

## 톨페스큐의 효율적인 형질전환을 위한 몇 가지 요인의 영향

김진수 · 이상훈 · 이병현<sup>†</sup>

경상대학교 응용생명과학부

## Several Factors Affecting Transformation Efficiency of Tall Fescue

Jin-Soo Kim, Sang-Hoon Lee and Byung-Hyun Lee<sup>†</sup>

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

**ABSTRACT** : A system for the production of transgenic plants has been developed for tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) via *Agrobacterium*-mediated transformation of mature seed-derived embryogenic callus. 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-culture media lead to a increase in stable transformation efficiency. Transformation efficiency was increased when embryogenic calli were co-cultured for 5 days on the co-culture medium. 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 Southern blot analysis of transgenic plants demonstrated that transgenes were successfully integrated into the genome of tall fescue.

**Keywords**: *Agrobacterium*, forage crop, tall fescue, transgenic forage

**톨페스큐**(*Festuca arundinacea* Schreb.)는 기온이 15~21°C 정도인 아시아 온대지역, 유럽 및 북아메리카 등에서 잘 자라는 다년생의 북방형 화분과 작물로 주로 사료작물로서 많이 이용되고 있으며, 절개지, 사방공사, 공원, 골프장 등에 있어서 토양보존용 및 잔디용으로 많이 개발되어 이용되고 있는 초종 중에 하나이다(Buckner *et al.*, 1979). 톨페스큐는 척박한

토양, 습지 및 음지에서 잘 성장하여 사료작물로 이용 시 수량이 많으며, 다양한 환경 스트레스에도 비교적 잘 적응하여 우리나라에서도 널리 재배되고 있는 주요한 사료작물에 속한다(Buckner *et al.*, 1979). 그러나 여름철 기온이 25°C 이상의 고온이 지속될 때에는 하고현상을 일으켜 생육에 지장을 받기 쉽고, 다른 화분과 사료작물에 비하여 잎이 거칠어서 가축이 즐겨 채식하지 않아 기호성이 낮으며, 특히 출수기 이후에는 사료가치가 급격히 저하되는 등의 단점이 있다(Fieser & Vanzant, 2004). 이러한 단점을 보완하기 위해 전 세계적으로도 선발과 교잡을 통하여 톨페스큐의 품질을 높이고자 하는 전통적인 육종법에 의한 연구가 활발히 진행되고 있다(Sleper, 1985; Van Wijk *et al.*, 1993).

최근에는 목초 또는 사료작물의 유용유전자의 도입에 의한 분자유종법을 통한 신품종 개발 연구가 많이 시도되고 있다(Spangenberg *et al.*, 1998). 지금까지 대부분의 화분과 사료작물의 형질전환은 silicon-carbide fiber(Dalton *et al.*, 1998)를 이용하거나 particle bombardment 법(Dalton *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2000) 등의 유전자의 직접도입법에 의해 시도되어왔다. 그러나 이러한 형질전환기법은 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 1~2 copy의 적은 수의 copy number로 도입되며 특히 거대분자의 DNA도 안정적으로 도입하는 것이 가능하여 매우 효율적인 형질전환 기법 중에 하나로 알려져 있다(Hiei *et al.*, 1994). 지금까지 *Agrobacterium*법에 의한 형질전환은 주로 쌍자엽식물에는 많이 이용되어왔으나 단자엽식물 형질전환에는 낮은 형질전환효율로 제한적으로 이용되어 왔다. 그러나 최근 *Agrobacterium*법에 의한 단자엽식물의 형질전환에 대한 보고가 며(Hiei *et al.*, 1994), 밀(Cheng *et al.*, 1997), 보리(Tingay *et al.*, 1997; Trifonova *et al.*, 2001), 사탕수수

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-55-751-5418 (E-mail) hyun@nongae.gsnu.ac.kr

<Received March 1, 2004>

(Arencibia *et al.*, 1998) 및 수수(Zhao *et al.*, 2000) 등에서도 보고되어 다른 화본과 작물로의 응용범위가 점점 넓어지고 있다.

