

植物生長調節劑 處理가 들잔디의 Callus 誘起 및 Multiple Shoots 形成에 미치는 影響

沈載成 · 金東燦* · 徐炳基**

培材大學校 産業大學 園藝學科, 忠清南道 農村振興院*,

서울大學校 天然物科學研究所**

The Effects of Plant Growth Substances on the Callus Induction and Multiple Shoot Formation of Korean Lawngrass(*Zoysia japonica* Steud.)

Shim, Jai-Sung, D. C. Kim* and B. K. Seo**

Department of Horticulture, College of Industry, Pai Chai University

* Choong Nam Provincial Rural Development Administration

** Natural Products Research Institute, Seoul National University

ABSTRACT

We have established a high-frequency plant regeneration system via organogenesis from mature seed of Korean lawngrass (*Zoysia japonica* Steud.). The effects of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), 6-furfuryl amino purine (kinetin), α -naphthalene acetic acid (NAA), N⁶-benzyl amino purine (BAP), and casein hydrolysate (CH) on callus induction and multiple shoot formation on exposure to light were evaluated.

Callus produced on the Murashige and Skoog (MS) medium containing 2,4-D and kinetin had high organogenesis potency. A single addition of 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D significantly induced callus. Also, 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D, with the addition of 0.1 mg L⁻¹ kinetin highly enhanced callus induction. The trend of callus induction was also found on medium containing 0.1 mg L⁻¹ BAP with 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D, and 1 g L⁻¹ CH with the addition of 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D. However, NAA was no effective on callus formation.

The growth of root was significantly high in the presence of 0.1 mg L⁻¹ kinetin compared to other concentrations. Over 2 mg L⁻¹ kinetin highly lengthened roots.

Fresh weight of plantlet was highest on medium containing 0.1 mg L⁻¹ 2,4-D. Also, on medium containing 0.1 mg L⁻¹ BAP, fresh weight of plantlet was highly enhanced.

BAP was significantly effective on multiple shoot formation, particularly when 2.0 mg L⁻¹ was added with 0.1 mg L⁻¹ 2,4-D. Callus induction and multiple shoot formation were achieved on MS basal medium containing 1.0 g L⁻¹ CH.

緒 論

오늘날 種子繁殖과 多量의 個體를 확보하기 위한 수단으로 植物細胞와 組織을 培養하여 유전적으로 안정된 식물체를 생산해 내는 연구는 우리들에게 대단한 관심을 갖게 하였다.

禾本科 植物에서 callus배양은 이미 *Oryza sativa* L.,^{14, 15)} *Triticum* spp.,¹⁸⁾ *Zea mays* L.,¹³⁾ *Sorghum bicolor*(L.) Moench.,⁵⁾ *Saccharum officinarum* L.^{3, 9)} 및 기타 數種의 飼料作物^{6, 16, 18)}을 대상으로 實驗되었다. 최근에 Ahloowalia¹⁾는 ryegrass의 未熟種子로부터 callus를 誘起하였으며 Conger 및 Carabia⁷⁾도 orchardgrass의 成熟種子를 가지고 SH基本培地에 2,4-D 및 kinetin을 첨가하여 callus를 유도해냈다.

Al-Kahayri 등²⁾은 Zoysiagrass종자로부터 無菌의으로 胚를 摘出하여 90~98%의 callus를 誘起해 냈다고 報告하였으며 Asano³⁾도 들잔디의 成熟種子를 35℃의 光條件에서 1/2 MS배지에 배양한 뒤 幼苗를 材料로 하여 embryogenic callus를 얻었다고 보고하였다.

본 研究는 들잔디(*Zoysia japonica* Steud.)의 成熟種子를 材料로 하여 여기에 數種의 植物生長調節劑를 處理함으로서 callus誘起樣相과 multiple shoot形成에 미치는 影響을 究明하기 위하여 實施하였다.

材料 및 方法

實驗 1. 들잔디種자의 callus誘起

供試材料는 發芽處理된 들잔디 종자를 70% ethanol에 1분간 浸漬한 후 2%의 sodium hypochlorite에 0.1% Tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate)을 添加한 용액에 15분간 殺菌하고 滅菌水로 3~4회 洗滌한 다음 培養材料로 이용하였다.

培地는 Murashige and Skoog(MS)의 基本培地에 sucrose 30g/L, 寒天 8g/L을 添加하였으며 배지의 酸度는 agar를 첨가하기 전에 1 N-KOH를 사용하여 pH 5.8로 조절하였으며 이를 121℃에서 15분간 高壓蒸氣殺菌하였다. 殺菌시킨 培地는 60℃로 식힌 다음 다시 clean bench (Vision Co., LTD 製品)에서 再殺菌시키고 9cm 직경의 petri dish에 20ml씩 分注하였다.

