

성숙종자 유래 캘러스를 이용한 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)의 효과적인 식물체 재분화

배창휴 · 遠山纘一¹ · 이성춘¹ · 임용표² · 김호일³ · 송필순⁴ · 이효연^{1*}

순천대학교 농업과학연구소, ¹순천대학교 농업생명과학대학, ²충남대학교 농과대학, ³농촌진흥청 농업과학기술원 생물자원부,
⁴금호생명환경과학연구소

Efficient Plant Regeneration Using Mature Seed-Derived Callus in Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.)

BAE, Chang-Hyu · TOHYAMA, Kohichi¹ · LEE, Sheong Chun¹ · LIM, Yong Pyo² · KIM, Ho Il³ · SONG, Pii-Soon⁴ ·
LEE, Hyo Yeon^{1*}

Research Institution of Agricultural Science, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea

¹College of Agriculture, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea

²College of Agriculture, Chungnam National University, Taejeon, 305-764, Korea

³National Agricultural Science and Technology Institute, RDA, Suwon, 441-707, Korea

⁴Kumho Life and Environmental Science Laboratory, Kwangju, 500-712, Korea

ABSTRACT Using mature seed-derived callus, optimal conditions for efficient callus growth and plant regeneration, and regeneration efficiency by callus type were investigated in zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). Callus induction was highest when the seeds were cultured on MS medium containing 2 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L BAP, 4 mg/L thiamine-HCl and 100 mg/L α -ketoglutaric acid. Callus growth was highest when callus were cultured on MS medium containing 0.5 mg/L 2,4-D, 0.05 mg/L BAP, 4 mg/L thiamine-HCl and 100 mg/L α -ketoglutaric acid. Plant regeneration was highest when callus was transferred on MS medium containing 3% maltose and 1 mg/L BAP, or 1 mg/L thidiazuron (TDZ). The combinations and concentrations of 2,4-D and BAP were shown to be critical factors for both the frequency and the type of callus. And four morphologically distinct types of callus were induced from the 2,4-D and BAP treatment. Type I, II and III calli produced shoots upon subculture, while the watery callus, type IV produced roots without shoots. Of four types of callus, type I exhibited the maximum frequency (82%) of shoot regeneration and the minimum frequency (4%) of albinism.

Key words: Albinism, auxin, callus type, cytokinin, thidiazuron

서 론

들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)는 난지형 잔디로서 한국을 포함한 극동 아시아와 대부분의 온대지역에 분포하는 식

물이다. 국내의 경우 그 이용 범위가 매우 넓어서 주로 하천 제방, 도로주변, 묘지 등의 피복용으로 사용되고 또한 주택과 공원의 조경용 식물로도 널리 이용되고 있다. 최근 축구장, 골프장, 야구장 등의 운동장에도 점차 재배면적이 증가되고 있는 추세이다. 따라서 들잔디에 대한 다양한 용도의 품종개발이 요구되고 있으며, 특히 내병성, 내한성, 제초제 저항성 품종개발이 필요한 실정이다. 잔디의 품종육성은 전통적인 육종

*Corresponding author. Tel 061-750-3286 Fax 061-750-3208
E-mail hyoyeon@suncheon.suncheon.ac.kr

방법을 이용하고 있으나 최근에는 분자생물학적 방법을 이용하여 신품종 개발이 시도되고 있다 (Chai and Sticklen 1998; Hansen and Wright 1999). 이와 같이 분자생물학적 방법을 이용한 잔디의 신품종 개발에 있어서 가장 기본이 되는 것은 식물세포를 이용하여 고효율의 식물체 재분화 체계를 확립하는 일이다.

