

Agrobacterium법에 의한 Panicum속 식물들의 효과적인

형질전환에 영향을 미치는 요인

서미숙^{1,2} · 다카하라 마나부² · 다카미조 타다시²

Factors Influencing Efficient Agrobacterium-mediated Transformation of Panicum spp.

Mi-Suk Seo^{1,2}, Manabu Takahara² and Tadashi Takamizo²

ABSTRACT

Molecular techniques such as genetic transformation are powerful tools that can be used for the genetic modification of warm-season grasses. The *P. meyerianum* with high regeneration ability was used for establishing an *Agrobacterium*-mediated transformation system. We investigated various factors affecting *Agrobacterium* infection by examining GUS gene expression of pCAMBIA1304 vector. Among various concentration of acetosyringone and betaine tested for inoculation and co-cultivation, 10 mg/L acetosyringone and 60 mg/L betaine resulted in the highest transformation frequency in terms of GUS expression. The calli of 4 species of *Panicum* spp. with excellent tissue culture response were inoculated with *Agrobacterium* under the optimal infection conditions. The high activity of GUS gene was observed in all species and hygromycin-resistant calli expressing GFP were obtained in *P. meyerianum*, *P. longijubatum*, *P. stapfianum* and guineagrass Noh-PL1. Co-cultivated calli were transferred onto the selection medium containing hygromycin, and the hygromycin resistant calli were selected after 3 months. Hygromycin-resistant plantlets were then successfully regenerated from the calli and grown in a greenhouse. We confirmed stable insertion of *hpt* gene among the hygromycin-resistant plantlets of *P. meyerianum* by PCR analysis.

(Key words : *Agrobacterium*, Acetosyringone, Betaine, *Panicum* spp.)

I. 서론

최근 지구온난화 현상에 따른 고온다습한 기후변화와 함께 국제유가 및 곡물가격 급등에 따른 사료가격 상승으로 농업 전반에 걸쳐 많은 문제점이 증대되어 가고 있다. 이러한 상황에 대처하기 위해서는 하고현상의 영향을 받는 한지형 목초보다 생산량이 높고 고온에서 잘

견디는 난지형 목초의 도입이 시급할 것으로 사료된다. 또한 난지형 목초의 경우 재배가 용이하고 다수확성의 특징 때문에 최근에는 재생에너지 생산을 위한 바이오매스 작물로서 산업적·연구적 측면에서 주목을 모으면서 전세계적으로 재배면적이 확대되어 가고 있다(Vogel 등, 2002).

화본과의 하나인 *Panicum*속은 아열대 혹은

¹ 농촌진흥청 국립농업과학원 (National Academy of Agricultural Science, RDA)

² 일본축산초지연구소 (National Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

Corresponding author: Dr. Mi-Suk Seo, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon, 441-707, Korea. Tel: +82-31-299-1632, Fax: +82-31-299-1636, E-mail:sms1030@korea.kr

열대지역을 중심으로 약 450종 정도가 분포되어 있으며, 대부분 다년생 식물로 아열대 지방에 분포하는 식물은 초장이 1~3 m에 달한다 (Zuloaga 등, 1987). 특히 전세계적으로 재배되고 있는 기장(*Panicum miliaceum* L.)을 비롯하여 기니아그라스(*Panicum maximum* Jacq.), 스위치그라스(*Panicum virgatum* L.) 등의 중요한 난지형 목초 혹은 사료작물들이 *Panicum*속에 속한다 (Carvalho 등, 2006). 한편, 기니아그라스와 같은 몇몇 식물들은 아포믹시스(apomixis)와 같은 무성생식을 통하여 수분·수정과 관계 없이 모계의 고유형질이 그대로 고정되는 장점을 가지고 있다. 반면에 아포믹시스의 경우, 모계 유전을 통하여 종자를 생산하기 때문에 인위적인 교배와 선발을 통하여 우수 품종을 육성하는 기존의 전통적 육종 방식에 의한 품종 개량이 어렵다는 단점을 가지고 있다 (Nakajima와 Mochizuki, 1983). 최근 농업에서 활발하게 사용되는 분자유종 기술은 유용 유전자를 발굴하여 식물에 도입하는 기법으로 이러한 단점을 보완할 수 있기 때문에 *Panicum*속 식물들의 유전적 개량을 통한 신품종 육성에 적극 활용될 수 있을 것이다. 따라서 분자 육종 기술을 *Panicum*속 식물들에 활용한다면 우리나라의 농업실정에 맞는 고품질 사료작물의 개발 및 고부가가치성 작물의 창출이 가능할 것이라고 사료된다.

