

내열성 유전자 *DgP23* 을 도입한 형질전환 오차드그라스의 생산

김기용[†] · 장요순* · 박근제 · 최기준 · 성병렬 · 서 성 · 차준영** · 손대영**

Production of Transgenic Orchardgrass Overexpressing a Thermotolerant Gene, *DgP23*

Ki-Yong Kim[†], Yo-Soon Jang*, Geun Je Park, Gi Jun Choi, Byung Ryul Seong, Sung Seo, Joon-Yung Cha** and Daeyong Son**

ABSTRACT

To develop transgenic orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) resistant to high temperature, a thermotolerance gene, *DgP23*, was introduced into orchardgrass using *Agrobacterium*-mediated transformation method. PCR and Southern blot analyses using genomic DNA showed specific DNA band on agarose gel and hybridization signal on X-ray film in transgenic orchardgrass harboring the recombinant *DgP23* gene, but not in the wild type and empty vector control plants. RT-PCR and Southern blot analyses using total RNA also showed specific DNA band and hybridization signal. Transgenic orchardgrass did not show any morphological aberration both in the green house and field cultivation. Thermotolerance of transgenic plants was not detected in laboratory test, but may be detected in field test.

(Key words : *Agrobacterium*-mediated transformation, *DgP23* gene, Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.), Thermo-tolerance)

I. 서 론

우리나라에 도입된 대부분의 목초는 생육적 온이 15~21℃의 북방형 목초들로서 봄에 기온이 5℃ 이상으로 올라가면 자라기 시작하여, 20℃ 내외가 되는 5월과 6월에 생육이 가장 왕성하게 되고, 25℃ 이상이 되는 7월과 8월에는 생육이 거의 중지하는 하고기(summer depression)를 맞게 된다. 이러한 하고현상에 의해 생산량은 크게 저하되고 초지의 나지화(裸地化)가 촉진되며, 잡초의 침입에 의하여 부실 초지로 변하게 된다. 오차드그라스 (*Dactylis glomerata* L.)는 우리나라에서 재배 이용하고 있는 주요 화

본과 초종 중의 하나로서, 수량성, 사료가치 및 빠른 재생력 등의 많은 장점을 가지고 있지만, 다른 도입 목초와 마찬가지로 우리나라의 무더운 여름철 기후에서는 생육이 부진하거나 죽게 되는 하고현상이 단점으로 지적되고 있다. 따라서 우리나라에서 초지를 조성하여 목초를 생산하기 위해서는 내하고성 품종의 개발이 시급하다.

지금까지 목초의 신품종 육성은 도입육종 및 교잡육종 방법으로 연구되어 왔지만 (Choi 등, 2000; Choi 등, 2001a; Choi 등, 2001b; Rim 등, 2003; Rim 등, 2004), 전통 육종방법에 의한 신품종 육성은 많은 시간과 노력, 그리고

“이 논문은 농림기술개발과제 연구비 지원에 의하여 수행된 결과임.”

축산연구소 (National Livestock Research Institute, Chonan 330-801, Korea)

* 한국해양연구원 (Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan 425-744, Korea)

** 경상대학교 식물분자생물학 및 유전자조작연구소 (Plant Molecular Biology and Biotechnology Research Center, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea)

[†] Corresponding author : Ph. D. Ki-Yong Kim, National Livestock Research Institute, Chonan 330-801, Korea.

