

웅성불임 및 왜성형질의 제초제저항성 들잔디(*zoysia japonica* Steud.)의 판별기술 개발

이범규¹ · 강홍규² · 라누리¹ · 선현진² · 권용익² · 송인자² · 김창기³ · 류태훈¹ · 박기웅⁴ · 이효연^{2*}

¹국립농업과학연구원 생물안전성과, ²제주대학교 아열대원예산업연구소, ³한국생명공학연구원 바이오평가센터, ⁴충남대학교 식물자원학과

Development of distinction methods for male-sterile and dwarfism herbicide tolerant *Zoysia japonica* Steud.

Bum kyu Lee¹, Hong-Gyu Kang², Nu ri Ra¹, Hyeon-Jin Sun², Yong-Ilk Kwon², In-Ja Song², Chang-Gi Kim³, Tae-Hun Ryu¹, Kee Woong Park⁴, Hyo-Yeon Lee^{2*}

¹Biosafety Division, National Academy of Agricultural Science, Suwon 441-707, Korea

²Subtropical Horticulture Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

³Bio-Evaluation Center, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Cheongwon 363-883, Korea

⁴Department of Crop Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Received on 2 June 2014, revised on 14 August 2014, accepted on 14 August 2014

Abstract : The cultivation area and use of genetically modified (GM) crops have been increased continuously over the world. Concerns about the potential risks of GM crops are also increasing. Safe management for the development and production of GM crops is required according to Living Modified Organism Act in Korea. Planning about the methods, duration, and frequency of environmental monitoring is also required for commercial use of GM crops. GM *Zoysia japonica* Steud. (event name: JG21) expressing resistance to glufosinate-ammonium has been generated previously. By using gamma ray treatment to JG21 we also developed male sterility and dwarf *Z. japonica* (event name: JG21-MS). The objective of this study was to establish the monitoring system for environment release of JG21-MS. In this study we extracted RNA from JG21 and JG21-MS and conducted RAPD (random amplified polymorphic DNA) method to distinguish JG21 and JG21-MS.

Key words : Genetically modified (GM), *Zoysia japonica*, Environmental risk assessment, Monitoring, RAPD

I. 서론

들잔디(*Zoysia japonica* Steud.)는 경사면 등의 토양침식 방지, 정원 및 공원의 미적 가치 증진, 축구장, 골프장 등 스포츠 경기 기능 향상 등 다양한 용도로 이용되고 있으며, 최근 잔디의 이용 요구 증가와 더불어 잔디관련 사업규모도 확대되고 있는 추세이다(Kim, 2006; Sun et al., 2010). 잔디의 효율적인 관리에 있어서 잡초 및 병해충 방제는 매우 중요한 요인으로 많은 노동력과 농약사용이 점차 늘어나고 있는 추세이며, 이에 따른 관리비용 및 농약

환경오염 문제도 증가하고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 다양한 형질의 품종 육성이 요구되어 최근에는 기존의 전통육종 기술에서 벗어나 생명공학 기술을 이용한 신품종 개발이 시도되고 있다. 들잔디의 형질전환기술은 원형질체에 PEG를 처리하여 유전자를 직접 도입시키는 protoplast electroporation 법이 Inokuma 등(1996)에 의해 처음 소개되었으며, 이후 Lim 등(2004)에 의해 유전자총을 이용한 형질전환기술도 보고되었다. 하지만 이러한 방법들은 도입유전자의 크기 제한 및 다수의 유전자 도입으로 인한 도입유전자의 불활성화 발생 등의 단점이 있어 최근에는 경제적이고, 도입유전자의 수가 적으며, 비교적 분자량이 큰 유전자의 안정적 도입이 가능한 *Agrobacterium*

*Corresponding author: Tel: +82-64-754-3347

E-mail address: hyoyeon@jejunu.ac.kr

을 이용한 형질전환 기술이 보편화 되고 있다(Ge et al., 2006; Li et al., 2006; Lei et al., 2004; Toyama et al., 2003; Choi et al., 2000). Toyama 등(2003)은 *Agrobacterium*법을 이용하여 완숙종자로부터 배발생 캘러스를 유도하여 글루포시네이트 암모늄 제초제 저항성 들잔디(이벤트명 Jeju Green21, 이하 JG21)를 개발하였으며, Bae 등(2009)은 JG21 들잔디에 감마선(^{60}Co) 처리를 통해 기존 제초제 저항성 형질에 추가적으로 웅성불임 및 왜성형질을 유도한 들잔디(이벤트명 JG21-MS)를 개발하여 상업화 승인을 위한 안전성평가를 진행 중에 있다(Bae et al., 2011; Bae et al., 2010; Bae et al., 2008; Bae et al., 2007).