다양한 분자생물학적 기법을 통해 밝혀진 농업적 유용 유전자들을 *Panicum*속 식물들에 적용하기 위해서는 조직배양을 통해 유용 유전자를 형질전환할 수 있는 기술의 개발이 병행되어야 할 것이다. 난지형 화분과 식물들의 경우, 조직배양을 통한 식물 재분화 및 형질전환이 매우 까다롭기 때문에 현재까지 버뮤다그라스 (Goldman 등, 2004), 바히아그라스 (Gondo 등, 2005), 스위치그라스 (Somleva 등, 2002) 그리고 로즈그라스 (Gondo 등, 2009)를 포함한 4종에서

만 형질전환계가 개발되었고, *Panicum*속 식물의 경우에는 오직 스위치그라스에서 형질전환을 성공한 바 있다. 특히 도입하고자 하는 유용 유전자를 식물세포에 안정적으로 운반하는 *Agrobacterium* 기법은 대상 식물의 조직배양의 용이성 및 효율성에 따라 성공 여부가 결정되기 때문에 조직배양이 까다로운 난지형 화분과 식물에서는 성공한 예가 극히 드물다.

최근 본 연구자는 기니아그라스를 포함한 *Panicum*속 식물들을 대상으로 효율적인 조직배양 조건의 검토와 함께 높은 조직배양 능력을 가진 3종의 식물들을 선발하여 보고한 바 있다 (Seo 등, 2008; Seo 등, 2010). 본 연구에서는 최적화된 조직배양조건을 이용하여 기니아그라스의 유성생식품종 Noh-PL1과 무성생식품종 Natsukaze, 그리고 높은 조직배양 능력을 가진 3종의 식물들을 대상으로 *Agrobacterium*법에 의한 형질전환 가능성을 검토하고자 하였다. 또한 효율적인 형질전환을 위하여 벼와 같은 단자엽식물에서 *Agrobacterium*의 효과적인 감염에 사용되는 acetosyringone과 betaine의 효과를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 캘러스 유도 및 배양

본 실험을 위한 식물재료는 일본 오키나와현 축산연구센터 (Okinawa Prefectural Livestock and Grassland Research Center)에서 육성된 기니아그라스(*Panicum maximum*)의 유성생식 품종 Noh-PL1과 아포믹시스 품종인 Natsukaze가 사용되었다. 또한 앞선 보고 (Seo 등, 2008, 2010)에서 높은 조직배양 능력을 가진 것으로 조사된 *Panicum meyerianum*, *Panicum longijubatum*, *Panicum stapfianum*을 본 실험의 재료로 사용하였다.

P. meyerianum, *P. longijubatum*, *P. stapfianum*의 성숙종자는 종피를 제거한 뒤 70% 에탄올로 1분간 표면살균하고 2% Sodium hypochlorite 용액으로 20분간 교반하면서 살균하였다. 살균된 종자는 멸균수로 3회 세정한 후 물기를 제거한 다음 캘러스 유도배지에 치상하고, 25°C 암조건에서 4주간 배양하였다. 기본적인 캘러스 유도배지는 Seo 등 (2008)에 준하여 30 g/L sucrose, 4 mg/L 2,4-D, 3 g/L gelrite를 함유한 MS 배지 (Murashige와 Skoog, 1962)를 사용하였다.

기니아그라스의 두 품종은 미성숙배로부터 캘러스를 유도하기 위하여 온실에서 약 3달간 자란 식물체를 교배시킨 다음 미성숙배를 채취하였다. 미성숙배는 종피를 제거한 후 성숙종자와 같은 방법으로 표면 살균하고 멸균수로 세정한 후 현미경으로 관찰한 다음 핀셋을 이용하여 미성숙종자로부터 분리되었다. 분리된 미성숙배는 상기와 동일한 캘러스 유도배지에 치상하여 25°C에서 약 3개월간 암배양하였다. 모든 캘러스는 5주간격으로 동일한 배지에 계대배양하여 캘러스를 유지·증식시켰다.