實驗材料로 사용된 植物生長調節劑는 auxin系統의 物質로서 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) 및 NAA(α -naphthalene acetic acid)를 선택하였으며, 이 調節劑의 濃度는 각각 0, 0.1, 1.0, 2.0 및 5.0 mg/l로 하였다. 그리고 cytokinin系統의 물질로는 kinetin (6-furfuryl amino purine)를 사용하였고 사용량은 각각 0, 0.1, 1.0 및 2.0 mg/l로 하였다. 實驗을 할 때에는 이 材料들을 MS基本培地에다가 첨가하고 이들을 單獨 또는 相互 混用處理하여 供試培地로 사용하였다.

Petri dish에 종자를 置床할 때는 종자의 胚盤이 배지에 매몰되지 않도록 하였다. 1개의 petri dish에 20粒씩 置床하였고 處理當 5개의 petri dish를 配當하여 5反覆으로 배치하였다. 培養時에는 온도가 25+1℃로 조정된 培養室에서 16時間은 光條件으로, 그리고 8時間은 暗條件을 附與하였으며 光은 2,000Lux의 照度를 갖고 있는 형광등을 사용하였다.

生育調査는 培養하기 시작한 후 6週째에 실시하였고 發芽率, 生體重, callus誘起, shoot數, shoot長, root의 生長 등을 調査하였다.

實驗 2. 들잔디種자의 multiple shoots 形成 調査

種子로부터 직접 multiple shoots를 形成시키기 위하여 MS배지에 cytokinin系統의 물질로 kinetin, BAP(N-benzylaminopurine)와 auxin系統의 물질인 2,4-D를 單用處理 또는 相互混用處理하였다. 2,4-D와 kinetin의 混用處理時 2,4-D의 含量은 각각 0, 0.01, 0.1 및 1.0 mg /l등 4종류의 濃도와 kinetin의 含量을 각각 0, 1.0, 2.0, 5.0 및 10 mg /l등 5水準의 濃도로 하였다. kinetin 대신 2,4-D와 BAP만을 가지고 混用處理할 때에는 2,4-D의 含量을 각각 0, 0.1, 1.0, 2.0 및 5.0 mg /l로 하였고, BAP는 각각 0, 0.1, 1.0, 2.0 mg /l등 4水準의 濃도로 하였다.

供試材料, 種子消毒, 培養條件 및 調査事項은 實驗 1과 同一하게 하였다.

實驗 3. 들잔디種자의 callus誘起 및 multiple shoots形成에 대한 casein hydrolysate(CH)의 效果

들잔디種자로 부터 callus誘起 및 multiple shoots形成에 대한 casein hydrolysate의 效果를 究明하기 위하여 MS培地에 casein hydrolysate를 각각 0, 0.5, 1.0, 2.0, 및 5.0g /l를 처리하고 여기에 다시 2,4-D 1.0 및 2.0 mg /l와 kinetin 2.0 및 5.0 mg /l를 單用 또는 混用處理하였다.

供試材料, 種子消毒, 培養條件, multiple shoots 形成에 대한 生育調査는 實驗 1과 同一하였으며 callus誘起에 대한 生育調査는 發芽率과 生體重으로 하였다.

結果 및 考察

1. 植物生長調節劑處理가 들잔디 種자의 callus 誘起에 미치는 影響

MS基本培地에 2,4-D와 kinetin의 單一 및 混合處理함으로서 置床한지 6週만에 誘起된 各器官의 發生樣相은 Table 1과 같다. 植物體의 生體重은 2,4-D 0.1 mg을 단독처리한 실험구에서 980.0 mg으로 가장 높았으며 0.1 mg을 초과한 농도에서는 生體重在 크게 감소하였다. Kinetin 단독처리구에서는 0.1 mg을 처리하였을 때 생체중이 가장 크게 증가하여 350mg을 기록하였으나 0.1 mg 이상 1 및 2 mg을 단독으로 첨가하였을 때에는 生體重在 160mg에 불과하였고 5 및 10mg을 加用하면 20~30 mg의 생체중이 배양되어 kinetin농도를 1mg이상 증량시킴에 따라 生體重은 더욱 감소된다는 사실을 알 수 있었다.

