^{\circ}$ C 이하인 중북부 지방에서는 월동이 불가능하여 재배가 어려운 단점이 있다(Choi 등, 2000). 이러한 단점을 보완하기 위해 국내에 있어서도 교잡육종에 의해 '화산101호'와 같은 몇몇 신품종이 개발되었으며(Choi 등, 2000), 전 세계적으로도 선발과 교잡에 의한 전통적인 육종법에 의한 연구가 활발히 진행되고 있다(Van Wijk

Corresponding author : B. H. Lee, Division of Applied Life Science · Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea, Tel : 055-751-5418, Fax : 055-751-5410, E-mail: hyun@nongae.gsnu.ac.kr

등, 1993). 그러나 이탈리아 라이그래스는 다른 여러 가지 화분과 목초종들처럼 자가불화합성이 매우 높아서, 이러한 전통육종법에 의한 육종에는 많은 시간과 공간이 요구되는 제한이 있어서 속도가 매우 느린 단점이 있다(Ye 등, 1997). 최근에는 목초 또는 사료작물로의 유용 유전자의 도입에 의한 분자육종법을 통한 신품종 개발 연구가 시도되고 있다(McKersie, 1997; Spangenberg 등, 1998). 대부분의 화분과 사료작물의 형질전환은 silicon-carbide fiber(Dalton 등, 1998)를 이용하거나 particle bombardment(Zhong 등, 1993; Spangenberg 등, 1995; Ye 등, 1997; Dalton 등, 1999)법에 의한 유전자의 직접도입법에 의해 시도되어 왔다. 그러나 이러한 형질전환 기법은 고가의 장비를 요구하고 특히 식물체의 genome 내에 복수의 copy number로 삽입되어 내재성 유전자의 불활성화, 도입유전자의 크기에 따른 제한, 염색체의 재배치, 유전성의 복잡성 등으로 인해 널리 보급되고 있지 못한 실정이다. 이와 반면 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 기법은 가장 경제적이며, genome 내에 1~ copy의 적은 수의 copy number로 도입되며, 특히 거대분자의 DNA도 안정적으로 도입하는 것이 가능하여 매우 효율적인 형질전환 기법 중에 하나이다(Hiei 등, 1994). 지금까지 *Agrobacterium*법에 의한 형질전환은 주로 쌍자엽식물에는 많이 이용되어왔으나, 단자엽식물 형질전환에는 낮은 형질전환 효율로 인해 많은 제한요인으로 작용하여 왔다(Nadolska-Orczyk 등, 2000). 그러나 최근 *Agrobacterium*법에 의한 단자엽식물의 형질전환에 대한 보고가 벼(Hiei 등, 1994), 밀(Cheng 등, 1997), 보리(Tingay 등, 1997; Trifonova 등, 2001), 사탕수수(Arencibia 등, 1998) 및 수수(Zhao 등, 2000) 등에서도 보고되어 다른 작물로의 응용범위가 점점 넓어지고 있다.

화분과 사료작물의 형질전환에 대한 보고는 대부분 particle bombardment법에 의한 것이며 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 체계는 아직까지 확립되어 있지 못한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 이탈리아 라이그래스의 유전자 형질전환을 통한 신품종 개발을 위한 기초실험으로 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 있어서

가장 중요한 몇 가지 요인의 영향에 대해 체계적으로 조사함으로써 효율적인 형질전환 시스템을 확립하고자 하였다.

## II 재료 및 방법

### 1. 식물재료

형질전환을 위한 재료로는 이탈리아 라이그래스의 성숙종자로부터 유도된 배발생 캘러스를 사용하였다. 캘러스 유도를 위해 성숙종자의 종피를 제거한 다음 70% ethanol에서 30초간 살균한 후, 30% sodium hypochlorite 용액에서 30분간 교반하면서 표면살균 하였다. 살균한 종자를 MS(Murashige와 Skoog, 1962) 배지를 기본으로 하는 캘러스 유도배지(5mg/L 2,4-D, 1g/L casein hydrolysate, 1mg/L thiamine-HCl, 500mg/L L-proline, 30g/L sucrose 및 5g/L gelrite)에 치상하여 배발생 캘러스를 5주간 배양하여 형성된 캘러스를 2주간격으로 계대배양하여 *Agrobacterium* 감염에 이용하였다.