2. 형질전환용 벡터 및 *Agrobacterium* 감염

형질전환 조건을 검토하기 위하여, GUS:GFP 발현벡터 pCAMBIA 1304 (R. Jefferson, CAMBIA, Australia) binary 벡터를 사용하였다 (Fig. 1). 벡터는 CaMV 35S 프로모터 하류에 GUS::GFP 유전자를 가지고 있으며, hygromycin 저항성 캘러스의 선발을 위한 hygromycin phospho-

transferase (*hpt*) 유전자를 포함하고 있다. 벡터는 *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105에 형질전환한 후 kanamycin 100 mg/L를 함유한 YEP 고형배지에 접종한 다음 28°C에서 암상태로 하루 동안 배양하였다. 선발된 colony는 acetosyringone (AS)을 함유한 AA 액체배지 (Toriyama와 Hinata 1985)에 OD₆₀₀에서 0.8의 농도값이 되도록 현탁한 후 캘러스의 감염에 사용하였다. 캘러스는 *Agrobacterium*을 현탁한 액체 감염 배지에 5분간 침지시킨 후 여분의 감염액을 제거한 뒤 멸균된 filter paper가 올려진 공동배양 배지 (MS medium, 4 mg/L 2,4-D, 10 g/L glucose, 4 g/L gelrite, pH 5.2)에 치상하여 28°C에서 3일간 암배양하였다.

*Agrobacterim*의 감염효율에 영향을 미치는 AS와 betaine의 효과를 조사하기 위하여 *P. meyerianum*의 성숙종자 유래 캘러스를 이용하여 AA 감염액과 공동배양 배지에 AS를 각각 10, 30, 50, 100 mg/L 첨가하여 감염시킨 후 공동배양하였다. 또한 조사된 AS 농도를 바탕으로 betaine이 60, 120, 150 mg/L가 각각 첨가된 공동배양 배지에 감염된 캘러스를 배양하였다. 배양이 끝난 캘러스는 100 mg/L carbenicillin을 첨가한 멸균수로 3회 세정하여 표면의 *Agrobacteria*를 제거한 뒤, filter paper 위에서 여분의 물기를 제거한 다음 250 mg/L carbenicillin이 첨가된 캘러스 증식 배지 (캘러스 유도배지와 같은 조성)에 치상하여 25°C 암조건에서 일주일간 배양한 후 각 요인에 따른 감염 효과를 검증하였다.

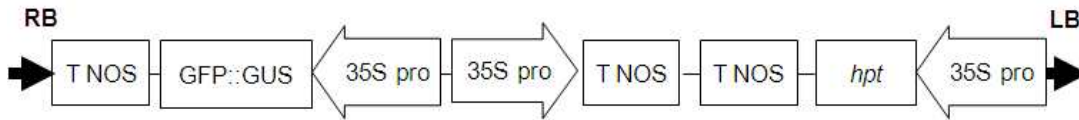


Fig. 1. Schematic diagram of part of the T-DNA region of vector pCAMBIA1304. RB, Right border; LB, Left border; 35S PRO, Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter; HPT, hygromycin phosphotransferase; GFP, Green fluorescent protein; GUS, β-glucuronidase; T Nos, Nopaline synthase terminator.

3. 저항성 캘러스의 선발과 식물체 재분화

공동배양이 끝난 캘러스는 상기와 같은 방법으로 표면의 *Agrobacterium*를 제거한 뒤, 50 mg/L hygromycin, 250 mg/L carbenicillin 이 첨가된 캘러스 증식 배지(선발 배지)에 치상하였다. 캘러스는 25°C 암조건에서 약 3개월간 배양하여 hygromycin 저항성 캘러스만을 선발하였다. 선발된 캘러스는 50 mg/L hygromycin을 첨가한 재분화 배지(MS medium, 30 g/L maltose, 1 mg/L TDZ, 4 g/L gelrite, 250 mg/L carbenicillin)에 이식하여 저항성 유식물체를 획득한 다음, 30 mg/L hygromycin이 첨가된 MS 기본배지에서 발근을 유도한 후, pot로 이식하여 온실에서 재배하였다.

4. GUS 및 GFP 분석

GUS 유전자의 발현 여부를 측정하기 위하여 Kosugi 등(1990)의 방법에 준하여 공동배양이 끝나고 7일이 경과한 캘러스를 대상으로 GUS 염색을 실시하였다. 또한 GFP 유전자의 발현을 관찰하기 위하여 선발배지에서 선발된 hygromycin 저항성 캘러스를 대상으로 형광현미경 관찰을 통해 유전자의 도입 여부를 관찰하였다.