또한 kinetin 및 2,4-D 混用處理로 因하여 惹起되는 植物體의 生體重의 變化를 보면 처리농도에 따라 kinetin 단독처리구보다는 대체로 증가하는 경향을 나타냈다. 그러나 이 樣相은 kinetin 처리농도에 관계없이 2,4-D농도를 1.0mg으로 하였을 때 유의하게 發現하였으며 다만 kinetin첨가량이 2.0mg 이상을 상회하면 2,4-D 농도가 0.1mg일 때 생체중이 증가하였다. 즉 2,4-D 1.0mg 混用區에서는 kinetin의 濃度差에도 불구하고 높은 增加勢를 보였으며 특히 이 현상은 kinetin의 濃도가 낮을수록 顯著하였다.

따라서 kinetin과 2,4-D를 添加物質로 사용하였을 때 發現되는 植物體의 生體重은 2,4-D 0.1 mg을 단독으로 처리하거나 kinetin을 첨가할 때에는 kinetin 0.1 mg + 2,4-D 1.0 mg이 가장 效果의이었다.

Callus誘起現象은 2,4-D 1.0mg을 단독으로 처리하였을 때와 kinetin 0.1mg + 2,4-D 1.0mg 혼용처리하였을 때 가장 良好하였다. 2,4-D 첨가수준에서 볼 때 2.0mg 이상으로 농도가 높아질수록 callus는 크게 誘起되지 못하였으며 특히 5.0mg을 첨가한 상태하에서 callus는 전혀 誘起

Table 1. The effect of kinetin and 2,4-D on organogenesis from mature caryopses of Korean lawngrass after 6 weeks of the *in vitro* culture

Treatments	Total fresh weight	Callus formation	No. of shoot	Shoot length	Root growth
mg /l	mg			cm	
Kinetin 0.0 + 2,4-D 0.0	190	-	1.0	3.94	+++
0.1	980	+	1.07	3.36	++
1.0	430	+++	-	-	-
2.0	280	++	-	-	-
5.0	80	-	-	-	-
Kinetin 0.1+ 2,4-D 0.0	350	-	1.0	1.80	+++
0.1	410	+	1.23	1.35	+
1.0	600	+++	0.39	-	-
2.0	200	++	-	-	-
5.0	50	-	-	-	-
Kinetin 1.0 + 2,4-D 0.0	160	-	1.20	0.98	++
0.1	140	-	1.44	0.78	+
1.0	360	++	0.26	0.50	-
2.0	60	+	-	-	-
5.0	40	-	-	-	-
Kinetin 2.0+ 2,4-D 0.0	160	-	1.35	1.06	++
0.1	110	-	1.73	0.54	+
1.0	220	+	-	-	-
2.0	90	+	-	-	-
5.0	20	-	-	-	-
Kinetin 5.0+ 2,4-D 0.0	30	-	1.0	1.21	+
0.01	100	-	1.12	0.95	+
0.1	170	-	1.53	0.83	-
1.0	120	+	0.95	-	-
Kinetin 10.0 + 2,4-D 0.0	20	-	1.10	0.72	-
0.01	90	-	1.22	0.86	-
0.1	150	-	1.47	0.61	-
1.0	130	-	0.17	-	-

되지 않았다. 또한 2,4-D 첨가없이 kinetin만을 단독으로 처리하였을 때에도 callus誘起現象은 나타나지 않았다.

그러므로 2,4-D와 kinetin을 混用한 培地가 callus誘起에 적절하다고 볼 수 있으며 이때 2,4-D 濃度 1.0mg과 kinetin濃度 0.1mg이 가장 理想的인 適正比率인 것으로 볼 수 있다. 그러나 이 이상의 농도하에서 2,4-D의 最大 誘起適正濃度로 예상되는 수치에서는 發現效果가 전혀 나타나지 않고 다만 callus의 老化를 촉진시키는 결과만을 초래하였다. 또한 kinetin의 濃度가 10.0 mg

을 超過하지 않는 範圍의 어느 수준에서도 1.0 ~ 2.0 mg의 2,4-D를 kinetin과 혼용하게 되면 callus는 항상 양호하게 誘起되는 것을 볼 수 있었다.

Shoot數는 대체로 2,4-D 0.1mg 濃度以下에서 양호하게 發見하는 양상이었다. 2,4-D 0.1mg과 kinetin을 혼용하였을 때 shoot의 發生數는 1.23 ~ 1.73개를 기록하여 다른 2,4-D농도보다도 많은 shoot가 發生하는 경향이였다. 그러나 shoot의 길이는 MS基本培地에서 培養할 때 가장 양호하게 伸長하였고 kinetin을 單獨處理하면 同一한 kinetin수준에서 2,4-D와 混用했을 때보다 항상 shoot伸長이 신속하게 이루어졌다. 그리고 kinetin만을 단독으로 처리하였을 때에도 濃度가 0.1 mg水準에서 shoot길이가 현저하게 伸長하였다.