Tel: +82-41-580-6751, Fax: +82-41-580-6779, E-mail: kimky77@rda.go.kr

넓은 포장이 요구될 뿐만 아니라, 이렇게 고정된 품종의 내성은 한계가 있기 때문에, 최근에는 좀 더 강한 내성 품종을 효율적으로 육성하기 위해 유전공학 기술을 도입하기 시작하였다. 하고현상을 일으키는 식물들은 내열성 유전자의 발현량이 적은 것이 특징이므로, 이들 식물에 내열성 유전자를 도입하게 되면 하고현상을 극복할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 형질전환기법을 이용한 새로운 목초 개발은 90년대 후반부터 활발하게 연구되고 있는데, 오차드그라스의 재분화 및 형질전환 연구에는 Kim 등 (1998), Lee 등 (2000a), Lee 등 (2001), Bae 등 (2002), Kim 등 (2003a), Kim 등 (2004b), Lee 등 (2005) 등의 연구논문이 발표되었으며, 알팔파와 버즈풋 트레포일 등 두과목초의 재분화 및 형질전환 연구에는 Kim 등 (1999a), Kim 등 (1999b), Kim 등 (2001a), Kim 등 (2001b), Kim 등 (2001c), Kim 등 (2003b), Kim 등 (2004a), Kim 등 (2004c), Lee 등 (2000b), Son 등 (2001) 등의 연구논문이 발표되었다.

고온에서 특이적으로 발현하는 *DgP23* (DQ 172836)은 본 연구진이 오차드그라스로부터 분리한 내열성 관련 유전자로서 heat shock protein (hsp)의 일종인 Hsp90과 결합하여 많은 세포조절단백질의 folding에 관여하는 것으로 보고되고 있다 (Mollerup 및 Berchtold, 2005; Shirafuji 등, 2005; Harst 등, 2005; Gausdal 등, 2004; Zhu 및 Tytgat, 2004; Gold 및 Zhong, 2004; Wochnik 등, 2004). 본 연구에서는 *DgP23* 유전자를 CaMV 35S promoter에 의해 항상적으로 발현되도록 조절하여 고온에 내성을 갖는 오차드그라스를 개발하기 위해, 식물체 형질전환용 발현벡터를 재조합한 다음, *Agrobacterium*을 매개로 하여 오차드그라스에 *DgP23* 유전자를 도입하였으며, 형질전환체로부터 genomic DNA 및 total RNA를 분리하여 PCR, RT-PCR 및 Southern blot 분석을 실시함으로써 유전자의 도입 및 발현을 조사하고, 형질전환체의 고온내성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료, 균주 및 배지

식물재료로는 오차드그라스 (*Dactylis glomerata* L.) 품종 중 Potomac을 사용하였으며, Kim 등 (1998)의 방법으로 종자유래의 캘러스를 유도하였다. 유전자를 도입하기 위한 binary vector로는 CaMV (cauliflower mosaic virus) 35S promoter에 의해 도입 유전자의 항상적 발현을 유도하는 pCAMBIA 1300 PT 벡터를 사용하였다. *Agrobacterium tumefaciens*의 strain은 GV3101을 사용하였으며, *Agrobacterium*은 YEP 배지(0.5% beef extract, 0.1% yeast extract, 0.5% peptone, 0.5% sucrose, pH 7.2)에서 28°C로 유지하며 약 2일간 배양하였다.

2. 오차드그라스 형질전환용 발현벡터 (pCAMBIA1300PT/*DgP23*)

오차드그라스 형질전환용 pCAMBIA1300PT/*DgP23* 발현벡터를 재조합하기 위해 약 0.9 kb의 *DgP23* 서열을 pCAMBIA 1300 PT 벡터의 CaMV 35S promoter 아래쪽에 오도록 ligation 하였다(Fig. 1).

3. 형질전환 오차드그라스의 재분화

재조합한 pCAMBIA1300PT/*DgP23* 발현벡터를 Holster 등 (1978)의 freeze-thaw 방법으로 *Agrobacterium*에 도입하고, 종자유래의 캘러스를 준비하여 Lee 등 (2001)의 방법으로 오차드그라스를 형질전환 하였다. *Agrobacterium*으로 감염시킨 오차드그라스 캘러스는 ONCoC 고체 배지 (N6 salt, vitamin mix, 3% sucrose, 1% glucose, 100 µM acetosyringone, 0.2% gelrite, pH 5.2)에 옮겨 28°C 암상태에서 3일간 co-culture를 실시하였다. 그 다음 캘러스 선발배지 (ONCS: N6 salt, vitamin mix, 3% sucrose, 2% casein, 2 mg/