지금까지 톨페스큐의 형질전환에 대한 보고는 대부분 직접 도입법에 의한 것이며 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 체계는 아직까지 확립되어 있지 못한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 톨페스큐의 유전자 형질전환을 통한 신품종 개발을 위한 기초실험으로 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 있어서 가장 중요한 몇 가지 요인의 영향에 대해 체계적으로 조사함으로써 효율적인 형질전환시스템을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

형질전환을 위한 재료로는 톨페스큐의 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 MS배지를 기본으로 하는 캘러스 유도배지(6 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BA, 500 mg/L L-proline, 100 mg/L myo-inositol, 30 g/L sucrose, 5 g/L gelrite)에 치상하여 6주간 배양하여 형성된 배발생 캘러스를 *Agrobacterium* 감염에 이용하였다.

### *Agrobacterium* 배양 및 감염

형질전환을 위한 발현벡터는 pIG121Hm(Hiei *et al.*, 1994, Fig. 2) 벡터를 *Agrobacterium* strain EHA101에 형질전환한 후, 단일 colony를 선발하여 kanamycin(Km)과 hygromycin(Hm)이 각각 50 mg/L로 첨가된 YEP 액체배지에 접종하여 캘러스의 감염에 이용하였다. YEP 액체배지로 28°C에서 하룻밤 배양한 *Agrobacterium*을 3,600 rpm에서 10분간 원심분리하여 회수한 후 기본적으로는 200 µM acetosyringone(AS)이 첨가된 접종배지(MS medium, 30 g/L sucrose)에 OD600=1.0이 되도록 현탁한 다음 캘러스의 감염에 이용하였다. 성숙종자로부터 유도된 3-5 mm 크기의 캘러스를 *Agrobacterium*을 현탁시킨 접종배지에 1시간 침지시켜 감염시킨 다음 여분의 *Agrobacterium*을 멸균된 filter paper 위에서 제거하였다. 감염시킨 캘러스를 공동배양배지(MS medium, 3 mg/L 2,4-D, 200 µM AS, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L gelrite)에 계대한 후 26°C에서 5일간 암상태로 공동배양하였다. 공동배양한 캘러스는 500 mg/L cefotaxime이 첨가된 공동배양배지로 세정하여 *Agrobacterium*을 제공한 후 post-culture배지(MS medium, 500 mg/L cefotaxime, 3 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 500 mg/L L-proline, 3 mg/L thiamine-HCl, 30 g/L sucrose, 5 g/L gelrite)에 7일간 배양하였다.

### 형질전환체의 선발과 식물체 재분화

공동배양과 post-culture가 끝난 캘러스는 선발배지(N6 medium, 250 mg/L cefotaxime, 25 mg/L Hm, 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 500 mg/L L-proline, 3 mg/L thiamine-HCl, 30 g/L sucrose, 5 g/L gelrite)에서 3주간 배양하여 Hm 내성을 보이는 캘러스만을 선발하여 다시 50 mg/L Hm이 첨가된 선발배지에 옮겨 4주간 배양하여 살아남은 캘러스로부터 식물체를 재분화시켰다. 재분화된 식물체는 50 mg/L Hm이 첨가된 1/2MS 배지가 들어 있는 배양병에 옮겨준 후 4주간 배양하여 정상적으로 뿌리가 발육되고 살아남은 개체만을 선발하여 pot로 이식하여 온실에서 재배하였다.

### GUS분석과 형질전환체 분석

GUS 활성염색은 Jefferson(1987)의 방법에 준하여 실시하였다. 캘러스에 있어서 GUS 발현조사는 5일간 공동배양한 캘러스를 이용하였으며, 재분화된 형질전환 식물체의 잎을 이용한 GUS 활성염색은 선발배지에서 재분화된 식물체 또는 온실재배 중인 형질전환 식물체의 잎 조직을 재료로 하여 GUS 활성염색을 실시한 후 형질전환 여부를 판단하였다. 온실에서 재배한 형질전환 식물체로부터 genomic DNA를 CTAB법으로 분리한 후 30 µg을 HindIII로 절단하여 0.6% agarose gel로 전기영동한 후 Southern blot 분석을 실시하였다. Southern blot 분석을 위한 probe DNA는 pIG121Hm 벡터의 *hpt* 유전자를 5'-CCTGAAGCTCACCGCGACG-3'와 5'-AAGACCAATGCGGAGCATATAC-3'을 primer로 하여 증폭시킨 후 agarose gel 전기영동으로 정제하여 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### Acetosyringone 첨가에 따른 형질전환 효율의 차이