전 세계적으로 유전자변형(Genetically Modified, GM) 작물의 재배 및 이용이 지속적으로 증가하고 있으며, 2013년에는 27개국에서 총 1억 7,520만 헥타르에 걸쳐 GM 작물이 재배되었다(ISAAA, 2014). GM 작물은 생산량 증가, 농가 소득 증대, 농업 환경 피해 감소, 온실가스 감소 등 다양한 이점이 있다고 알려져 있지만, 그에 반해 GM 작물의 잠재적 위해성에 대한 우려도 제기되고 있는 실정이다. GM 작물의 환경 위해성에 대한 주요 우려는 GM 작물의 잡초화 가능성과 도입유전자의 근연종으로의 이동(gene flow), 꽃가루 및 종자를 통한 생태계 확산 등을 들 수 있으며, 이러한 경우 새롭게 도입된 형질이 생태계에 교란을 일으킬 수 있으며 방제가 어려워지는 등의 문제점을 야기할 수 있기 때문이다(Snow and Morán-plama, 1997). 이러한 문제점을 해결하고자 UN은 유전자변형생물체의 안전한 이용을 위한 국제협약인 바이오안전성 의정서(Cartagena Protocol on Biosafety)를 2001년 1월 채택하였으며, 우리나라는 바이오안전성의정서의 국내 이행을 위해 '유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률(LMO법)'을 제정하여 2008년 1월부터 시행하였다(Biosafety white paper, 2013). 국내에서는 LMO법에 따라 GM 작물의 개발 및 생산 등에 대해 안전한 관리를 요구하고 있으며, LMO법 통합고시에서는 GM 작물의 환경방출 실험에 있어 '환경방출실험 심사자료(별표 4-3)', '격리포장 구비요건(별표 4-4)', '관리 방법과 조치사항(별표 4-5)' 등에서 GM 작물의 도입 유전자의 격리포장 외부 식물체로의 이동을 최소한으로 제한하도록 규정하고 있다. 또한 GM 작물의 상업화(환경방출) 승인을 위한 위해성평가 자료에서도 환경 모니터링에 대한 방법, 기간, 빈도 등에 대한 계획을 요구하고 있다(LMO법

통합고시 별표 10-1).

유전자변형 JG21과 JG21-MS 들잔디의 상업화를 위한 안전성평가에 있어서 LMO법의 관련 규정에 따라 격리포장 주변에 대한 환경 모니터링이 반드시 수행되어야 한다. 일반적으로 환경모니터링을 위한 GM 작물과 비변형(non-GM) 작물 간의 판별은 도입유전자 및 도입유전자에 의해 발현되는 단백질에 대해 PCR법 및 진단막대(ImmunoStrip Test Kit)를 이용하는 방법이 많이 사용된다. JG21-MS 들잔디는 JG21에 방사능 처리에 의해 돌연변이가 유도되었으며, 두 이벤트 모두 *bar* 유전자 도입에 의한 PAT 단백질을 생성한다(Bae et al., 2010). 따라서 현재 JG21과 JG21-MS가 동일 격리포장에서 재배되는 상황에서 GM 들잔디의 야외 환경방출 모니터링을 위해 JG21과 JG21-MS를 구분할 수 있는 판별 기술이 개발되어야 할 필요성이 있다.

본 연구에서는 유전자변형 제초제저항성 들잔디의 환경방출 모니터링 방법 구축의 일환으로 RAPD(random amplified polymorphic DNA)법을 이용한 JG21과 JG21-MS 들잔디의 판별기술 개발을 위해 수행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료 및 샘플링

GM 들잔디의 환경방출 실험을 위해 2011년 7월에 국립 축산과학원 축산자원개발부 LMO 격리포장에 2종의 GM 들잔디(JG21, JG21-MS)와 3종의 대조구(모본, 중지, 미성)를 재식하였다. 실험 포장은 재식 전 완숙퇴비(4 kg/m^2)를 시비하고 잔디가 적당히 생육할 수 있도록 토양을 평탄하게 경운하였다. Plot은 $1 \times 1\text{ m}^2$ 가 되도록 로프를 이용하여 조성하였으며 plot 간 거리는 0.5 m가 되도록 하였다. 실험구 배치는 4반복 완전임의배치법을 사용하였다. 잔디의 초기 생장을 동일하게하기 위해 이식 후 10일에 높이 5 cm만 남기고 잘라낸 후 관행방법으로 잔디를 관리하였다. 실험재료의 샘플링은 2012년 7월에 JG21과 JG21-MS, 그리고 모본에 대해 한 개체 당 3개의 줄기를 채집하였으며, 각 품종에 대해 4반복으로 수행하였다. 수집된 샘플은 바로 액체질소에 얼려 실험실로 운반한 뒤 RNA를 추출하였다.