根生長은 2,4-D를 혼용함이 없이 kinetin만을 단독으로 처리하였을 때 양호하였으나 농도는 0.1 mg수준에서 가장 양호한 伸長勢를 보였고 2.0mg까지 농도를 높여도 根의 生長은 비교적 잘 이루어졌다. 한편 callus유기현상과 근생장과의 관계를 보면 완전히 相反되는 反應을 나타내고 있다. 즉 callus가 2,4-D 1.0~2.0 mg수준에서 양호하게 유기된 반면 根은 0~9.1mg수준에서 강하게 신장하였다. 이는 2,4-D의 농도에 따라 器官形成이 크게 달라질 수 있다는 사실을 暗示한다.

Krans等¹²⁾은 creeping bentgrass의 成熟種子를 대상으로 callus誘起樣相을 報告하였다. 이들은 MS培地를 기본으로 하였을 때 光條件下에서는 2,4-D 1.0 mg /l이 첨가된 培地가 callus誘起에 가장 양호하였고 暗條件下에서는 2,4-D 1.0 mg /l과 kinetin 0.01 mg /l를 첨가한 培地에서 callus誘起가 가장 良好하게 나타났음을 發見하였다. 본 實驗의 結果도 實驗對象 草種은 달랐지만 여러 학자들이 遂行한 一連의 研究結果와 상당히 一致하고 있다.

Sears 및 Deckard¹⁷⁾도 小麥의 組織培養에서 약 12日된 未熟胚를 2,4-D 1.0mg /l가 添加된 MS基本培地에 置床하여 callus를 얻었다고 하였다. 또한 Al-Khayri等²⁾도 Zoysiagrass의 embryogenic callus를 2,4-D 1.0mg /l이 첨가된 MS培地에서 가장 많이 얻었다고 報告하여 본 實驗結果와도 매우 類似함을 볼 수 있다.

Table 2는 成熟한 들잔디종자에 kinetin과 NAA를 처리하였을 때 6週동안에 發見한 식물체의 생체중, callus誘起, shoot數, shoot長 및 根生長을 나타낸 것이다. NAA를 단독으로 처리하면 1.0mg을 혼용시까지 생체중은 160mg을 기록하였으나 kinetin 0.1 mg과 NAA 0.1 mg을 혼용 처리하면 생체중은 전 처리구중 가장 높은 290 mg을 기록하여 NAA단독처리구보다는 kinetin과 NAA의 혼용처리구에서 식물체의 생체중이 증가하는 경향이였다. 그러나 kinetin농도가 2.0 mg로 증가되었을 때 NAA혼용은 생체중을 低下시켰으며 더욱이 kinetin 2.0 mg이상에 NAA 5 mg이상이 첨가되면 생체중은 10mg정도로 급격히 減少하였다.

Callus는 NAA 2.0mg 이상의 단독처리구와 혼용처리구에서 약간 誘起되었지만 老化現象이 심하게 發生하였다. 또한 shoot수는 NAA단독으로 처리되었을 때 1개체에서 1개 정도가 발생하였고 이 현상은 kinetin을 0.1mg까지 첨가하더라도 변화되지 않았다. 그러나 kinetin이 1.0 g이상 첨가되면 NAA첨가량에는 관계없이 비교적 shoot가 증가되는 양상을 보였다.

Kinetin과 함께 NAA를 첨가한 培地에서 들잔디종자를 배양하면 대체로 NAA 1.0mg까지는 根發生이 이루어지는 것으로 나타났다. 특히 kinetin 0.1mg의 단독처리구와 kinetin 1.0mg + NAA 0.1mg의 混用處理區에서는 root生長이 매우 양호하였다.