l dicamba, 0.5 % gelrite, 250 mg/*l* cefotaxime, 30 mg/*l* hygromycin, pH 5.8)에 옮겨 약 5주간 배양 후, 식물체 재분화배지 (ONPR: N6 salt, vitamin mix, 2 % sucrose, 2 % sorbitol, 2 % maltose, 1 mg/*l* NAA, 5 mg/*l* kinetin, 2.5 mg/*l* dopper, 0.5 % gelrite, 250 mg/*l* cefotaxime, 50 mg/*l* hygromycin, pH 5.8)에서 지속적으로 배양하여 shoot의 분화를 유도하였다. 유도된 shoot로부터 root를 유도하기 위해 N6 salt의 양을 절반으로 줄인 N6 배지에서 배양하였으며, 재분화된 형질전환체는 온실에서 순화과정을 거쳤다.

4. Genomic DNA 분리 및 PCR 분석

오차드그라스 식물체로부터 genomic DNA의 분리는 CTAB 방법 (Murray and Tompson, 1980)으로 실시하였다. 형질전환체의 PCR 분석은 forward primer로 35S-s1 (5'-TTCAACAAAGGGTAATATCCGG-3') primer를, reverse primer로 *DgP23-s2* (5'-CGAGATCTTCATGGCTTTGCTTCATCCGTGG-3') primer를 합성하여 이용하였다. PCR 증폭은 ExTaq polymerase (Takara, Japan)를 이용하여 Personal Cycler (Biometra, Germany)로 실시하였다. PCR 반응은 95°C에서 1분간 genomic DNA를 변성시킨 후, 95°C 1분간 denaturation, 55°C 1분 annealing, 72°C 1분간 extension 단계로 구성된 반응 cycle을 35회 실시한 후, final extension 반응은 72°C에서 10분간 실시하였다.

5. RNA 분리 및 reverse-transcription (RT) - PCR 분석

오차드그라스 형질전환체에서 *DgP23* 유전자의 발현을 확인하기 위하여 guanidine thiocyanate 방법 (McGookin, 1984)으로 total RNA를 분리하였다. reverse-transcription (RT) 반응은 2 µg의 total RNA를 준비하고, *DgP23-s2* primer를 이용하여 42°C에서 1시간 동안 실시하였다. PCR 반응은 95°C에서 2분간 1 cycle, [95°C에서

1분간 55°C에서 1 min, 72°C에서 2분] x 35 cycles, final extension은 72°C에서 10분간 실시하였다. PCR 반응에 사용한 primer set는 *DgP23-s1* (5'-CGCCATGGATGAGTCGCCACCCGAGC-3') primer 및 *DgP23-s2* primer 조합이다. 증폭한 RT-PCR 산물은 1.2 % agarose gel 상에서 전기영동하여 ethidium bromide (EtBr) 염색으로 확인하였다.

6. Southern blot 분석

Southern blot 분석은 PCR 및 RT-PCR 산물을 이용하여 실시하였다. DNA를 1% agarose gel 상에서 전기영동하여 nylon membrane (Amersham pharmacia biotech)으로 DNA를 전이시켰다. Prehybridization 반응은 prehybridization buffer (50% formamide, 5x SSPE, 5x Denhardt's solution, 0.1% SDS 및 0.1 mg/ml denatured salmon sperm DNA)에서 42°C, 1~2시간 동안 실시하였다. Hybridization 반응은 [α -³²P] dCTP로 표지된 *DgP23* DNA fragment를 probe로 이용하여 prehybridization buffer 내에서 하루 밤 동안 실시하였다. Hybridization 후, membrane은 2x SSC 및 0.1 % SDS 용액으로 실온에서 10분간 2회, 1x SSC 및 0.1 % SDS 용액으로 65°C에서 15분간 1회, 0.1x SSC 및 0.1 % SDS 용액으로 65°C에서 15분간 2회 washing한 다음, -70°C에서 2~3일간 X-ray film (Kodak)에 노출시켰다.