톨페스큐의 *Agrobacterium*을 이용한 최적 형질전환조건을 조사하기 위하여 우선 성숙종자 유래의 배발생능이 우수한 캘러스를 이용하여 *Agrobacterium*의 감염효율에 가장 큰 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있는 AS의 첨가에 따른 효과를 조사한 결과 Table 1과 같았다. 톨페스큐의 세 가지 품종에 있어서 AS를 *Agrobacterium* 접종배지와 공동배양배지에 동시에 첨가해 주었을 때의 캘러스의 형질전환효율을 *Agrobacterium*으로 감염시킨 전체 캘러스 중에서 GUS 활성염색이 되는 캘러스의 비율로 조사하였다. 예비실험에서 가장 효율적인 AS의 첨가농도는 공시한 모든 품종의 톨페스큐에서 200 µM로 나타났다. 'Hokuryo' 품종의 경우 AS를 첨가하지 않았을 때의 GUS 활성염색이 되는 비율, 즉 형질전환효율이 20.7%였으나 200 µM의 AS를 첨가해주었을 때에는 38.2%로 증가하였다. 'Kentucky-31' 품종의 경우 AS 무첨가 시에 34.9%에서 200 µM의 AS 첨가 시 65.8%로 증가하여 약 1.9배 정도 형질전

**Table 1.** Effect of acetosyringone on GUS expression in seed-derived callus of *Festuca arundinacea* Schreb.

Cultivar	Acetosyringone <sup>†</sup>	Number of calli tested	No. of calli with GUS stain	Proportion of calli with GUS stain (%) <sup>‡</sup>
Hokuryo	-	150	31.0 ± 2.6	20.7 ± 1.8 <sup>cd</sup>
	+	150	57.3 ± 8.5	38.2 ± 5.7 <sup>b</sup>
Cajun	-	150	25.3 ± 3.2	16.9 ± 2.1 <sup>d</sup>
	+	150	37.7 ± 5.5	25.1 ± 3.7 <sup>c</sup>
Kentucky-31	-	150	52.3 ± 4.6	34.9 ± 3.1 <sup>b</sup>
	+	150	98.7 ± 6.1	65.8 ± 4.1 <sup>a</sup>

Values represent the mean±SD of three independent experiments. <sup>†</sup>- and + denote the absence and presence of 200 µM acetosyringone, respectively, in both the inoculation and co-culture media.

<sup>‡</sup>Different letters (a, b, c, d) indicate significant differences at P<0.05.

환효율이 증가되었다. 품종별로는 ‘Kentucky-31’의 효율이 가장 높았으며, ‘Hokuryo’가 중간정도의 효율을, ‘Cajun’이 가장 낮은 효율을 나타내어 이 후의 실험에는 ‘Kentucky-31’ 품종을 이용하였다. 이와 같이 단자엽 식물의 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 있어서 AS를 첨가해 줌으로써 형질전환효율을 증가시킨 예가 보리(Tingay *et al.*, 1997)와 밀(Cheng *et al.*, 1997) 등과 같은 화본과 작물에서도 보고 되었다. AS는 *Agrobacterium*의 식물세포 감염 관련 유전자인 *vir* 유전자를 활성화시키는 페놀성 화합물로 알려져 있는데(Usami *et al.*, 1987), 대부분의 단자엽 식물조직에서는 이물질이 합성되지 않음으로 인해 *Agrobacterium*에 의한 형질전환에 장애요인으로 작용해 왔다. 특히 비(Hiei *et al.*, 1994)와 옥수수(Ishida *et al.*, 1996)의 경우 *Agrobacterium*에 의한 형질전환에 있어서 AS의 첨가가 필수적이라고 보고된 바 있다. 그러나 본 실험에서는 세 가지 품종 모두 AS 무첨가구에서도 형질전환 효율은 낮지만 GUS 발현이 확인되어 AS가 틀페스큐의 형질전환에 필수적이지는 않으나, 형질전환 효율을 현저히 증가시키는 중요한 요인 중에 하나인 것으로 판단되었다.