### 2. *Agrobacterium* 배양 및 발현벡터

형질전환을 위한 발현벡터는 kanamycin(Km) 내성 유전자와 hygromycin(Hm) 내성 유전자 및 intron을 포함하고 있는 GUS유전자( $\beta$ -glucuronidase) 등을 가지는 pIG121Hm(Hiei 등, 1994; Fig. 2) 벡터를 이용하였다. pIG121Hm 발현벡터를 *Agrobacterium* strain EHA101(Hood 등, 1986)에 형질전환한 후, Km과 Hm이 각각 50mg/L이 함유된 YEP 한천배지(An 등, 1988)에서 단일 colony를 선발하여 사용하였다. *Agrobacterium*은 단일 colony를 Km과 Hm이 각각 50mg/L이 첨가된 YEP 배지에 접종하여 28°C 서 하룻밤 배양한 후, 원심분리하여 회수한 cell을 캘러스의 감염에 이용하였다.

### 3. *Agrobacterium* 접종과 공동배양

YEP 액체배지에서 28°C 하룻밤 배양한 *Agrobacterium*을 3,600rpm에서 10분간 원심분

리하여 회수한 후, 기본적으로는 200 $\mu$ M acetosyringone(AS)이 첨가된 접종배지(MS medium, 30g/L sucrose)에 OD<sub>600</sub>=1.0이 되도록 현탁하여 캘러스의 감염에 이용하였다. 종자유래의 배발생 캘러스를 크기 3-5mm로 잘라 *Agrobacterium* 접종배지에 1시간 침지시켜 감염시킨 다음 여분의 *Agrobacterium*을 멸균된 filter paper 위에서 제거하였다. 감염시킨 캘러스를 공동배양배지(MS medium, 200 $\mu$ M AS, 30g/L sucrose, 5g/L gelite)에 계대한 후 26 $^{\circ}$ C 서 5일간 암상태로 공동배양하였다. 공동배양한 캘러스는 0.5g/L cefotaxime이 첨가된 공동배양배지로 세정하여 *Agrobacterium*을 제거한 후, post-culture배지(MS medium, 0.5g/L cefotaxime, 5mg/L 2,4-D, 2mg/L BA, 1mg/L casein hydrolysate, 0.5g L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L gelrite)에 7일간 배양하였다.

4. 형질전환체의 선발과 식물체 재분화

공동배양과 post-culture가 끝난 캘러스는 선발배지(N6 medium, 50mg/L Hm, 1mg/L 2,4-D, 5mg/L BA, 1mg/L casein hydrolysate, 0.5g L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L gelrite)에서 2주간 배양하여 Hm 내성을 보이는 캘러스만을 선발하여, 다시 새 선발배지에 옮겨 3주간 배양하여 살아남은 캘러스로부터 식물체를 재분화시켰다. 재분화된 식물체는 50mg/L의 Hm이 첨가된 1/2MS 배지가 들어있는 배양병에 옮겨준 후, 4주간 배양하여 정상적으로 뿌리가 발육되고 살아남는 개체만을 선발하여 pot로 이식하여 온실에서 재배하였다.

5. GUS 분석과 형질전환체 분석

GUS 활성염색은 Jefferson(1987)의 방법에 준하여 실시하였다. 캘러스에 있어서 GUS 발현 조사는 5일간 공동배양한 캘러스를 이용하였으며, 재분화된 형질전환 식물체의 잎을 이용한 GUS 활성염색은 선발배지에서 재분화된 식물체 또는 온실재배중인 형질전환 식물체의 잎조직을 재료로 하여 GUS 활성염색을 실시한 후 형질전환 여부를 판단하였다. 온실에서 재배한 형질전환 식물체로부터 genomic DNA를 CTAB법(Murray와 Thompson, 1980)에 준하여 분리한 후 PCR 분석을 실시하였다. PCR 분석을 위하여 CaMV35S promoter의 3'-영역의 염기서열의 일부인 5'-CCCACCCACGAGGAGCATC-3'을 forward primer로, *hpt* 유전자의 5'-영역의 antisense 가닥의 5'-TAGGTCAGGCTCTCGCTA-3'을 reverse primer로하여 증폭시킨 후, agarose gel 전기영동으로 확인하였다.