5. PCR 분석

유전자의 도입 여부를 확인하기 위하여 형질 전환 식물체의 어린잎 100 mg을 액체질소로 분쇄한 후 genomic DNA를 분리하였다(Shure 등, 1983). 분리한 DNA는 375 bp *hpt* 유전자 특이적 프라이머 5'-CGCATAACAGCGGTCATTG-ACTGGAGC-3' (forward)와 5'-GCTGGGGCGTC-GGTTTCCACTATCCG-3' (reverse)를 사용하여 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 1분에서 30 cycles 반응 조건으로 PCR (polymerase chain reaction)

분석을 실시하였다. PCR 산물은 1% agarose gel에서 100 volt, 25분간 전기영동을 통하여 밴드를 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

1. *Agrobacterium*의 감염효율에 영향을 미치는 요인

*Agrobacterium*을 이용한 형질전환 기법을 통해 식물 세포의 형질전환 효율을 증가시키기 위해서는 *Agrobacterium* 내의 T-DNA가 식물세포로 효과적으로 도입될 수 있는 감염 조건의 확립이 필수적이다. 따라서 *Panicum*속 식물들의 효율적인 형질전환을 위해서는 최적의 감염 조건을 확립하는 것이 매우 중요하다. 벼를 포함한 단자엽 식물의 캘러스에 *Agrobacterium*이 감염되기 위해서는 AS의 첨가가 필수적이라고 알려져 있다(Hiei 등, 1994). AS는 페놀계 화합물로서 *A. tumefaciens*의 virulence 영역의 전사를 활성화시키는 역할을 한다(Stachel 등, 1985). 본 실험에서는 *P. meyerianum*의 성숙종자 유래 캘러스를 재료로 사용하여 *Agrobacterium*의 감염효율에 영향을 미치는 AS의 효과를 GUS 유전자의 발현 여부를 통해 조사하였다(Table 1). 그 결과 10 mg/L AS를 첨가한 처리구에서 가장 높은 GUS 유전자의 활성을 관찰할 수 있었다. 또한 AS 농도가 10 mg/L 보다 높아질수록 GUS 유전자의 발현은 감소되는 경향을 보였고, 100 mg/L AS 처리구는 무첨가구보다 낮은 GUS 유전자의 발현이 관찰되었다. 낮은 농도의 AS는 식물세포에 *Agrobacterium*의 감염효율을 높이는 효과를 가지고 있으나, 높은 농도로 첨가할 경우 오히려 식물세포의 성장을 억제하여 유전자의 도입을 저해하는 역할을 할 것으로 추측된다.

공동배양 배지에 betaine의 첨가는 *Agro-*

Table 1. Effect of acetosyringone on transient GUS expression in mature seed-derived calli of *P. meyerianum*

Acetosyringone (mg/L)	No. of blue spots/1000 mg calli
0	104.34± 3.86
10	187.82±12.47
30	126.81± 5.47
50	108.21± 4.87
100	93.88± 5.36

Calli were co-cultured for 3 days at 28°C in the dark. Data showing the mean ± standard error from three independent experiments.

*bacterium*의 감염 효율에 영향을 나타내었다 (Fig. 2). 60, 120 mg/L betaine을 첨가한 처리구들에서는 무첨가구와 비교하여 높은 GUS 유전자의 발현이 관찰되었고 특히 60 mg/L를 첨가한 처리구에서는 가장 높은 GUS 유전자의 발현을 관찰할 수 있었다. 식물세포의 삼투 조절 물질로 알려진 betaine은 AS에 의한 *A. tumefaciens*의 vir 유전자들의 유도 작용을 촉진시키는 역할을 한다고 보고된 바 있다 (Vernade 등, 1988). 그러나 아직까지 식물세포

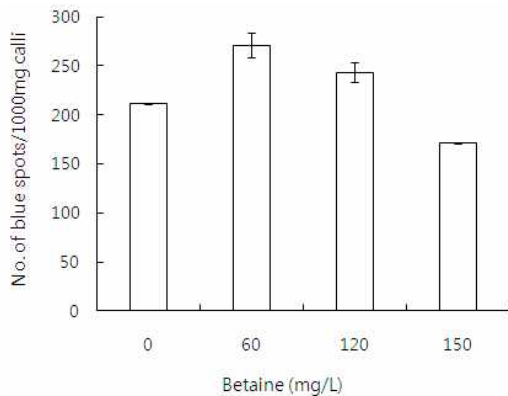


Fig. 2. The effect of betaine on GUS gene expression in calli of *P. meyerianum*. Calli were cultured on co-cultivation medium containing 10 mg/L acetosyringone for 3 days in the dark.