**공동배양 기간에 따른 형질전환 효율의 차이**

틀페스큐의 종자유래 캘러스에 *Agrobacterium*을 접종한 후 공동배양 기간에 따른 형질전환 효율의 차이를 조사한 결과는 Table 2와 같다. *Agrobacterium*으로 감염시킨 다음 1일간 공동배양한 후 캘러스의 GUS 활성염색정도로 관찰한 형질전환 효율은 18.4%였으며, 3일간 공동배양 한 경우 37.8%의 효율을, 5일간 공동배양 했을 때는 67.3%로 가장 높은 형질전환 효율을 나타내었다. 그러나 7일간 공동배양한 경우는 54.2%, 9일간 배양한 경우는 49.1%의 효율을 나타내었다. 즉, 공동배양 기간이 5일째까지는 기간이 길어질수록 형질전환 효율이

**Table 2.** Effect of co-culture period on GUS expression in seed-derived callus of *Festuca arundinacea* Schreb. cv. Kentucky-31.

Co-culture (days)	Number of calli tested	No. of calli with GUS stain	Proportion of calli with GUS stain (%) <sup>†</sup>
1	150	27.7 ± 3.2	18.5 ± 2.1 <sup>d</sup>
3	150	56.7 ± 6.5	37.8 ± 4.3 <sup>c</sup>
5	150	101.0 ± 7.8	67.3 ± 5.2 <sup>a</sup>
7	150	81.3 ± 7.4	54.2 ± 4.9 <sup>b</sup>
9	150	73.7 ± 5.1	49.1 ± 3.4 <sup>b</sup>

Values represent the mean±SD of three independent experiments. Both the inoculation and co-culture media were supplemented with 200 µM acetosyringone.

<sup>†</sup>Different letters (a, b, c, d) indicate significant differences at P<0.05.

증가하였으나, 그 이상의 기간에서는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. 공동배양기간이 5일 이상인 경우에는 육안으로 관찰하였을 때 *Agrobacterium*의 overgrowth로 인해 캘러스의 갈변현상이 심하여 괴사되는 세포의 비율이 높았으며 이로 인하여 GUS 활성염색정도가 저하된 것으로 사료되었다. 이와 같이 공동배양기간이 4-5일까지 증가시킬수록 형질전환 효율이 증가된다는 예가 밀의 미숙종자를 이용한 *Agrobacterium* 형질전환(Wu *et al.*, 2003), 콩(Santarem *et al.*, 1998) 및 사과(DeBondt *et al.*, 1994) 등에서도 보고된 바 있다.

**Tween20의 농도에 따른 형질전환 효율의 차이**

틀페스큐의 성숙종자 유래 캘러스의 형질전환에 있어서 비이온성 계면활성제인 Tween20의 첨가효과를 조사하기 위하여 *Agrobacterium* 감염 시 접종배지에 Tween20을 농도별로 첨가한 후의 형질전환 효율을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 전체적으로는 Tween20을 첨가해 준 모든 처리구에서 형질전환 효율이 증가되었다. Tween20을 첨가해주지 않았을 경우에는 GUS염색되는 캘러스의 비율이 65.8%로 나타났으나 0.01%의

**Table 3.** Effect of Tween20 in the inoculation medium on GUS expression in seed-derived callus of *Festuca arundinacea* Schreb. cv. Kentucky-31.