III 결과 및 고찰

1. Acetosyringone의 효과

이탈리안 라이그래스의 *Agrobacterium*을 이용한 최적 형질전환 조건을 조사하기 위하여, 우선 성숙종자 유래의 배발생능이 우수한 캘러스를 이용하여 감염효율에 가장 큰 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있는 acetosyringone(AS)의 첨가에 따른 효과를 조사한 결과 Table 1과 같았다. 이탈리안 라이그래스의 세 가지 품종에

Table 1. Effect of acetosyringone on GUS expression in seed-derived callus of *Lolium multiflorum* Lam

Cultivars	Acetosyringone <sup>a</sup>	No. of calli tested	No. of calli with GUS spots	Calli with GUS spots(%)
Jeanne	-	180	19	10.6
	+	180	69	38.3
Florida-80	-	180	13	7.2
	+	180	32	17.8
Metro	-	180	25	13.9
	+	180	85	47.2

<sup>a</sup> - and + denote the absence and presence of 200 $\mu$ M acetosyringone, respectively, in both the inoculation and co-cultivation media.

있어서 AS를 *Agrobacterium* 접종배지와 공동배양배지에 동시에 첨가해 주었을 때의 캘러스의 형질전환 효율을 GUS 활성염색 정도를 비교하여 조사하였다. 본 실험에 사용한 pIG121Hm 발현벡터 내의 *int*-GUS 유전자는 GUS 유전자의 coding region 내에 intron 영역을 포함하고 있어서, 오직 식물체의 핵 내로 형질전환 되어야만 splicing되어 완전한 GUS 활성을 가지는 단백질로 합성되어 GUS 활성염색을 통하여 확인할 수 있다(Fig. 1A). 따라서 *Agrobacterium*으로 감염시킨 전체 캘러스 중 GUS 활성염색이 되는 비율을 조사하여 형질전환 효율을 조사하였다. 예비실험에서 가장 효율적인 AS의 첨가농도는 공시한 모든 품종의 이탈리아 라이그래스에서 200 $\mu$ M로 나타났다(결과 미제시). 'Jeanne' 품종의 경우 AS를 첨가하지 않았을 때의 GUS 활성염색이 되는 비율, 즉 형질전환 효율이 10.6%였으나 200 $\mu$ M의 AS를 첨가해주었을 때에는 38.3%로 증가하였다. 'Metro' 품종의 경우 AS 무첨가 시에 13.9%에서 200 $\mu$ M의 AS 첨가 시 47.2%로 증가하여 약 3.4배정도 형질전환 효율이 증가되었다. 품종별로는 'Metro'의 효율이 가장 높았으며, 'Jeanne'가 중간정도의 효율을, 'Florida-80'이 가장 낮은 효율을 나타내어, 이 후의 실험에는 'Metro' 품종을 이용하였다. AS는 *Agrobacterium*이 가지고 있는 식물세포의 감염에 관여하고 있는 유전자인 *vir* 유전자를 활성화시키는 페놀성 화합물로 알려져 있는데 (Usami 등, 1987), 대부분의 단자엽 식물조직에서는 이물질이 합성되지 않음으로 인해 *Agrobacterium*에 의한 형질전환에 장애요인으로

작용해 왔다. 특히 벼(Hiei 등, 1994)와 옥수수(Ishida 등, 1996)의 형질전환에는 AS의 첨가가 필수적이라고 보고되었다. 그러나 본 실험에서는 세 가지 품종 모두 AS 무첨가구에서도 형질전환 효율은 낮지만 10% 전후의 GUS 발현이 확인되어, AS가 이탈리아 라이그래스의 형질전환에 필수적이지는 않은 것으로 판단되며, 형질전환 효율을 월등히 증가시키는 중요한 요인 중에 하나인 것으로 판단된다. 이와 같이 단자엽식물의 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 시에 AS를 첨가해 줌으로써 형질전환 효율이 증가되었다는 결과가 보리(Tingay 등, 1997)와 밀(Cheng 등, 1997) 등과 같은 화본과 작물에서도 보고된 바가 있다.