III. 결과 및 고찰

1. 형질전환 오차드그라스 생산 및 확인

고온에 강한 내하고성 오차드그라스 형질전환체를 개발할 목적으로 형질전환용 pCAMBIA1300PT/*DgP23* 벡터를 제작하였다 (Fig 1). pCAMBIA1300PT/*DgP23* 벡터는 CaMV 35S 프로모터를 가지고 있어서 도입 유전자가 항상적으로 발현되도록 조절하였으며, *Agrobacterium*을 이용해 형질전



Fig. 1. A schematic diagram of plant expression vector, pCambia1300/*DgP23*, for the transformation of orchardgrass. Hygromycin(R), hygromycin regestance gene; 35S-P, CaMV 35S promoter; *DgP23*, thermotolerance gene isolated from orchardgrass; Nos-T, nos terminator.

환하는 방법으로 오차드그라스에 유전자를 도입하였다. *DgP23* 유전자는 스스로 molecular chaperone의 기능을 가지며, Hsp90과 함께 작용하기도 한다고 보고되어 있다 (Mollerup 및 erchtold, 2005; Shirafuji 등, 2005; Harst 등, 2005; Gausdal 등, 2004; Zhu 및 Tytgat, 2004; Gold 및 Zhong, 2004; Wochnik 등, 2004)

Fig. 2에서 A는 hygromycin 첨가배지에서 살아남는 캘러스를 선발하여 재분화배지에 옮겨 준 사진, B는 A를 확대한 사진, C는 재분화된 식물체 사진, D는 온실에서 순화과정을 거쳐 재배중인 사진이다. 오차드그라스의 캘러스를

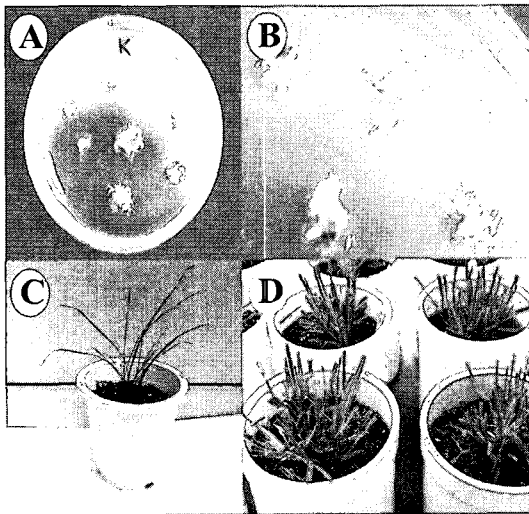


Fig. 2. Plant regeneration from transgenic callus on regeneration medium containing 50 mg/ℓ of hygromycin and acclimation of transgenic plants in greenhouse. A & B, Regeneration step; C & D, Transgenic plants.

유도하고 외래 유전자를 도입하여 재분화하는 과정은 이미 국내에서 여러 논문들이 발표되어 있기 때문에 (Kim 등, 1998; Lee 등, 2000a; Lee 등, 2001; Bae 등, 2002; Kim 등, 2003a), 시행착오 없이 형질전환체를 생산할 수 있었다. 재분화된 식물체는 환경 스트레스 내성 관련 유전자의 형질전환 시에 빈번하게 나타나는 것으로 알려진 위조현상과 같은 표현형상의 뚜렷한 변이 (Lagrimini, 1991; Lagrimini 등, 1997) 는 나타내지 않았다.