Tween20 (%)	Number of calli tested	No. of calli with GUS stain	Proportion of calli with GUS stain (%) <sup>†</sup>
0	150	98.7 ± 3.8	65.8 ± 2.5 <sup>b</sup>
0.01	150	104.7 ± 7.0	69.8 ± 4.7 <sup>b</sup>
0.1	150	136.0 ± 6.6	90.7 ± 4.4 <sup>a</sup>
1	150	125.0 ± 11.0	83.3 ± 7.3 <sup>a</sup>

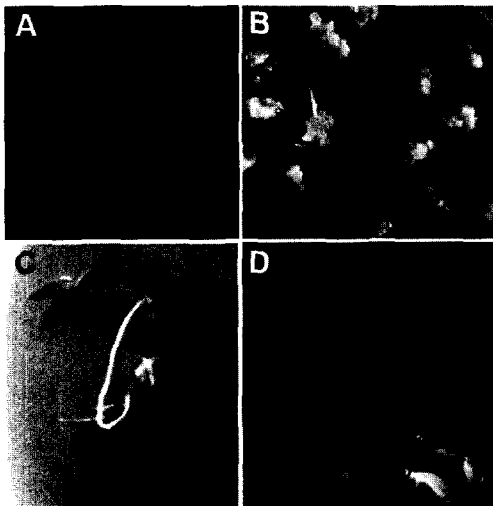
Values represent the mean±SD of three independent experiments. Both the inoculation and co-culture media were supplemented with 200 µM acetosyringone.

<sup>†</sup>Different letters (a, b) indicate significant differences at P<0.05.

농도로 Tween20을 접종배지에 첨가해 주었을 때는 69.8%로 무첨가구와 유의적인 차이는 보이지 않았으나 약간 증가되는 경향을 나타내었다. 특히 0.1%의 농도로 첨가해 주었을 때에는 90.7%의 효율을 나타내어 무첨가구에 비해 약 1.38배 증가한 형질전환 효율을 나타내었다. 이 보다 높은 농도인 1% Tween20 첨가구에서는 0.1% 첨가구와 유의적인 차이는 없었으나 형질전환 효율이 약간 감소하여 83.3%의 효율을 나타내었다. 따라서 톨페스큐의 캘러스를 이용한 *Agrobacterium* 감염시에 AS와 더불어 0.1%의 Tween20을 접종배지에 첨가해주는 것이 형질전환효율을 현저히 증가시킬 수 있는 것으로 판단되었다. 이러한 Tween20의 첨가효과는 Tween20에 의해 식물세포 표면에 존재할 수 있는 T-DNA의 전이를 저해하는 물질들이 효과적으로 제거되거나, 식물세포벽의 물리적 성질이 개선되어 *Agrobacterium*이 부착되기에 좋은 환경으로 개선됨으로서 T-DNA가 식물세포로 전이되는 것을 용이하게 하는 것으로 사료된다. 이와 같이 계면활성제를 *Agrobacterium* 감염시 첨가해줌으로서 형질전환 효율을 증가시킨 결과가 밀(Cheng *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2003)과 히야신스(Suzuki & Nakano, 2002) 등 에서도 보고된 바 있어서 본 실험의 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

#### 형질전환체의 선발과 확인

성숙종자로부터 유래된 캘러스를 *Agrobacterium*으로 감염시켜 공동배양한 후 형질전환 여부를 GUS 활성염색으로 확인한 결과 형질전환된 캘러스는 청색으로 염색되었다(Fig. 1A). 또한 post-culture 과정을 거쳐 50 mg/L의 Hm이 첨가된 선

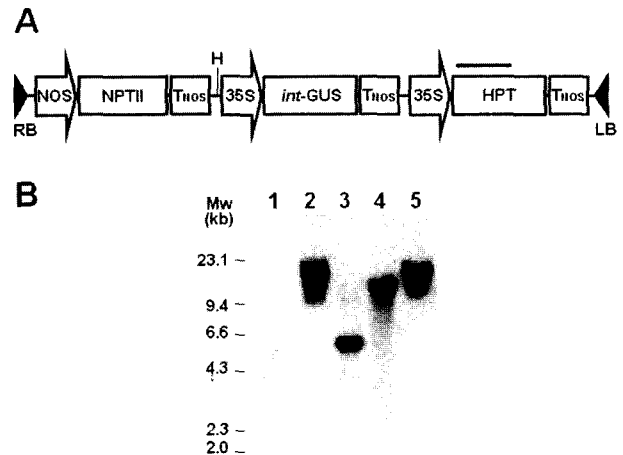


**Fig. 1.** Production of transgenic tall fescue plants. A, An embryogenic callus showing transient expression of the GUS gene. B, Hygromycin resistant calli showing GUS gene expression. C, GUS histochemical assay in transgenic plant. D, Transgenic plants in the rooting medium containing 50 mg/L hygromycin.