2. RNA 추출 및 cDNA 합성

수집된 각 들잔디 샘플 100 mg을 액체질소와 막자사발을 이용하여 곱게 갈은 후 QIAGEN[®]사의 RNeasy[®] Plus Mini Kit를 이용하여 매뉴얼에 따라 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 분광광도계를 이용하여 정량한 후 1 µg template RNA를 취해 QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit(QIAGEN[®])를 이용하여 매뉴얼에 따라 cDNA를 합성하였다.

3. RAPD

RAPD(random amplified polymorphic DNA)에 이용된 random primer는 BIONEER사의 RAPD용 10 mer Premade Random Primer를 이용하였으며, 총 56개의 primer를 사용하였다(Oligo name N-8001~8016, N-8021~8060). PCR 반응은 AccuPower[®] PCR PreMix(BIONEER)를 이용하였으며, 이때의 조성은 50ng template DNA, 10pmole 각 primer, 10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 30 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 250 µM dNTPs 및 1unit의 Taq polymerase를 포함하여 총량은 20 µl이었다. PCR 반응 조건은 94°C에서 5분간 반응시킨 뒤에 94°C에서 30초, 40°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초의 조건으로 35 cycle을 수행하였으며 마지막 반응은 72°C에서 5분간 수행하여 전 증폭과정을 종료하였다. 증폭된 PCR산물(10 µl)은 1.5% TAE buffer agarose gel에 전기영동 하여 확인하였다.

4. JG21-MS 판별 PCR

RAPD 수행 결과 JG21과 JG21-MS 들잔디 간에 증폭양상이 다른 조합에 대해 해당 밴드를 QIAEX[®] II Gel Extraction Kit(QIAGEN[®])를 이용하여 매뉴얼에 따라 증폭된 DNA를 추출한 뒤 pGEM[®]-T EASY Vector System I(Promega)을 이용하여 클로닝한 후 시퀀싱을 수행하였다. JG21과 JG21-MS의 판별을 위한 특이적 프라이머 제작을 위해 시퀀싱 결과로부터 프라이머를 합성하여 JG21 및 JG21-MS, 모본의 cDNA를 대상으로 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 AccuPower[®] PCR PreMix(BIONEER)를 이용하였으며, 이때의 조성은 RAPD에서 수행된 것과 같았다. PCR 반응 조건은 94°C에서 5분간 반응시킨 뒤에 94°C에서 30초, 55°C에서 30초,

72°C에서 1분 30초의 조건으로 30 cycle을 수행하였으며 마지막 반응은 72°C에서 5분간 수행하여 전 증폭과정을 종료하였다. 증폭된 PCR산물(10 µl)은 1.5% TAE buffer agarose gel에 전기영동 하여 확인하였다.

III. 결과 및 고찰

JG21-MS 들잔디는 제초제저항성 유전자가 도입된 JG21 들잔디에 감마선(⁶⁰Co)을 처리하여 제초제저항성 형질 외에 비정상적인 화분 발생에 의한 응성불임 및 모본에 비해 약 20%의 키를 보이는 왜성형질이 추가적으로 유도되었다(Bae 등, 2009). 방사능에 의한 돌연변이 유도는 유전자의 일부에 결손, 삽입, 변형 등이 무작위로 발생한 결과에 의한 것으로 알려져 있다(Bae 등, 2010). GM 작물의 환경방출 모니터링을 위한 판별법은 연구의 특성상 다수의 샘플을 조사해야 함으로 PCR법 등 비교적 쉽고 간편한 방법이 요구되어 진다. JG21-MS 들잔디는 방사선 조사에 의해 랜덤하게 유전자가 변형되었을 것으로 판단되어 염색체 DNA를 기반으로 한 PCR 판별법 개발은 어려움이 있을 것으로 사료되었다. 따라서 본 연구에서는 방사선 처리로 인한 mRNA 발현의 차이를 이용한 판별법을 개발하고자 RAPD(random amplified polymorphic DNA)법을 이용하여 연구를 수행하였다.