Table 2에서 나타난 結果를 綜合해 보면 NAA물질을 단독으로 처리했을 때 2.0~5.0 mg을 첨가하면 callus가 대단히 미약하게 유기되었고 kinetin 0.1 및 1.0 mg까지 첨가하더라도 그렇게 왕성하게 發見되지 못하였다. 이런 점으로 미루어 보아 auxin系統의 物質중 NAA는 2,4-D보다

Table 2. The effect of kinetin and NAA on organogenesis from mature caryopses of Korean lawngrass after 6 weeks of the *in vitro* culture

Treatments	Total fresh weight	Callus formation	No. of shoot	Shoot length	Root growth
mg /l	mg			cm	
Kinetin 0.0 + NAA 0.0	230	-	1.0	2.41	++
0.1	160	-	1.0	2.12	++
1.0	160	-	1.0	2.96	+
2.0	90	+	1.0	1.07	-
5.0	60	+	0.64	0.93	-
Kinetin 0.1+ NAA 0.0	250	-	1.0	1.62	++
0.1	290	-	1.0	1.84	++
1.0	70	-	1.0	1.73	+
2.0	70	+	1.07	0.92	-
5.0	50	+	0.90	0.84	-
Kinetin 1.0 + NAA 0.0	190	-	1.17	1.21	+++
0.1	220	-	1.09	1.41	+++
1.0	20	-	1.12	0.80	+
2.0	10	+	0.75	0.90	-
5.0	10	+	1.36	0.71	-
Kinetin 2.0+ NAA 0.0	140	-	1.17	1.02	+
0.1	80	-	1.28	0.95	+
1.0	60	+	1.78	0.56	-
2.0	10	-	1.0	0.84	-
5.0	10	-	1.36	0.69	-

들잔디종자의 callus유기에는 크게 효과적이지 못하다는 사실을 알 수 있다.

MS기본배지에 NAA를 첨가함으로써 나타나는 callus 誘起와, shoot長 및 root生長과의 關係를 보면 대체로 callus가 형성됨에 따라 shoot 및 root의 生長이 低調하였는데 이러한 현상은 2, 4-D處理區에서와 同一한 樣相이었다.

2. 植物生長調節物質이 들잔디 種子로 부터 器官形成에 미치는 影響

Table 3은 BAP 단독처리 및 BAP + 2,4-D의 혼용처리가 들잔디의 器官形成에 미치는 효과를 比較分析한 것이다. 植物體의 生體重을 보면 BAP 단독처리를 했을 때 0.1 mg의 濃度에서 다른 濃度下에서보다 가장 많은 450mg이 배양되었다. 이 숫치는 2,4-D단독처리구에서 980mg 培養된 것보다는 적었으나 (Table 1) kinetin 단독처리구에서 얻은 350mg보다는 현저하게 많았다. 또한 2,4-D와의 혼용하에서는 BAP만 단독으로 처리한 것보다도 生體重은 항상 적었다.

BAP를 단독으로 처리하면 callus는 전혀 유기되지 않았으며 2,4-D와 혼용할 때만이 誘起가 可能하였다. 특히 BAP 0.1 mg + 2,4-D 1.0 mg 혼용구에서 가장 양호한 誘起效果가 發現되었으며 2,4-D 1.0mg과 BAP 1.0 ~ 2.0 mg과의 혼용구에서도 유기현상은 비교적 양호하게 發現되었

Table 3. The effect of BAP and 2,4-D on organogenesis from mature caryopses of Korean lawngrass after 6 weeks of the *in vitro* culture

Treatments	Total fresh weight	Callus formation	No. of shoot	Shoot length	Root growth
mg /l	mg			cm	
BAP 0.0 + 2,4-D 0.0	140	-	1.0	2.82	+++
0.1	380	+	0.94	2.39	+
1.0	160	++	-	-	-
2.0	150	+	-	-	-
5.0	50	-	-	-	-
BAP 0.1+ 2,4-D 0.0	450	-	2.37	0.95	++
0.1	90	-	1.71	0.52	+
1.0	260	+++	-	-	-
2.0	40	+	-	-	-
5.0	40	-	-	-	-
BAP 1.0 + 2,4-D 0.0	400	-	2.63	0.56	+
0.1	140	-	2.83	0.36	+
1.0	90	++	-	-	-
2.0	90	+	-	-	-
5.0	30	-	-	-	-
BAP 2.0+ 2,4-D 0.0	320	-	3.49	0.48	-
0.1	110	-	2.97	0.33	+
1.0	60	++	0.42	0.16	-
2.0	40	+	-	-	-
5.0	40	-	-	-	-

다.

Shoot形成樣相을 보면 BAP만을 가지고 2 mg으로 증량할 때까지 shoot數는 증가되는 것을 觀察할 수 있었다. 특히 2.0mg의 BAP處理區에 있어서는 種子 1粒當 3.49個의 shoot가 形成되어 이는 2,4-D, kinetin 또는 NAA의 單獨處理에 의해 形成된 shoot수보다 월등히 많은 것이었다. 2,4-D와 혼용했을 때에는 BAP 2.0 mg + 2,4-D 0.1 mg의 處理區에서 가장 많은 2.94個의 shoot가 形成되었다.