의 효과적인 형질전환을 위해 betaine이 사용된 연구는 많지 않고, 벼의 형질전환 연구에 일부 사용되고 있는 정도이다 (Lee 등, 1999).

본 실험의 결과 *Panicum*속 식물들의 *Agrobacterium*을 통한 형질전환에 있어서 AS와 betaine의 첨가는 식물세포에 유전자의 도입 효율을 증가시키는 효과가 있는 물질임이 확인되었으며, 이러한 연구결과는 다른 난지형 화분과 식물의 형질전환에도 적용될 수 있으리라 사료된다.

2. *Panicum*속 식물들의 형질전환

본 연구에서 밝혀진 최적의 *Agrobacterium* 감염조건을 적용하여 높은 조직배양 능력을 가진 *Panicum*속 식물들을 대상으로 유전자 도입 여부를 GUS 유전자의 발현에 의해 확인하였다 (Table 2, Fig. 3). 그 결과 모든 식물에서 높은 GUS 유전자의 발현이 확인되었으며, 특히 기니아그라스의 아포믹시스 품종인 Natsukaze와 *P. longijubatum*에서 높은 GUS 유전자의 발현이 관찰되었다. 또한 hygromycin을 첨가한 선

Table 2. Transient expression of GUS gene of *Panicum* spp. by optimal transformation conditions for *Agrobacterium* infection

<i>Panicum</i> species	Cultivar	No. of blue spots/1000 mg calli
<i>P. maximum</i>	Natsukaze	471.7
	Noh-PL1	258.5
<i>P. meyerianum</i>	—	283.4
<i>P. stapfianum</i>	—	212.5
<i>P. longijubatum</i>	—	563.3

Calli were immersed in the bacterial suspension for 5 min and then transferred to a co-culture medium (MS medium with 4 mg/L 2,4-D, 10 g/L glucose, 10 mg/L acetosyringone, and 60 mg/L betaine, pH 5.2). The calli were cultured for 3 days at 28°C in the dark.

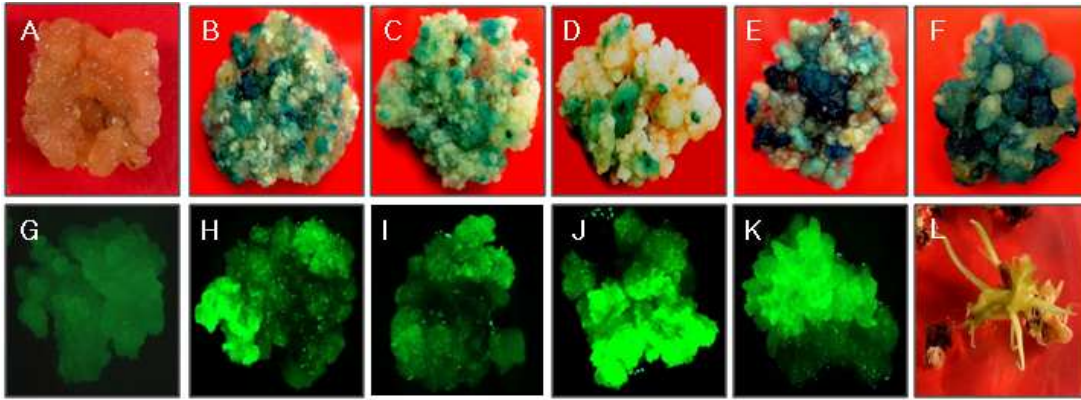


Fig. 3. Observation of GUS (A-F) and GFP (G-K) expression in *Panicum* spp. All calli were co-cultivated by optimal transformation conditions as described in Materials and Methods sections. A and G: nontransgenic callus of *P. meyerianum*, B and H: *P. longijubatum*, C and I: *P. stapfianum*, D, J and L: *P. meyerianum*, E and K: Guineagrass (*P. maximum*) cv. Noh-PL1, F: Guineagrass cv. Natsukaze. L: Hygromycin-resistant shoot regenerated from callus of *P. meyerianum*.