발배지에서 살아남은 캘러스를 GUS 염색으로 확인한 결과 높은 빈도로 염색되었다(Fig. 1B). 선발배지에서 Hm 내성을 가지면서 재분화된 형질전환 식물체를 GUS 유전자의 발현 여부를 활성염색으로 조사하여 본 결과 식물체의 모든 조직부위에서 청색으로 염색되어 *Agrobacterium*법에 의해 톨페스큐가 성공적으로 형질전환 되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 1C, D).

한편 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 형질전환 식물체의 genome내에 pIG121Hm 발현벡터가 가지는 T-DNA 영역이 도입되었는지를 확인하기 위해 온실에서 재배중인 형질전환 식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 Southern blot 분석을 실시하여 본 결과 비형질전환 식물체에서는 *hpt* probe(Fig. 2A)와 결합하는 DNA 단편을 확인할 수 없었으나 (Fig. 2B, lane 1), 형질전환식물체에서는 1개씩의 단편이 관찰되어 T-DNA가 1 copy씩 도입되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 2B, lanes 2-5).

지금까지 톨페스큐의 형질전환은 원형질체를 이용한 PEG법에 의한 것(Kauai *et al.*, 1999)과 particle bombardment법에 의한 것이 대부분이며(Cho *et al.*, 2000), 가장 안정적인 방법으로 알려진 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환이 Bettany *et al.*(2002)에 의해 최근에 보고되었다. 그러나 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* 유



**Fig. 2.** Southern blot analysis of the *hpt* gene in transgenic tall fescue plants. A, T-DNA region of pIG121Hm expression vector. The bold bar indicates the region of the probe used for Southern blot analysis. H, HindIII. 35S, 35S promoter of CaMV. int-GUS, Intron-containing GUS gene. HPT, Hygromycin resistance gene. B, Southern blot analysis of the *hpt* gene. Lane 1, Non-transgenic plants. Lanes 2-5, Transgenic plants.

전자를 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* 형질전환체계를 최초로 확립하였다. 이러한 톨페스큐의 효율적인 형질전환체계는 유용유전자의 도입에 의한 신품종 톨페스큐의 분자유종에 있어서 유용하게 응용되어질 수 있을 것이다.

적 요

유용유전자 도입을 통한 신품종 톨페스큐를 개발할 목적으로 *Agrobacterium*을 이용한 효율적인 형질전환 체계를 확립하였다. 톨페스큐 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 톨페스큐 캘러스의 형질전환 효율을 GUS 유전자의 발현정도로 조사하였다. *Agrobacterium* 감염시에 접종배지와 공동배양배지에 200 µM의 acetosyringone(AS)을 첨가해 주었을 때 형질전환 효율이 증가되었으며, 공동배양기간을 5일까지 증가시켰을 때 형질전환 효율이 증가되었다. 또한 *Agrobacterium* 감염시에 200 µM의 AS와 0.1%의 Tween20을 동시에 첨가해 주었을 때 가장 높은 형질전환 효율을 나타내었다. 50 mg/L의 hygromycin이 첨가된 선발배지에서 살아남은 캘러스로부터 정상적인 식물체가 재분화 되었으며 이들 형질전환체를 GUS 염색과 Southern blot 분석을 실시하여 본 결과 발현벡터의 T-DNA 영역이 형질전환 식물체의 genome에 성공적으로 도입되었음을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통하여 확립된 효율적인 형질전환 시스템은 분자유종을 통한 신품종 톨페스큐의 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 연구비지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