RAPD 수행을 위해 JG21 및 JG21-MS 그리고 모본으로부터 샘플을 채집하여 RNA를 추출하였다(Fig. 1). RNA의 발현은 식물의 부위, 환경, 위치 등에 의해 차이가 있을 수 있으므로 한 개체 당 3개의 줄기를 채집하였으며, 각 품종 당 4반복으로 RNA를 추출하였다. 4반복으로 추출된 RNA는 1 µg/µl의 동일한 농도로 맞춘 뒤 하나로 섞어서 cDNA를 합성하였다.

합성된 cDNA를 template로 하여 총 56개의 RAPD용 10 mer Premade Random Primer(BIONEER, Oligo name

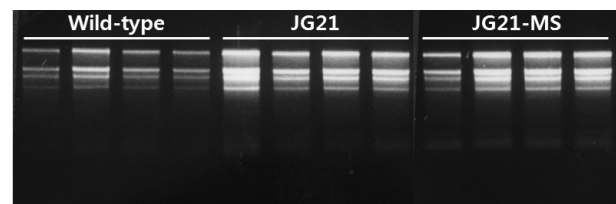


Fig. 1. Results of RNA extraction from wild-type, JG21, and JG21-MS *Zoysia* grass. RNA was extracted from 4 repetition in each event.

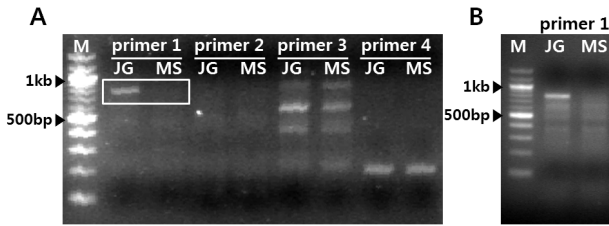


Fig. 2. Results of RAPD from JG21 and JG21-MS *Zoysia* grass. (A) A part of RAPD results. Primer 1 was combination of BIONEER random primer Oligo name N-8021 and 8022, primer 2 was N-8023 and 8024, primer 3 was N-8025 and 8026, and primer 4 was N-8027 and 8028. White box means amplification difference between JG21 and JG21-MS. (B) Reconfirm of RAPD using primer 1. M : 1kb DNA ladder, JG : JG21 *Zoysia* grass, MS : JG21-MS *Zoysia* grass.

```

AATCGGGCTGCCGGGACGTGGTGCTCGAGCCGAGCGCGCTGGACGACGTGCACCG 60
GGAGGTGAACCGTACTGCCGGAAGCGGTGGAACCGGTGGCGCGCCAACCTCATGCACAC 120
CTACTTCCGGAGCCCGTGGTGGTTCCTGTCCCTCGCCGCGCGAGCTTCCTCCCTCGTCA 180
GACCGTATGCAGACCGTCTACACCGTCTGCCGTACTACAAGACGACAACCTAGCTCTT 240
GTTATCCGTTATCACTGCATACATCTGTGATCTGTCTTGTAGTATTCGTATAAATTTTCT 300
CGTTTCTATACAACCTACTATGGCTGGAATGTACCATCTGTCTTTTACTTGGTGATATAG 360
GATTGATCTTTCACATCTGGGCTGAAACCTAGATAAGCAAAATAAATCTGTGCACAGAT 420
AAATTAATCTGTAAAACCTAATTTACATATCAACAAAAAATTTATTCGACAAAGATGG 480
AGCTTGAAAAAATCCGCCACTTTTCGTTATTGCCATCCATGACGCCCTCTCGCCT 540
GTTAGTAAAAAATCAATTTGGTATTAATAACAACCTATTTCTAAATGGGCCATAAGGACC 600
AATAATTCACCTGTGACGCCAAGTGAAGCTTCCACAATCCACCTAGCAGCCCGATTAA 660
TCGAATTCGCCGGCGCCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCAATTCGCCCT 720
ATAGTGAGTCGATTTACAATTCACCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACGTTGGGAA 780
CTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTTCGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAA 840
AGCGAAGAGGCCCGCACCGATTCGCCCTTCCCAACAAGTTGCGCAGTCTTGAATGGCGAAT 900
GGACGCCGCCCTGTGTGGAGTACC 924
    
```

Fig. 3. The sequence of amplified by random primer (Oligo name N-8021 and 8022) in JG21 *Zoysia* grass. Bold characters mean primers in using RAPD. Underlined characters mean primers in using the distinction PCR for JG21-MS.