## 2. *Agrobacterium* 세포배양 농도에 따른 형질전환 효율의 차이

이탈리안 라이그래스의 종자유래 캘러스의 형질전환에 있어서, 감염시의 *Agrobacterium* 세포배양 농도가 형질전환 효율에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 전체적으로 *Agrobacterium* 농도가 낮은 경우(OD<sub>600</sub> = 0.5)에는 형질전환 효율이 낮았으며, 농도가 높은 경우(OD<sub>600</sub> = 1.0~ 5)에는 높은 형질전환 효율을 나타내었다. 한편 각각의 *Agrobacterium* 농도에 있어서 감염시간별 형질전환 효율을 비교해 본 결과, 저농도의 *Agrobacterium*(OD<sub>600</sub> = 0.5)으로 감염시켰을 때는 1시간동안 감염시켰을 때가 26.1%의 낮은 형질전환율을 보인 반면, 3시간 동안 감염시켰을 때는 35%로 증가되어, 감염시

Table 2. Effect of *Agrobacterium* cell density on GUS expression in seed-derived callus of *Lolium multiflorum* Lam. cv. Metro

OD <sub>600</sub>	Length of inoculation(h)	No. of calli tested <sup>a</sup>	No. of calli with GUS spots	Calli with GUS spots(%)
0.5	1	180	47	26.1
0.5	3	180	63	35.0
1.0	1	180	84	46.7
1.0	3	180	74	41.1
1.5	1	180	80	44.4
1.5	3	180	69	38.3

<sup>a</sup> Both the inoculation and co-cultivation media were supplemented with 200 $\mu$ M acetosyringone.