Arencibia, A. D., E. R. Carmona, P. Tellez, M. -T. Chan, S. -M. Yu, L. E. Trujillo, and P. Oramas. 1998. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Res.* 7 : 213-222.  
 Bettany, A. J. E., S. J. Dalton, E. Timms, B. Manderyck, M. S. Dhanoo, and P. Morris. 2002. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated

transformation of *Festuca arundinacea* and *Lolium multiflorum*. *Plant Cell Rep.* 21 : 437-444.  
 Buckner, R. C., J. B. Powell, and R. V. Frakes. 1979. Historical development. In: Buckner RC, Bush LP(eds) Tall Fescue. *Agronomy* 20: 1-8. Madison, WI, USA. American Society of Agronomy.  
 Cheng, M., J. E. Fry, S. Pang, H. Zhou, C. M. Hironaka, D. R. Duncan, T. W. Conner, and Y. Wan. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 115 : 971-980.  
 Cho, M. J., C. D. Ha, and P. G. Lemaux. 2000. Production of transgenic tall fescue and red fescue plants by particle bombardment of mature seed-derived highly regenerative tissues. *Plant Cell Rep.* 19 : 1084-1089.  
 Dalton, S. J., A. J. E. Bettany, E. Timms, P. Morris. 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.  
 Dalton, S. J., A. J. E. Bettany, E. Timms, and P. Morris. 1999. Co-transformed, diploid *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum* and *Lolium temulentum* plants produced by microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.* 18 : 721-726.  
 DeBondt, A., K. Eggermont, P. Druart, M. De Vil, I. Goderis, J. Vanderleyden, and W. Broekaert. 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple: an assesment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. *Plant Cell Rep.* 13 : 587-593.  
 Fieser, B. G. and E. S. Vanzant. 2004. Interactions between supplement energy source and tall fescue hay maturity on forage utilization by beef steers. *J. Animal Sci.* 82 : 307-318.  
 Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari, and T. Kumasiro. 1994. Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6 : 271-282.  
 Ishida, Y., H. Saito, S. Ohta, Y. Hiei, T. Komari, and T. Kumashiro. 1996. High efficiency of transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol.* 14 : 745-750.  
 Jefferson, R. A. 1987. Assay chimeric genes in plant: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5 : 387-405.  
 Kau B., S. J. Dalton, A. J. E. Bettany, and P. Morris. 1999. Regeneration of fertile transgenic tall fescue plants with a stable highly expressed foreign gene. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 58 : 149-154.  
 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.  
 Santarem, E. R., H. N. Trick, J. S. Essig, J. J. Finer. 1998. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Rep.* 17 : 752-759.  
 Slepser, D. A. 1985. Breeding tall fescue. *J. Plant Breeding Rev.* 3 : 313-342.  
 Spangenberg, G., Z. Y. Wang, and I. Potrykus. 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. 192-211.  
 Suzuki, S. and M. Nakano. 2002. *Agrobacterium*-mediated production of transgenic plants of *Muscari armeniacum* Leichtl. ex Bak. *Plant Cell Rep.* 20 : 835-841.  
 Tingay, S., D. McElroy, R. Kalla, S. Fieg, M. Wang, S. Thronton, and

- R. Brettell. 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J.* 11 : 1369-1376.
- Trifonova, A., S. Madsen, AND A. Olesen. 2001. *Agrobacterium*-mediated transgene delivery and integration into barley under a range of in vitro culture conditions. *Plant Sci.* 162 : 871-880.
- Usami, S., S. Morikawa, I. Takabe, and T. Machida. 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.
- Van Wijk, A. J. P., J. G. Boonman, and W. Rumball. 1993. Achievements and prospectives in the breeding of forage grasses and legumes. In: Baker, M. J. (Eds), *Grasslands for our world*, SIR, Wellington, p. 116-120.
- Wu, H., C. Sparks, B. Amoah, and H. D. Jones. 2003. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Rep.* 21 : 659-668.
- Zhao, Z. -Y., T. Cai, L. Tagliani, M. Miller, N. Wang, H. Pang, M. Rudert, S. Schroeder, D. Hondred, J. Seltzer, and D. Pierce. 2000. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. *Plant Mol. Biol.* 44 : 789-798.