오차드그라스 형질전환체, 비형질전환체 및 기본벡터만을 도입한 식물체로부터 genomic DNA를 분리하여 35S-s1 (5'-TTCACAAAGG GTA ATATCCGG-3') primer 및 *DgP23*-s2 (5'-GCGT CGACTCACTCACTAATCATCGA-3') primer를 이용하여 PCR 반응을 실시 후, *DgP23* DNA 단편을 probe로 하여 Southern blot 분석을 실시한 결과, 형질전환체의 경우에는 X-ray film 상에 분명한 hybridization signal이 나타난 반면, wild type 및 empty vector control에서는 hybridization signal이 관찰되지 않았다 (Fig. 3). 이러한 Southern 분석 결과에서 재조합 *DgP23* 유전자가 오차드그라스 genome 내로 정확히 도입되었음을 확인할 수 있었다. 재조합 *DgP23* 유전자를 가지고 있는 오차드그라스 형질전환체 40 개체를 선발하여, 기내에서 충분히 뿌리를 유도한 다음, 배양토가 담긴 화분에 옮겨 심고 순화과정을 거치면서 RNA 분석을 실시하였다.

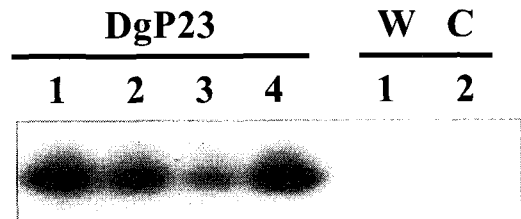


Fig. 3. Confirmation of transgenic plants by PCR and Southern blot analyses using genomic DNAs from wild-type (W), transgenic empty vector coltrol (C) and transgenic plants with recombinant *DgP23* gene(four lines of *DgP23*).

2. RT-PCR 및 Southern blot 분석

오차드그라스 형질전환체에서 재조합 *DgP23* 유전자가 정상적으로 발현되는지를 확인하기 위해 total RNA를 분리하여 RT-PCR 및 Southern blot 분석을 실시한 결과, 예상대로 wild type 대조구에서는 재조합 *DgP23* 유전자의 발현이 관찰되지 않았다. 대부분의 형질전환체에서는 유전자의 정상적 발현이 확인되었다 (Fig. 4). 재조합 *DgP23* 유전자의 도입이 확인된 형질전환체 40 개체 중에서 5 개체는 발현이 거의 없거나 아주 미미한 발현을 나타냈다. 재조합 *DgP23* 유전자의 발현량에 관계없이 기내 및 화분에서 배양할 때 모두 형질전환체의 형태적 차이를 나타내지는 않았다.

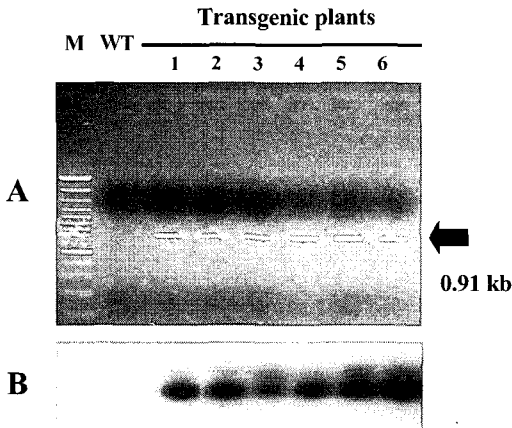


Fig. 4. Confirmation of transgenic plants by RT-PCR and Southern blot analyses using total RNAs from wild-type (WT) and transgenic plants. The numbers (1~6) indicate independent transgenic lines. (A) Agarose gel electrophoresis using RT-PCR products. (B) Southern blot analysis using RT-PCR products.

재조합 *DgP23* 유전자로 형질전환된 오차드그라스 식물체는 현재 온실 및 GMO 격리포장에서 재배하며 영양체를 보존하고 있으며, 포장조건에서 생육특성을 조사한 결과 형질전

환되지 않은 식물체와 형태적 차이는 나타나지 않았다(Fig. 5). 한편 본 연구팀에서 생산한 *DgHSP17.2* 유전자를 도입한 오차드그라스 형질전환체 (미발표)는 실험실 조건에서 형질전환되지 않은 대조구에 비해 고온내성이 있는 것으로 확인되었는데, 동일한 방법으로 *DgP23* 형질전환체를 조사했을 때에는 고온내성이 확인되지 않았다. 그래서 형질전환 종자를 생산하여 포장에서 재배시험을 통해 내성검정을 다시 실시할 계획이다. *DgP23* 형질전환체에서도 고온내성이 확인될 경우, *DgHSP19.6* 형질전환체와 비교하여 고온내성이 강한 계통을 선발하고, 재배시험 및 안전성검정을 거쳐 새로운 내하고성 오차드그라스 품종으로 육성할 계획이다.