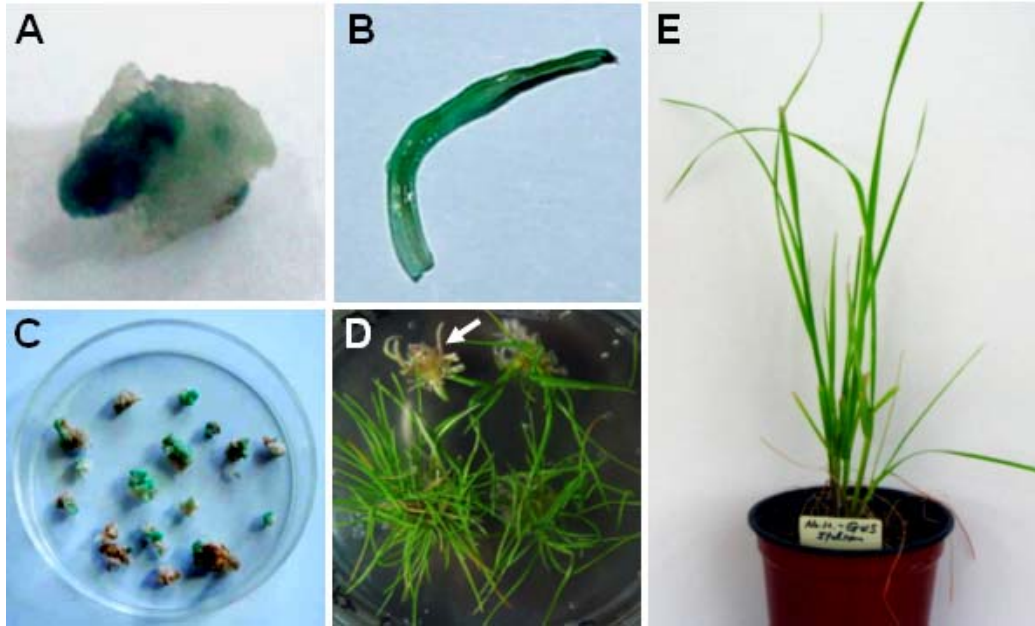


Fig. 1. Production of transgenic plants of Italian ryegrass cv. Metro. A, An embryogenic callus showing transient expression of the GUS gene. B, GUS histochemical assay in leaf of transgenic plant. C, Hygromycin resistant calli showing GUS gene expression. D, Selection of transgenic plants. Hygromycin resistant and sensitive(arrow) plantlets growing in the selection medium. E, A transgenic plants grown in pots under green house.

간이 길수록 형질전환 효율이 증가되었다. 반면에  $OD_{600} = 1.0$ 의 높은 *Agrobacterium* 농도에서는 1시간 감염시켰을 때가 46.7%로 가장 높은 형질전환 효율을 나타내었으며, 3시간 감염에서는 41.1%로 형질전환 효율이 감소하여 감염시간이 길어질수록 형질전환 효율이 감소하는 경향을 나타내었다. 이 보다 높은 *Agrobacterium* 농도에서도 같은 경향을 나타내었다. Wu 등(2003)은 밀의 미숙종자를 이용한 *Agrobacterium* 형질전환에 있어서 *Agrobacterium* 감염시 5시간까지 감염시켰을 때, 5시간에서 가장 높은 효율을 나타내었다고 하였으며, Amoah 등(2001)은 높은 농도의 *Agrobacterium*으로 3시간 감염시켰을 때가 효율이 가장 높다고 보고하였다. 그러나 본 실험의 이탈리아 라이그래스의 경우, *Agrobacterium*의 농도가 높을수록 형질전환 효율이 증가하는 것은 이들 결과와 동일하나, 높은 농도에서 감염시간이 1시간 이상 되면 오히려 형질전환 효율이 저하되는

경향을 나타내어 밀의 형질전환 효율과는 차이를 나타내었다.

### 3. Tween20의 농도에 따른 형질전환 효율의 차이

성숙종자 유래 캘러스의 형질전환에 있어서 비극성 계면활성제인 Tween20의 첨가효과를 조사하기 위하여, *Agrobacterium* 감염 시 접종 배지에 첨가한 후의 형질전환 효율을 조사한 결과는 Table 3과 같다. Tween20을 첨가해준 모든 처리구에서 형질전환 효율이 증가되었다. 특히 0.1%의 농도로 첨가해 주었을 때 62.7%의 효율을 나타내어 비첨가구에 비해 약 1.4배 증가한 형질전환 효율을 나타내었다. 이 보다 높은 농도인 1% 첨가구에서는 오히려 형질전환 효율이 감소하였으며, 육안으로 관찰한 결과 캘러스가 갈변되어 죽는 비율이 높았다. 이러한 Tween20의 효과는 식물세포벽

Table 3. Effect of Tween20 in the inoculation medium on GUS expression in seed-derived callus of *Lolium multiflorum* Lam. cv. Metro

Concentration of Tween20 (%)	No. of calli testeda	No. of calli with GUS spots	Calli with GUS spots (%)
0	180	81	45.0
0.01	180	84	46.6
0.1	180	113	62.7
1	180	95	52.8

<sup>a</sup> Both the inoculation and co-cultivation media were supplemented with 200µM acetosyringone.

을 *Agrobacterium*이 부착되기에 좋은 환경으로 개선시켜 T-DNA의 식물세포로의 전이를 용이하게 하거나, 식물세포 표면의 T-DNA 전이 저해물질들이 효과적으로 제거되기 때문으로 사료된다. 이와 유사한 비극성 계면활성제를 첨가해줌으로써 형질전환 효율을 증가시킨 결과가 밀(Cheng 등, 1997; Wu 등, 2003)에서도 보고된 바 있다.