발배지에서 저항성을 보인 캘러스를 대상으로 GFP 유전자의 발현 여부를 확인한 결과, 모든 식물체들에서 GFP 유전자의 발현이 확인되었다 (Fig. 3). 따라서 이들 *Panicum*속 식물들은 본 실험에서 확인된 형질전환 조건을 활용할 경우, 효과적으로 외래 유전자가 식물체의 genome 내로 도입될 수 있음이 확인 되었다.

3. 도입 유전자의 확인

*P. meyerianum*의 hygromycin 저항성 유식물체는 genome내에 T-DNA 영역의 도입 여부를 확인하기 위하여 잎 조직으로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR 분석을 실시하였다 (Fig. 4). 그 결과 비형질전환 식물체에서는 어떠한 증폭산물도 관찰되지 않은 반면 형질전환 식물체에서는 375bp의 *hpt* 유전자 특이적 증폭산물이 관찰되었다. 따라서 *P. meyerianum* 형질전환체의 genome내에 T-DNA가 안정적으로 도입되었음을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 난지형 사료 작물의 *Agrobacterium* 법을 통한 형질전환을 위하여 공동배

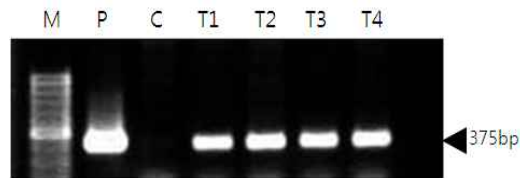


Fig. 4. Detection of the *hpt* gene by PCR analysis in hygromycin-resistant plants of *P. meyerianum* (T1-T4). M, Molecular marker (1 kb); P, plasmid DNA; C, nontransgenic plant.

양에 영향을 미치는 요인들을 검토하였다. 그 결과, 높은 감염 효율을 나타내는 형질전환 조건을 확립할 수 있었다. 또한 확립된 형질전환계를 이용하여 효율적인 조직배양 체계가 확립된 4종의 *Panicum*속 식물들에서 형질전환의 가능성을 확인할 수 있었다.

본 실험에서 확립한 형질전환 체계를 이용한다면 농업적으로 중요한 난지형 사료작물들을 대상으로 유용유전자의 도입을 통한 신품종 개발이 가능할 것으로 사료된다. 이와 함께 *P. meyerianum*, *P. longijubatum*, *P. stapfianum*의 3종의 경우 비록 사료작물로서의 이용률은 아직까지 높지 않으나 높은 조직배양능력과 형질전

환의 용이성을 고려한다면, 난지형 목초의 모델 식물로써 활용이 기대됨과 동시에 새로운 사료 작물로써의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

IV. 요약

난지형 사료작물들의 신품종 개발을 위해서는 형질전환기법에 의한 유용 유전자의 도입이 필수적이다. 기니아그라스를 포함하여 높은 조식배양 능력을 가진 3종의 *Panicum*속 식물을 대상으로 *Agrobacterium*법을 통한 효율적인 형질전환 체계를 확립하였다. *P. meyerianum*의 성숙종자 유래 캘러스를 이용하여 acetosyringone과 betaine이 *Agrobacterium*의 감염에 미치는 영향을 GUS 유전자의 발현 정도를 통해 조사하였다. 그 결과, acetosyringone 10 mg/L와 betaine 60 mg/L를 첨가하였을 때 높은 GUS 유전자의 발현이 관찰되었다. 최적의 형질전환 조건을 이용하여 기니아그라스 2품종의 미성숙 배 유래 캘러스와 *P. longijubatum*, *P. stapfianum*의 성숙종자 유래 캘러스에 각각 형질전환을 시도한 결과, 모든 캘러스에서 높은 GUS 유전자의 발현이 관찰되었다. 또한 hygromycin이 첨가된 선발배지에서 저항성을 나타내는 캘러스를 대상으로 GFP 유전자의 발현을 관찰한 결과 안정적으로 세포 내에서 발현되고 있음을 확인할 수 있었다. Hygromycin이 첨가된 선발배지에서 내성을 나타낸 *P. meyerianum* 캘러스는 유식물체로 재분화되었다. 형질전환체를 대상으로 PCR 분석을 실시한 결과, 발현벡터 T-DNA 영역의 *hpt* 유전자가 형질전환체의 genome내에 성공적으로 도입되었음을 확인할 수 있었다.