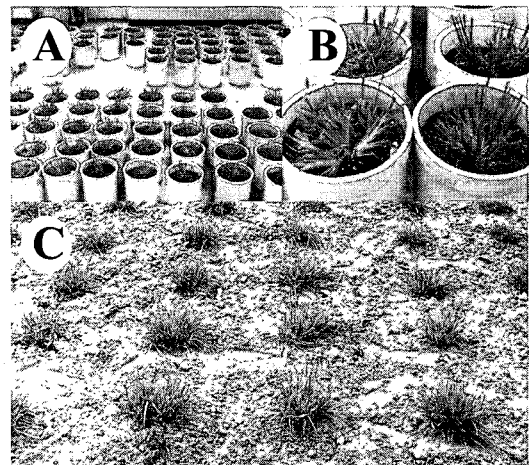


Fig. 5. Cultivation and reservation of transgenic orchardgrass lines in green house (A & B) and field.

IV. 요약

고온 내성 오차드그라스를 개발하기 위하여, 재조합 *DgP23* 유전자에 CaMV 35S 프로모터를 붙여 발현벡터를 제작, *Agrobacterium* 형질전환 방법으로 오차드그라스 형질전환체를 생산하였다. Genomic DNA를 분리하여 PCR 및

Southern blot 분석을 실시한 결과, PCR 분석에서 *DgP23* 유전자의 DNA band가 관찰되었고, Southern blot 분석에서도 X-ray film 상에 hybridization signal이 관찰되어, 오차드그라스 genome에 *DgP23* 유전자의 도입이 확인되었으며, wild type 및 empty vector control에서는 DNA band 및 hybridization signal이 관찰되지 않았다. 또한 RT-PCR 및 이들 산물의 Southern blot 분석 결과, *DgP23* 유전자의 정상적인 발현이 확인되었다. 형질전환 오차드그라스를 온실 및 포장에서 재배하며 생육특성을 조사한 결과, 비형질전환체와 비교하여 형태적 차이는 나타나지 않았다. 실험실 조건에서 고온내성을 조사한 결과, 고온내성이 확인되지 않았기 때문에 형질전환 종자를 생산하여 포장조건에서 고온내성을 검정할 계획이며, 재배시험에서는 내성이 강한 개체를 선발할 수 있을 것으로 예상된다.