4. 형질전환체의 선발과 확인

성숙종자로부터 유래된 캘러스를 *Agrobacterium*으로 감염시켜 공동배양한 후 형질전환 효율을 GUS 활성염색으로 확인한 결과, 형질전환된 캘러스는 청색으로 염색되었다(Fig. 1A,C). 형질전환시킨 캘러스를 post-culture 과정을 거쳐 50mg/L의 Hm이 첨가된 선발배지에서 선발한 결과 Fig. 1D에 나타난 바와 같이 재분화된 형질전환 식물체는 Hm 내성을 가지면서 최종적으로 정상적인 식물체로 생육하였으나(Fig. 1E), 비형질전환체는 탈색되어 고사되었다. 선발배지에서 재분화된 형질전환체의 잎조직을 채취하여 GUS 유전자의 발현 여부를 활성염색으로 조사하여 본 결과 Fig. 1B와 같이 청색으로 염색되어, *Agrobacterium*법에 의해 이탈리아 라이그래스가 성공적으로 형질전환 되었음을 확인할 수 있었다. 또한 Fig. 2에 나타난 바와 같이 형질전환 식물체의 genome내에 pIG121Hm 발현벡터가 가지는 T-DNA 영역이 도입되었는지를 확인하기 위해, 온실에서 재배중인 형질전환 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 추출한 후, CaMV35S promoter의 일부 염기서열과 Hm 내성 유전자의 일부 염기서열을 primer로하여

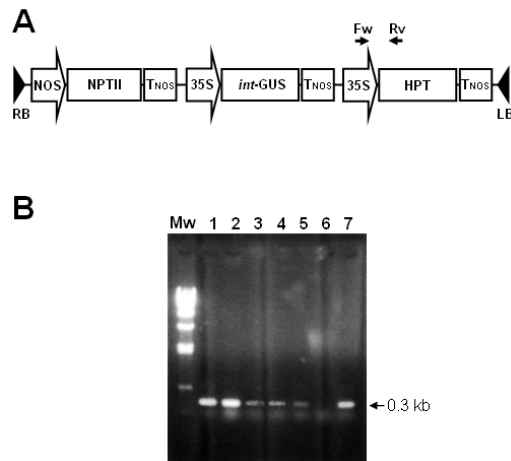


Fig. 2. PCR analysis for detecting *hpt* gene in transgenic plants of Italian ryegrass. A, T-DNA region of pIG121Hm expression vector. RB, Right border. LB, Left border. NOS, Promoter of nopaline synthase. NPTII, Neomycin phosphotransferase. 35S, 35S promoter of CaMV. int-GUS, Intron-containing GUS gene. HPT, Hygromycin resistance gene. Arrows represent forward and reverse primers used in PCR analysis. B, Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified from genomic DNAs of transgenic plants (lanes 1-5), nontransgenic plant(lane 6) and from plasmid DNA of pIG121Hm (lane 7).

(Fig. 2A) PCR로 확인한 결과, 비형질전환 식물체에서는 증폭된 단편을 확인할 수 없었으나 (Fig. 2B, lane 6), 형질전환 식물체에서는 약 0.3kb의 PCR 증폭산물이 관찰되어 형질전환 되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 2B, lanes 1-5).

지금까지 이탈리아 라이그래스의 형질전환은

particle bombardment법에 의한 것이 대부분이며 (Spangenberg 등, 1995; Ye 등, 1997; Dalton 등, 1999), 가장 안정적인 방법으로 알려진 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환이 Bettany 등 (2002)에 의해 최근에 보고되었으나, 이들은 이른바 super binary vector인 pTOK233 발현벡터를 사용하였는데, 이는 *Agrobacterium*의 감염효율을 증가시키기 위해 Komari 단편(Komari, 1990)으로 불리는 여분의 *virB*, *virC* 및 *virG* 유전자를 가짐으로서 50kb 이상 크기의 거대분자 발현벡터를 이용하였다. 그러나 이 벡터내로 유용유전자를 도입하는 과정은 복잡하고 어려워져 실용성이 떨어지는 단점이 있다. 본 연구에서는 일반적으로 가장 많이 쓰이며 크기가 작아서 유전자 재조합이 용이한 발현벡터로 standard binary vector인 pIG121Hm을 이용한 *Agrobacterium* 형질전환 체계를 최초로 확립하였다. 이러한 이탈리아 라이그래스의 효율적인 형질전환 체계는 유용유전자의 도입에 의한 신품종 이탈리아 라이그래스의 분자육종에 유용하게 응용되어질 수 있을 것이다.