Shoot의 길이는 MS基本培地區에서 2.82cm를 기록하였으나 BAP가 混用되면 shoot신장은 1cm이하로 급격히 短縮되었으며 특히 BAP와 2,4-D가 高濃度로 添加될수록 shoot의 伸長은 더욱 抑制的인 現象으로 나타났다. 뿌리의 生長도 MS基本培地區에 비해 BAP添加區에서 거의 抑制的이었고 BAP와 2,4-D가 高濃度로 添加될수록 뿌리는 전혀 發生하지 않았다.

Table 3에서 나타난 結果를 綜合해 보면 BAP가 植物體의 生체중에 미치는 影響은 2,4-D보다 다소 抑制的인 方向으로 작용하지만 NAA 및 kinetin보다는 顯著하게 促進的으로 작용하였다. Callus誘起에 대한 BAP單獨處理效果는 전혀 나타나지 않았으나 2,4-D 1.0 mg과의 혼용하에서 BAP 0.1 mg은 고도로 有의적인 作用을 하였다.

Shoot의 生長에 있어서는 BAP가 kinetin이나 NAA보다 다소 억제적으로 작용하였으나 shoot形成에 대해서는 kinetin이나 NAA보다는 BAP가 더 效果的인 것으로 나타났다. 한편 shoot形成에 적당한 BAP의 濃度는 본 실험에서 2.0 mg 수준인 것으로 思料되었다.

Hisajima¹¹⁾는 옥수수, 벼 그리고 大豆種子를 利用한 shoot形成은 cytokinin類에 의해서 增加되고 그 중 BAP가 가장 效果的이었다고 報告하였다. 또한 그는 BAP의 濃度가 낮을 때에는 側芽가 分化되었고 濃度가 높으면 shoot가 잘 形成되었다고 報告하여 本實驗의 結果와도 類似한 傾向을 보여주고 있다.

3. Casein hydrolysate(CH)가 들잔디種子로 부터 callus誘起 및 multiple shoot形成에 미치는 影響

Table 4에서 보는 바와 같이 들잔디 種子를 2,4-D 1.0 mg과 2.0 mg에 CH를 添加하여 6週동안 培養한 結果 2,4-D 1.0 mg 單獨處理區의 callus生體重이 350.0 mg을 기록하고 있으나 2,4-D 1.0 mg의 존재하에 CH 1.0 g을 첨가하였을 때 callus生體重이 440 mg을 기록하고 있고 2,4-D 1.0 mg에 CH 0.5g을 첨가하더라도 식물체의 생체중은 380mg을 기록하여 CH 0.5 ~ 1g과 2,4-D 1.0mg은 생체중 증가에 적절한 농도인 것으로 추정할 수 있으며 또한 CH가 2,4-D와 함께 混用되면 callus의 誘起를 促進하는 것으로 볼 수 있다. 이와 같은 현상은 Zaghmout 및 Torello²¹⁾가 報告한 바와 같이 CH의 添加가 細胞의 生長率을 증진시킨 데에서 起因된 結果인 것으로 思料된다. 그러나 2,4-D만 첨가된 처리구와 CH가 2.0 g以上 添加된 處理區에서는 callus의 褐變化 現象이 나타남을 볼 수 있어 CH의 첨가량이 극히 제한적임을 알 수 있었다.

반면에 많은 學者들은 CH의 callus 誘起 및 shoot形成에 매우 促進的이라는 研究結果를 발표하고 있다. 예를 들어 Vasil 및 Vasil²⁰⁾은 Gramineae에서 embryogenic calli의 誘起 및 維持에 CH가 效果的이라고 하였고 Gamborg⁸⁾도 細胞培養에 無機成分의 添加는 適當하지 않지만 CH 0.05 ~ 0.2%의 添加는 良好한 callus를 誘起시킬 수 있었는데 그 이유는 CH가 enzyme 혹은 acid hydrolyzate로서 作用하기 때문이라고 報告하였던 점으로 미루어 보아 callus유기에 대한 CH의 効果는 인정된다고 볼 수 있다. 또한 Collins 및 Grosser⁶⁾도 embryo culture에서 CH가 amino acid를 供給하고 osmolarity에 效果가 있다고 보고한 사실도 결국 CH가 callus形成促進에 潛在的 可能性을 지닌 生長調節劑임을 확인시켜주는 事例가 아닌가 보여진다.