지금까지 잔디의 조직배양계에 사용된 세포는 종자 유래의 캘러스 (Al-Khayri et al. 1989; Han et al. 1996), 미숙배 유래 체세포 (Noh et al. 1995; Park and Ahn 1998), 원형질체 (Inokuma et al. 1996) 등이 보고되고 있으며, 또한 종자 유래의 캘러스에서 배지의 종류, 식물생장조절제의 종류 및 기타 첨가물에 대해서도 연구되어 왔다 (Yoo and Kim 1991; Han et al. 1996). 그러나, 잔디는 품종에 따라서 캘러스 유도, 증식 및 식물체 재분화에 많은 차이를 보이고 있으며, 특히 동일 품종에서 유도된 캘러스 간에도 재분화 능력의 차이를 보이고 있다 (Yoo and Kim 1991; Han et al. 1996). 이러한 문제점을 해결하는 방법은 식물체 재분화에 유리한 캘러스를 선발한 후 균일한 형태의 캘러스를 대량 증식하는 조건을 확립하는 것이고, 동시에 체세포 변이가 적은 식물체를 유도하는 것이다.

따라서, 본 연구는 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)의 성숙 종자로부터 식물체 재분화에 유리한 캘러스 유도 및 증식조건을 확립하고, 또한 캘러스 형태에 따른 식물체의 재분화 특성 및 재분화 빈도를 증대시킬 목적으로 실시하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 캘러스 유도

공시재료는 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)로서 종피를 제거하여 70% ethyl alcohol에서 1분간 교반한 후 최종 농도 0.001% (v/v)의 Tween 20이 첨가된 5% sodium hypochlorite 용액에서 15분간 표면살균하였다. 살균된 종자는 멸균수로 3~4회 세척한 다음 1 mg/L의 2,4-D, 3% sucrose, 0.2% gelite가 포함된 N6 (Chu et al. 1975) 배지에 치상하여 2주간 배양한 후 캘러스를 유도하였다. 배지의 pH는 5.8로 적정하였고, 배양은 26±1°C, 암조건에서 행하였다.

재분화용 캘러스에 적합한 기본배지 검토

예비실험에서 캘러스의 외형에 따라서 재분화 능력의 차이가 관찰되었기 때문에 기본배지 종류에 따라 재분화능력을 갖는 캘러스가 유도되는 빈도를 조사하였다. 상기에서 유도된 부드럽고 물기가 있는 캘러스를 제외한 재분화력이 있는 캘러스를 직경 3 mm 크기로 절단한 후 1 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BAP, 4 mg/L thiamine-HCl, 100 mg/L α -ketoglutaric acid이 포함된 MS (Murashige and Skoog 1962), N6, LS

(Linsmaier and Skoog 1965), B5 (Gamborg et al. 1968)와 R2 (Ohira et al. 1973) 기본배지에 시험관 (직경 1.5 cm×15 cm) 당 3개씩, 50반복으로 치상하였다. 배양은 상기와 동일한 조건에서 행하였으며, 외형상 재분화 능력이 있는 캘러스 증식물은 배양 2개월 후 치상된 전체 캘러스의 수에 대한 부드럽고 물기가 있는 캘러스를 제외한 캘러스의 수를 백분율로 나타내었다.

생장조절제에 따른 재분화성 캘러스 유도 및 외형적 분류

종자로부터 재분화 능력이 있는 캘러스의 유도가 성장조절제의 농도에 따라서 차이가 있는지를 검토하였다. 상기의 기본배지 검토에서 재분화력을 갖는 캘러스 유도에 가장 효과적인 MS 기본배지에 4 mg/L thiamine-HCl, 100 mg/L α -ketoglutaric acid를 첨가하고 (Asano et al. 1996), 2,4-D 0, 1, 2, 4, 8 mg/L와 BAP 0, 0.02, 0.2, 2, 4 mg/L를 조합하여 샬레 (직경 9 cm×1.5 cm) 당 100개의 종자를 3반복 치상하였다. 배양은 상기와 동일한 조건에서 행하였으며, 캘러스의 유도율은 배양 3개월 후에 치상된 총 종자수에 대한 캘러스가 유도된 종자수를 백분율로 나타내었다.