#### IV 요약

유용유전자 도입을 통한 신품종 이탈리아 라이그래스를 개발할 목적으로 *Agrobacterium*을 이용한 효율적인 형질전환 체계를 확립하였다. 이탈리아 라이그래스 성숙종자 유래의 캘러스를 standard binary vector인 pIG121Hm을 가지는 *Agrobacterium* EHA101을 이용하여 감염시킨 후 공동배양하여 형질전환시켰다. *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 있어서 중요한 인자로 작용하는 몇 가지 요인에 대한 이탈리아 라이그래스 캘러스의 형질전환 효율을 GUS 유전자의 발현정도로 조사하였다. *Agrobacterium* 감염시에 접종배지와 공동배양배지에 200 $\mu$ M의 acetosyringone(AS)을 첨가해 주었을 때 형질전환 효율이 현저히 증가되었다. 또한 *Agrobacterium*의 농도를 OD<sub>600</sub> = 1.0 이상의 높은 농도로 1시간 감염시켰을 때 형질전환 효율이 증가되었다. 접종배지에 200 $\mu$ M의 AS와 0.1%의 Tween20을 첨가해 주었을 때 가장 높

은 형질전환 효율을 나타내었다. 50mg/L의 hygromycin이 첨가된 선발배지에서 살아남은 캘러스로부터 정상적인 식물체가 재분화되었으며, 이들 형질전환체의 잎으로부터 GUS 활성 염색과 PCR 분석을 통하여 발현벡터의 T-DNA 영역이 형질전환 식물체의 genome으로 도입되었음을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통하여 확립된 효율적인 형질전환 시스템은 분자육종을 통한 신품종 이탈리아 라이그래스의 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

#### V 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 연구비 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

#### VI 인용 문헌

1. Amoah, B. K., Wu, H., Sparks, C. and Jones, H. D. 2001. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue. *J. Exp. Bot.* 52:1135-1142.
2. An, G., Ebert, P. R., Mirata, A. and Ha, S. B. 1988. Binary vector. In: Gelvin, S. B., Schilperoot, R. A., Verma, D. P. S. (Eds) *Plant Molecular biology manual*. Kluwer, Dordrecht, p. 1.
3. Arencibia, A. D., Carmona, E. R., Tellez, P., Chan, M. -T., Yu, S. -M., Trujillo, L. E. and Oramas, P. 1998. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Res.* 7:213-222.
4. Bettany, A. J. E., Dalton, S. J., Timms, E., Manderyck, B., Dhanoa, M. S. and Morris, P. 2002. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Festuca arundinacea* and *Lolium multiflorum*. *Plant Cell Rep.* 21:437-444.
5. Cheng, M., Fry, J. E., Pang, S., Zhou, H., Hironaka, C. M., Duncan, D. R., Conner, T. W. and Wan, Y. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 115:971-980.
6. Choi, G. J., Rim, Y. W., Kim, K. Y., Choi, S. H., Sung, B. R., Kim, W. H., Shin, D. E. and Lim, Y. C. 2000. A cold-tolerant and high-yielding Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) new variety 'Hwasan 101'. *J. Kor. Grassl. Sci.* 20:1-6.
7. Dalton, S. J., Bettany, A. J. E., Timms, E. and