그러나 Vasil 및 Vasil²⁰⁾은 callus誘起調節劑로서의 CH효과를 다소 부정하고 있는 입장이고 또 本實驗에서도 CH 單獨으로 callus誘起現象을 計測하지 않았기 때문에 이 部分에 대한 今後의 補完的인 研究檢討가 있어야 할 것으로 본다.

Table 5는 kinetin과 CH를 單獨 혹은 混用處理하였을 때 들잔디 종자의 器官形成에 미치는 影響을 나타낸 것이다. Kinetin의 존재하에서 CH 1.0g과의 혼용은 생체중을 有意的으로 증가시켰다. kinetin 2mg + CH 1.0g 혼용구에서 생체중은 360 mg을 기록하였지만 이는 2,4-D 1.0 mg + CH 1.0 g 혼용구에서 기록된 440mg보다는 크게 감소된 수치였다. 이것은 MS基本培地에 CH를 添加劑로서 사용하고자 할 때 kinetin보다는 2,4-D가 더욱 良好하다는 것을 示唆한다.

kinetin 2.0 mg + CH 1.0 g 混用處理區에서는 shoot生長(shoot長 및 shoot數)도 有意적으로 발현하였다. 특히 kinetin이 2 mg첨가에 CH添加區가 添加되지 않은 區보다 shoot個體數가 增加하는 樣相을 보였으나 kinetin 5 mg의 존재하에서는 CH混用處理는 농도가 증가할수록 kinetin단독처리구보다 낮아지는 傾向이었다. 따라서 shoot形成에 있어서 CH의 效果는 kinetin 2 mg과 CH 1g을 混用하여 사용했을 때만이 有意적 效果가 發現됨을 確認할 수 있었다. 한편 卞

Table 4. The effect of casein hydrolysate(CH) and 2,4-D on callus derived from mature caryopses of Korean lawngrass after 6 weeks of *in vitro* culture

Treatments	Germination rate	Fresh weight of callus
mg /l	%	mg
2,4-D 1.0 + CH 0.0	31	350
0.5	25	380
1.0	26	440
2.0	30	240
5.0	38	240
2,4-D 2.0 + CH 0.0	32	290
0.5	35	310
1.0	34	340
2.0	40	210
5.0	36	190

Table 5. The effect of casein hydrolysate(CH) and kinetin on multiple shoots derived from mature caryopses of Korean lawngrass after 6 weeks of *in vitro* culture

Treatments	Total fresh weight	No. of shoot	Shoot length	Root growth
mg /l g /l	mg		cm	
Kinetin 2 + CH 0.0	180	1.55	1.13	++
0.5	220	1.89	1.90	+
1.0	360	2.97	2.17	+
2.0	170	2.41	1.97	++
5.0	190	2.70	1.27	+++
Kinetin 5 + CH 0.0	190	2.56	1.08	+
0.5	210	1.54	1.54	++
1.0	230	2.03	1.63	+++
2.0	200	1.05	1.49	+++
5.0	150	1.28	1.30	++

리는 kinetin이 2 mg 수준에서 CH가 5 g까지 高濃度로 添加되거나 또는 kinetin이 고농도, 즉 5 mg 수준에서 CH 1.0 ~ 2.0 g을 첨가하였을 때 가장 왕성하게 發現하는 것을 볼 수 있었다.

摘 要

Kinetin, 2,4-D, NAA, BAP 및 casein hydrolysate(CH) 등 5개의 植物生長調節劑處理에 따른 들잔디종자의 植物體 生體重, callus誘起 및 multiple shoot形成에 미치는 影響에 대한 實驗結果를 要約하면 다음과 같다.