V. 인용 문헌

- Bae, E.K., I.A. Lee, K.Y. Kim, B.H. Lee, D.Y. Son, H.S. Lee, M.S. Chung and J. Jo. 2002. Comparison of callus formation ratios from seed explants, callus sizes and regeneration efficiency among several Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) varieties. J. Korean Grassl. Sci. 22:93-100.
- Choi, G.J., Y.W. Rim, K.Y. Kim, S.H. Choi, B.R. Sung, W.H. Kim, D.E. Shin and Y.C. Lim. 2000. A cold-tolerant and high-yielding italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) new variety "Hwasan 101". J. Korean Grassl. Sci. 20:1-6.
- Choi, G.J., Y.W. Rim, Y.C. Lim, K.Y. Kim, B.R. Sung, M.J. Kim, G.J. Park and S.R. Kim. 2001a. Growth characters and productivity of new italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) variety "Hwasan 102". J. Korean Grassl. Sci. 21:157-162.
- Choi, G.J., Y.W. Rim, Y.C. Lim, K.Y. Kim, B.R. Sung, S.H. Choi and G.J. Park. 2001b. Growth characters and productivity of new italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) variety "Hwasan 103". J. Korean Grassl. Sci. 21:163-168.
- Gausdal, G., B.T. Gjertsen, K.E. Fladmark, H. Demol, J. Vandekerckhove and S.-O. Døskeland. 2004. Caspase-dependent, geldanamycin-enhanced cleavage of co-chaperone p23 in leukemic apoptosis. Leukemia. 18:1989-1996.
- Gold, B.G. and Y.P. Zhong. 2004. FK506 requires stimulation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 and the steroid receptor chaperone protein p23 for neurite elongation. Neurosignals. 13:122-129.
- Harst, A., H. Lin and W.M. Obermann. 2005. Aha1 competes with Hop, p50 and p23 for binding to the molecular chaperone Hsp90 and contributes to kinase and hormone receptor activation. Biochem. J. 387:789-796.
- Holsters, M., O.D. Wael, A. Depicker, E. Messens, M.V. Montagu and J. Schell. 1978. Transfection and transformation of *A.tumefaciens*. Mol. Gel. Genet. 163:181-187.
- Kim, K.Y., Y.W. Rim, K.J. Choi, J.S. Shin, J.G. Kim and J. Jo. 1998. Rapid regeneration of plants on N6 medium from orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) calli. J. Korean Grassl. Sci. 18:267-272.
- Kim, K.Y., Y.W. Rim, K.J. Choi and B.R. Ryul Sung. 1999a. Callus induction from seeds of birdsfoot trefoil and plant regeneration on BOi2Y medium. J. Korean Grassl. Sci. 19:303-308.
- Kim, K.Y., Y.W. Rim, K.J. Choi, Y.S. Jang, W.H. Kim, S. Seo, B.H. Lee and J. Jo. 1999b. Callus formation from alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed and plant regeneration from alfalfa calli. J. Korean Grassl. Sci. 19:23-30.
- Kim, K.Y., B.R. Sung, Y.W. Rim, G.J. Choi, Y.C. Lim, Y.S. Jang, E.S. Chung, W.H. Kim and J.G. Kim. 2001a. Transformation of birdsfoot trefoil by *BcHSP17.6* gene using *Agrobacterium tumefaciens*. J. Korean Grassl. Sci. 21:145-150.
- Kim, K.Y., B.R. Sung, Y.W. Rim, G.J. Choi,