N-8001~8016, N-8021~8060)를 이용하여 RAPD를 수행하였다. RAPD 결과 JG21과 JG21-MS에서 증폭양상이 다른 하나의 random primer 조합이 발견되었다(Fig. 2). 이때 사용된 primer는 AATCGGGCTG(Oligo name N-8021)와 GGTACTCCAC(Oligo name N-8022)이었다.

JG21에서만 발견된 cDNA 증폭산물은 JG21-MS의 응성 불임 및 왜성형질에 관련된 유전자일 가능성이 있어 유전자의 규명과 특이적 primer의 제작을 위해 해당 밴드를 추출하여 클로닝 한 뒤 시퀀싱을 수행하였다(Fig. 3). 시퀀싱 정보를 NCBI의 BLAST로 검색한 결과 DB상의 어떠한 유전자와도 매치되지 않아 해당 유전자를 규명할 순 없었다.

JG21-MS 들잔디의 판별을 위한 특이적 primer 제작을 위해 시퀀싱 정보로부터 20 mer의 primer를 제작하였으며, primer 정보는 F: CTT TCA CAT CTG GGC CTG AA, R: TTG TGG AAG CTT CAC TTG GG이었다(Fig. 3). 특이적 primer를 이용하여 JG21과 JG21-MS 그리고 모본의

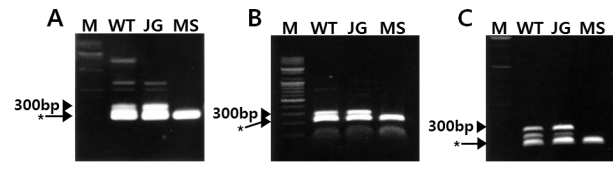


Fig. 4. Distinction PCR between JG21 and JG21-MS *Zoysia* grass collected in three isolated LMO field Sungwhan (A), Jeju university (B), and Namwon (C). The about 300bp band was amplified in only WT and JG21 but not in JG21-MS. M : 1kb DNA ladder, WT : wild-type. JG, MS : JG21 and JG21-MS *Zoysia* grass. * : non-specific PCR amplification.

cDNA를 template로 하여 PCR을 수행한 결과 JG21과 모본에서만 나타나는 약 300 bp 크기의 특이적인 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 4A).

재배 환경에 따라 mRNA는 발현이 달라질 수 있기에 개발된 판별법을 검정할 필요가 있다고 사료되었다. PCR 판별 검정력을 확인하기 위해 동일 재료로 실험을 수행하고 있는 제주대학교 연구팀에 의뢰하여 각기 다른 2개의 포장(제주대 및 서귀포시 남원읍 LMO 격리포장)에서 채집된 들잔디로부터 cDNA를 합성하여 PCR을 수행한 결과 동일한 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 4 B, C). 실험결과를 통해 개발된 특이적 primer 및 판별 시스템은 유전자변형 JG21-MS의 판별과 환경방출 모니터링에 활용될 수 있을 것으로 사료되었다.

IV. 결론

유전자변형(Genetically Modified, GM) 작물의 재배 및 이용은 전세계적으로 지속적으로 증가하고 있으며, 이에 따른 GM 작물의 잠재적 위해성에 대한 우려도 증가되고 있는 실정이다. 국내에서는 LMO법에 따라 GM 작물의 개발 및 생산 등에 대해 안전한 관리를 요구하고 있으며, GM 작물의 상업화를 위해 환경 모니터링에 대한 방법, 기간, 빈도 등에 대한 계획을 요구하고 있다. 이전 연구에서 들잔디(*Zoysia japonica* Steud.)에 글루포시네이트 암모늄 제초제 저항성 유전자를 도입한 들잔디(이벤트명 JG21)와 JG21에 감마선(⁶⁰Co) 처리를 통해 기존 제초제 저항성 형질에 추가적으로 응성불임 및 왜성형질을 유도한 들잔디(이벤트명 JG21-MS)가 개발되었다. 본 연구에서는 유전자변형 JG21-MS 들잔디의 환경방출 모니터링 시스템 구축의 일환으로 JG21과 JG21-MS로부터 RNA를 추출하여 RAPD(random amplified polymorphic DNA)법을 이용하