1. MS基本培地에 2,4-D 0.1 mg /l添加는 들잔디종자로 부터 發現된 식물체의 生體重과 shoot

- 수를 顯著하게 증가시켰고 2,4-D 1 mg /l + kinetin 0.1 mg /l의 혼용하에서는 生體重 增加와 callus誘起現象을 促進하였다. 또한 1 mg /l의 2,4-D 單獨添加는 callus誘起에 매우 效果的이었으며 kinetin 0.1mg /l의 단독處理區에서는 root의 生長을 良好하게 發現시켰다.
2. NAA處理에 따른 植物體 發現은 다른 調節劑를 사용한 區에서보다 비교적 抑制的인 방향으로 作用하였고 특히 callus形成은 NAA를 처리함으로써 거의 誘起되지 않았다. 다만 NAA 0.1 mg /l + kinetin 0.1 mg /l 混用處理區에서 뿌리의 形成이 매우 양호하게 發現하였다.
 3. BAP 0.1 mg의 단독처리구에서 식물체의 생체중은 有意的으로 增加하였으며 2mg까지 增量함에 따라 shoot數도 현저하게 증가하였다. 한편 BAP 0.1 mg /l + 2,4-D 1.0 mg /l의 혼용은 callus를 현저하게 誘起시켰고 BAP 2.0 mg /l에 2,4-D 0.1mg /l을 혼용처리하였을 때에는 shoot形成이 가장 왕성하게 발현하여 callus誘起와 multiple shoot形成간에 生長調節劑의 濃度差에 따른 식물체 誘起現象이 상반되게 發現하는 것을 관찰할 수 있었다.
 4. CH 1.0 g /l에 kinetin 2 mg /l를 첨가한 混用區에서는 callus가 매우 왕성하게 誘起되었고 multiple shoot의 형성도 양호하여 shoot의 길이 및 數도 크게 증가하였다. 한편 kinetin 대신 2,4-D 2 mg /l을 混用하면 callus誘起現象이 뚜렷하게 나타났다.

引用文獻

1. Ahloowalia, B. S. 1975. Regeneration of Ryegrass Plant in Tissue Culture. *Crop Sci.*, 15:449-452.
2. Al-Khayri, J. M., F. H. Huang, L. F. Thompson, and J. W. King. 1989. Plant regeneration of Zoysiagrass from embryo derived callus. *Crop Sci.*, 29:1324-1325.
3. Asano, Y. 1989. Somatic embryogenesis and protoplast culture in Japanese lawngrass (*Zoysia japonica* Steud.). *Plant Cell Reports*, 8:141-143.
4. Atkin, R. K., and G. E. Baraton. 1973. The establishment of tissue culture of temperate-grasses. *J. Exp. Bot.*, 24:689-699.
5. Barba, R. K. and L. G. Nickell. 1969. Nutrition and organ differentiation in tissue cultures of sugar cane, a monocotyledon. *Planta*, 89:299-302.
6. Collin, G. B., and J. W. G. Grosser. 1984. Culture of embryos. In: Vasil, I. K. (ed.) *Cell culture and somatic cell genetic of plant*. Vol. 1, New York, pp. 241-257.
7. Conger, B. V., J. V. Carabia. 1978. Callus induction and plantlet generation in orchardgrass. *Crop Sci.*, 18:157-159.
8. Gamborg, O. L. 1982. Callus and cell culture, In: *Plant tissue culture methods*. Wetter L. R., F. Constable, (ed.) pp. 1-9.
9. Gamborg, O. L., F. Constable, and R. A. Miller. 1970. Embryogenesis and production of albino plants from cell cultures of *Bromus inermis*. *Planta*, 95:355-358.
10. Heinz, D. J., and G. W. P. Mee. 1969. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* species. *Crop Sci.*, 9:346-348.
11. Hisajima, S. 1982. Microplant propagation through multiple shoot formation from seeds and embryo. *Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue & Cell Culture*.

12. Krans, J. V., V. T. Henning, and K. C. Torres. 1982. Callus induction, maintenance and plantlet regeneration in creeping bentgrass. *Crop Sci.*, 22:1193-1197.
13. Mastellar, V. J., and D. J. Holden. 1970. The growth and organ formation from callus tissue of sorghum. *Plant Physiol.*, 45:362-364.
14. Nizeki, H., and K. Oono. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Japan Acad. Proc.*, 44:554-557.
15. Nishi, T., Y. Yamada, and E. Takahashi. 1968. Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. *Nature*, 219:508-509.
16. Norstog, K. J. 1956. Growth of ryegrass endosperm *in vitro*. *Bot. Gaz.*, 117:253-259.
17. Sears, R. G., and E. L. Deckard. 1982. Tissue culture variability in wheat callus induction and plant regeneration. *Crop. Sci.*, 22:546-550.
18. Shimada, T., T. Sasakuma, and K. Tsunewaki. 1969. *In vitro* culture of wheat tissues. I. Callus formation, organ redifferentiation and single cell culture. *Can. J. Genetic. Cytol.* 11:294-304.
19. Smith, H. H. 1974. Model system for somatic cell plant genetics. *Bio. Sci.*, 24:269-275.
20. Vasil, V., and I. K. Vasil. 1984. Induction and maintenance of embryogenic callus cultures of Gramineae. In: Vasil, I. K. (ed.) *Cell culture and somatic cell genetics of plant*. Vol. 1, New York, pp. 36-42.
21. Zoymout, O. M. F., and W. A. Torello. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of red fescue. *Crop. Sci.*, 29:815-817.