- Y.C. Lim, Y.S. Jang, S. Seo, S.H. Yoon, G.J. Park and J. Jo. 2001b. Transformation of alfalfa by *BcHSP17.6* gene using *Agrobacterium tumefaciens*. J. Korean Grassl. Sci. 21:151-156.
14. Kim, K.Y., G.J. Choi, B.R. Sung, Y.W. Rim, Y.C. Lim, Y.S. Jang and W.H. Kim. 2001c. Root initiation in cut birdsfoot trefoil stems by treatment of IBA. J. Korean Grassl. Sci. 21:35-38.
15. Kim, K.Y., K.M. Kang, E.K. Bae, I.A. Lee, Y.W. Rim, G.J. Choi, G.J. Park, D. Son and J. Jo. 2003a. Callus formation ratio and regeneration efficiency of orchardgrass varieties developed in Korea. J. Korean Grassl. Sci. 23:59-64.
16. Kim, K.Y., K.M. Kang, G.J. Park, E.K. Bae, I.A. Lee, B.H. Lee, S.S. Kwak and J. Jo. 2003b. Examination of root induction ratio for regeneration of alfalfa by medium component. J. Korean Grassl. Sci. 23:95-100.
17. Kim, K.Y., K.M. Kang, B.R. Sung, M.J. Kim, Y.W. Rim, W.H. Kim, G.J. Park and B.H. Lee. 2004a. Determination of heat killing temperature of alfalfa (*Medicago sativa* L.). J. Korean Grassl. Sci. 24:21-24.
18. Kim, K.Y., K.M. Kang, Y.W. Rim, G.J. Park, Y.C. Lim, S. Seo, D. Son and J. Jo. 2004b. Determination of heat killing temperature of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). J. Korean Grassl. Sci. 24:25-28.
19. Kim, K.Y., Y.J. Choi, Y.W. Rim, B.R. Sung, S.J. Lee, J.S. Yang, B. Hahn, J.B. Kim and B.H. Lee. 2004c. Determination of heat killing temperature of birdsfoot trefoil and italian ryegrass. J. Korean Grassl. Sci. 24:341-346.
20. Lagrimini, L.M. 1991. Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. Plant Physiol. 96:577-583.
21. Lagrimini, L.M., R.J. Joly, J.R. Dunlap and T.T. Liu. 1997. The consequence of peroxidase over-expression in transgenic plants on root growth and development. Plant Mol. Biol. 33:887-895.
22. Lee, H., Y. Kwon, B.H. Lee, S.H. Won, K.Y. Kim and J. Jo. 2000a. Plant regeneration from embryogenic suspension culture of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). J. Korean Grassl. Sci. 20:7-12.
23. Lee, B.H., S.H. Won, H. Lee, K.Y. Kim and J. Jo. 2000b. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of alfalfa using secondary somatic embryogenic callus. J. Korean Grassl. Sci. 20:13-18.
24. Lee, H., E. Bae, K.Y. Kim, S. Won, M. Chung and J. Jo. 2001. Transformation of Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) with Glutathione Reductase Gene. J. Korean Grassl. Sci. 21:21-26.
25. Lee, K.W., S.H. Lee, D.G. Lee, H.S. Woo, D.H. Kim, M.S. Choi, K.Y. Kim, H. Lee and B.H. Lee. 2005. Effect of plant growth regulators and antioxidants on callus induction and plant regeneration from seed culture of orchardgrass. J. Korean Grassl. Sci. 25:191-198.
26. McGookin, R. 1984. RNA extraction by the guanidine thiocyanate procedure. In: Walker JM (ed), Methods in Molecular Biology. Vol. 2, Humana Press, New Jersey, pp113-116.
27. Mollerup, J. and M.W. Berchtold. 2005. The co-chaperone p23 is degraded by caspases and the proteasome during apoptosis. FEBS Letters 579:4187-4192.
28. Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321-4325.
29. Rim, Y.W., G.J. Choi, B.R. Sung, Y.C. Lim, M.J. Kim, G.J. Park, K.Y. Kim, J.W. Chung and N.G. Park. 2003. Growth characteristics and productivity of new orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) variety "Jangbeol 101". J. Korean Grassl. Sci. 23:207-210.
30. Rim, Y.W., G.J. Choi, B.R. Sung, Y.C. Lim, M.J. Kim, G.J. Park, K.Y. Kim, J.W. Chung and S.B. Go. 2004. Growth characteristics and productivity of new orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) J. Korean Grassl. Sci. 24:261-264.
31. Shirafuji, H., X. Xuan, I. Kimata, Y. Takashima, S. Fukumoto, H. Otsuka, H. Nagasawa and H.

- Suzuki. 2005. Expression of P23 of *Cryptosporidium parvum* in *Toxoplasma gondii* and evaluation of its protective effects. *J. Parasitol.* 91:476-479.
32. Son, D., K.Y. Kim, Y.S. Jang, H. Lee, S.H. Won, B.H. Lee, M.H. Kim and J. Jo. 2001. Root initiation in cut alfalfa stems by treatment of IBA. *J. Korean Grassl. Sci.* 21:27-30.
33. Wochnik, G.M., J.C. Young, U. Schmidt, F. Holsboer, F.U. Hartl and T. Rein. 2004. Inhibition of GR-mediated transcription by p23 requires interaction with Hsp90. *FEBS Letts* 560:35-38.
34. Zhu, S. and J. Tytgat. 2004. Evolutionary epitopes of Hsp90 and p23: implications for their interaction. *FASEB J.* 18:940-947.