여 JG21과 JG21-MS를 구분할 수 있는 판별 기술을 개발하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 차세대바이오그린 21사업(과제번호: PJ00949905)과 교육부 재원인 한국연구재단의 기초연구사업(No. 2009-0094059)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고 문헌

- Bae, T.W., H.Y. Lee, K.H. Ryu, T.H. Lee, P.O. Lim, P.Y. Yoon, S.Y. Park, K.Z. Riu, P.S. Song, and Y.E. Lee. 2007. Evaluation of horizontal gene transfer from genetically modified zoysiagrass to the indigenous microorganisms in isolated GMO field. *Kor. J. Plant Biotechnol.* 34:75-80.
- Bae, T.W., E. Vanjildorj, S.Y. Song, S. Nishiguchi, S.S. Yang, I.J. Song, T. Chandrasekhar, T.W. Kang, J.I. Kim, Y.J. Koh, S.Y. Park, J. Lee, Y.E. Lee, K.H. Ryu, K.Z. Riu, P.S. Song, and H.Y. Lee. 2008. Environmental risk assessment of genetically engineered herbicide tolerant *Zoysia japonica*. *J. Environ. Qual.* 37(1):207-18.
- Bae, T.W., J. Kim, I.J. Song, S.Y. Song, P.O. Lim, P.S. Song, and H.Y. Lee. 2009. Production of unbolting lines through gamma-ray irradiation mutagenesis in genetically modified herbicide-tolerant *Zoysia japonica*. *Breeding Sci.* 59:103-105.
- Bae, T.W., I.J. Song, H.G. Kang, O.C. Jeong, H.J. Sun, S.M. Ko, P.O. Lim, P.S. Song, S.J. Song, and H.Y. Lee. 2010. Selection of Male-sterile and Dwarfism Genetically Modified *Zoysia japonica* through Gamma Irradiation. *J. Radiation Industry.* 4(3):239-246.
- Bae, T.W., H.G. Kang, I.J. Song, H.J. Sun, S.M. Ko, P.S. Song, and H.Y. Lee. 2011. Environmental risk assessment of genetically modified Herbicide-Tolerant zoysiagrass (Event: Jeju Green21). *J. Plant Biotechnol.* 38:105-116.
- Biosafety white paper. 2013. LMO perception and communication (<http://www.biosafety.or.kr>).
- Choi, M.L. and D.H. Kim. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of Korean lawngrass (*Zoysia japonica*). *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 41:455-458.
- Ge, Y., T. Norton, and Z.Y. Wang. 2006. Transgenic *Zoysia japonica* plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep.* 25:792-98.
- Inokuma, C., K. Sugiura, C. Cho, R. Okawara, and S. Kaneko. 1996. Plant regeneration from protoplasts of Japanese lawngrass. *Plant Cell Rep.* 15:737-7741.
- ISAAA. 2014. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2013, BRIEF 46 (<http://www.isaaa.org>).
- Kim K.N. 2006. Introductory turfgrass science, p.23-28. Sahmyook University.
- Lei, Z., W.D. Xing, H.F. Rong, W.H. Qiu, and C.X. Ma. 2004. Optimization of major factors for tissue culture and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of Japanese lawngrass (*Zoysia japonica*). *Acta Prataculturae Sinica.* 13:100-105.
- Li, R.F., J.H. Wei, H.G. Wang, J. He, and Z.Y. Sun. 2006. Development of highly regenerable callus lines and *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese lawngrass (*Zoysia sinica* Hance) with a cold inducible transcription factor, CBF1. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 85:297-305.
- Lim, S.H., B.C. Kang, and H.K. Shin. 2004. Herbicide Resistant Turfgrass (*Zoysia japonica* cv. 'Zenith') Plants by Particle bombardment-mediated Transformation. *Kor. Turf. Sci.* 34(5): 221-229.
- Snow, A.A., and P. Morán-Palma. 1997. Commercialization of transgenic plants: potential ecological risks. *BioScience.* 47:86-96.
- Sun, H.J., I.J. Song, T.W. Bae, and H.Y. Lee. 2010. Recent developments in biotechnological improvement of *Zoysia japonica* Steud. *J. Plant Biotechnol.* 37:400-407.
- Toyama, K., C.H. Bae, J.G. Kang, Y.P. Lim, T. Adachi, K.Z. Riu, P.S. Song, and H.Y. Lee. 2003. Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol. Cells.* 16(1):19-27.