- Morris, P. 1998. Transgenic plants of *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* and *Agrostis stolonifera* by silicon carbide fibre-mediated transformation of cell suspension cultures. *Plant Sci.* 132:31-43.
8. Dalton, S. J., Betanny, A. J. E., Timms, E. and Morris, P. 1999. Co-transformed, diploid *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum* and *Lolium temulentum* plants produced by microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.* 18:721-726.
9. Hides, D. H., Kute, C. A. and Marshall, A. H. 1993. Seed development and seed yield potential of Italian ryegrass(*Lolium multiflorum* Lam.) populations. *Grass and Forage Sci.* 48:181-188.
10. Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumasiro, T. 1994. Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6:271-282.
11. Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T. and Chilton, M. D. 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* 168:1291-1301.
12. Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. 1996. High efficiency of transformation of maize(*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol.* 14: 745-750.
13. Isselstein, J. 1993. Influence of slight shading, sward density and nitrogen fertilization on yield and nutritive value of *Lolium multiflorum* Lam. *J. Agro. and Crop Sci.* 170:341-347.
14. Jefferson, R. A. 1987. Assay chimeric genes in plant: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405.
15. Komari, T. 1990. Transformation of callus cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. *Plant Cell Rep.* 9:303-306.
16. McKersie, B. D. 1997. Improving forage production systems using biotechnology. In: McKersie, B. D. and Brown, D. C. W.(Eds), *Biotechnology in Agriculture Series*, No. 17, CAB International, Wallingford, p. 3.
17. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revise medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
18. Murray, M. G. and Tompson, P. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Res.* 8:4321-4325.
19. Nadolska-Orczyk, A., Orczyk, W. and Przetakiewicz, A. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals from technique development to application. *Acta Physiol. Plant.* 22:77-88.
20. Park, B. H., Park, B. S. and Kang, J. H. 1987. A comparison between diploid and tetraploid cultivars of *Lolium multiflorum* Lam. *J. Kor. Grassland Sci.* 7:135-139.
21. Spangenberg, G., Wang, Z.-Y., Wu, X., Nagel, J. and Potrykus, I. 1995. Transgenic perennial ryegrass(*Lolium perenne*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. *Plant Sci.* 108:209-217.
22. Spangenberg, G., Wang, Z. Y. and Potrykus, I. 1998. Biotechnology in forage and turf grass improvement. In: Frankel et al(Eds), *Monographs on theoretical and applied genetics*, Vol. 23, Springer Verlag, Heidelberg, p. 192.
23. Tingay, S., McElroy, D., Kalla, R., Fieg, S., Wang, M., Thronton, S. and Brettell, R. 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J.* 11:1369-1376.
24. Trifonova, A., Madsen, S. and Olesen, A. 2001. *Agrobacterium*-mediated transgene delivery and integration into barley under a range of *in vitro* culture conditions. *Plant Sci.* 162:871-880.
25. Usami, S., Morikawa, S., Takabe, I., and Machida, T. 1987. Absence in monocotyledonous plants of the diffusible plant factors inducing T-DNA circularization and *vir* gene expression in *Agrobacterium*. *Mol. Gen. Genet.* 209:221-226.
26. Van Wijk, A. J. P., Boonman, J. G. and Rumball, W. 1993. Achievements and prospectives in the breeding of forage grasses and legumes. In: Baker, M. J. (Eds), *Grasslands for our world*, SIR, Wellington, p. 116.
27. Wu, H., Sparks, C., Amoah, B. and Jones, H. D. 2003. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Rep.* 21:659-668.
28. Ye, X., Wang, Z. Y., Wu, X., Potrykus, I. and Spangenberg, G. 1997. Transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. *Plant Cell Rep.* 16:379-384.
29. Zhao, Z. -Y., Cai, T., Tagliani, L., Miller, M., Wang, N., Pang, H., Rudert, M., Schroeder, S., Hondred, D., Seltzer, J. and Pierce, D. 2000. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. *Plant Mol. Biol.* 44:789-798.
30. Zhong, H., Bolyard, M. G., Srinivasan, C. and Stickelen, M. 1993. Transgenic plants of turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. *Plant Cell Rep.* 13:1-6.

(접수일자 : 2004. 2. 16. / 채택일자 : 2004. 3. 25.)