V. 사 사

본 연구에서 사용된 기니아그라스는 일본의

오키나와현 축산연구센터 (Okinawa Prefectural Livestock and Grassland Research Center)의 마쓰미 에비나 (Masumi Ebina), 마사히토 이나후쿠 (Masahito Inafuku) 씨의 제공에 의한 것이며, 이에 감사드립니다.

VI. 인용 문헌

1. Carbalho, D.D., L.J. Irving, R.A. Carnevali, J. Hodgson, C. Matthew. 2006. Distribution of current photosynthate in two Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) cultivars. J Exp Bot. 57:2015-2024.
2. Goldman, J.J., W.W. Hanna, G.H. Fleming, P. Ozias-Akins. 2004. Ploidy variation among herbicide-resistant bermudagrass plants of cv. TifEagle transformed with the *bar* gene. Plant Cell Rep. 22:553560.
3. Gondo, T., S. Tsuruta, R. Akashi, O. Kawanura, F. Hoffmann. 2005. Green, herbicide-resistant plants by particle inflow gun-mediated gene transfer to diploid bahiagrass (*Paspalum notatum*). J Plant Physiol. 162:1367-1375.
4. Gondo, T., J. Matsumoto, S. Tsuruta, M. Yoshida, A. Kawakami, F. Terami, M. Ebina, T. Yamada, R. Akashi. 2009. Particle inflow gun-mediated transformation of multiple-shoot clumps in rhodes grass (*Chloris gayana*). J Plant Physiol. 166:435-441.
5. Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari, T. Kumashiro. 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.
6. Kosugi, S., Y. Ohashi, K. Nakajima, Y. Arai. 1990. An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. Plant Sci. 70:133-140.
7. Lee, S.C, J.S. Jeon, K.H. Jung, G.H. An. 1999. Binary vectors for efficient transformation of rice.

- Korean J plant Biotechnology. 42:310-316.
8. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revise medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15:473-497.
 9. Nakajima, K. and N. Mochizuki. 1983. Degrees of sexuality in sexual plants of guineagrass by the simplified embryo sac analysis. *Japan. J. Breed*. 33:45-54.
 10. Seo, M.-S., M. Takahara, M. Ebina, T. Takamizo. 2008. Evaluation of tissue culture response from mature seeds of *Panicum* spp. *Grassland Sci*. 54: 125-130.
 11. Seo, M.-S., M. Takahara, T. Takamizo. 2010. Optimization of culture condition for plant regeneration of *Panicum* spp. through somatic embryogenesis. *Grassland Sci*. 56:6-12.
 12. Shure, M., S. Wessler, N. Fedoroff. 1983. Molecular identification and isolation of the Waxy locus in maize. *Cell*. 35:225-233.
 13. Somleva M., Z. Tomaszewski, B. Conger. 2002. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of switchgrass. *Crop Sci*. 42:2080-2087.
 14. Stachel S.E., E. Messens, M. Van, P. Zambryski. 1985. Identification of signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*. 318:624-629.
 15. Toriyama K. and K. Hinata K. 1985. Cell suspension and protoplast culture in rice. *Plant Sci*. 41:179-183.
 16. Vernade D., A. Herrera-Estrella, K. Wang, M. Van. 1988. Glycin betaine allows enhanced induction of the *Agrobacterium tumefaciens* vir genes by acetosyringone at low pH. *J Bacteriol*. 170:5822-5829.
 17. Vogel, K.P., J.J. Brejda, D.T. Walters, D.R. Buxton. 2002. Switchgrass biomass production in the Midwest USA: harvest and nitrogen management. *Agron J*. 94:413-420.
 18. Zuloaga F.O., T.R. Soderstrom, K.W. Hilu, C.S. Campbell, M.E. Barkworth. 1987. Systematics of new world species of *Panicum* (Poaceae:Paniceae). *Grass Systematics and Evolution*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C., USA, 287-306.
- (접수일: 2011년 1월 11일, 수정일 1차: 2011년 1월 21일, 수정일 2차: 2011년 2월 18일, 게재확정일: 2011년 2월 21일)