캘러스의 외형적 분류는 2,4-D (1, 2, 4, 8 mg/L)와 BAP (0, 0.02, 0.2, 2, 4 mg/L)를 조합한 상기의 성장조절제에 따른 캘러스 유도 실험과 동일한 배지에 종자를 동일한 방법으로 처리하여 배양 3개월 후에 캘러스의 색깔과 견고도를 기준으로 4가지 Type (Table 1)으로 캘러스를 분류하였다. 배양은 상기와 동일한 조건에서 행하였다.

식물체 재분화에 미치는 당류 및 cytokinin류의 영향

캘러스로부터 식물체 재분화에 미치는 당류의 영향을 조사하기 위해서 Type I 캘러스를 직경 약 2 mm로 절단한 후 TDZ 1 mg/L와 fructose, galactose, glucose, maltose, sucrose가 각각 3%씩 첨가된 MS 재분화 배지에 치상하였다. 각 처리구는 샬레 당 25개씩 3반복 치상하였다. 재분화 빈도는 배양 2주 후 캘러스로부터 분화된 2 mm 이상 신장한 신초수로 조사하였다. 또한 당류 중에서 신초 재분화가 가장 양호했던 maltose의 최적 농도를 조사코자 Type I 캘러스를 maltose 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5, 9%의 농도로 첨가된 MS 배지에 치상하였다. 재분화 빈도는 배양 2주 후 캘러스로부터 분화된

Table 1. Types of callus induced from mature seeds of *Zoysia japonica* Steud. cultured on MS media containing 0 to 8 mg/L 2,4-D and 0 to 4 mg/L BAP for 3 months.

Types of callus	Colour	Texture
Type I	Yellow	Differentiated structure
Type II	White	Non-friable and compact
Type III	Yellow	Friable and compact
Type IV	Whitish yellow	Friable, soft and watery

2 mm 이상 신장한 신초수를 조사하여 산출하였다.

Cytokinin류의 종류와 농도에 따른 재분화 빈도를 조사하기 위해 Type I 캘러스를 3% maltose, 0.2% gelite와 kinetin, BAP, TDZ를 각각 1 또는 4 mg/L 첨가된 MS배지에 치상하였다. 각 처리구는 샬레 당 16개씩 3반복 치상하였고, 재분화 빈도는 광조건에서 배양한 후에 녹체를 형성하는 개체를 조사하여 산출하였다. 상기의 캘러스로부터 재분화시의 배양은 모두 광조건 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)에서 행하였다.

캘러스 유형에 따른 재분화

암조건에서 계대배양 된 4가지 유형의 캘러스를 약 10 mg으로 절단한 후 1 mg/L의 BAP와 3% maltose가 포함된 MS 배지에 샬레 당 25개씩 치상하여 2주 후 신초수의 분화를 관찰하였다. 식물체 재분화율은 치상한 각 캘러스 총수에 대한 5 mm 이상의 신초가 분화한 캘러스의 수를 백분율로 나타내었다. 배양은 광조건 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)에서 행하였다.

결과 및 고찰

기본배지 종류에 따른 재분화성 캘러스 빈도

종자에서 유도된 캘러스를 5종류의 기본배지에 치상하여 2개월 후에 부드럽고 물기가 있는 캘러스를 제외한 재분화력을 갖는 캘러스 빈도를 조사하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 MS 기본배지에 치상된 종자에서 5.8%로 가장 높게 나타났다으며, 그 외 R2, LS, N6, B5 배지에서 각각 2.8%, 1.4%, 0.7%, 0.7%의 빈도를 보였다. 이것은 MS 배지가 다른 기본배지에 비해서 2~9배 정도 높은 유도율을 나타낸 것이다. 이러한 결과는 지금까지 들잔디의 종자에서 캘러스 유도시에 MS 배지가 적합하다는 결과 (Han et al. 1996; Inokuma et al. 1996)와 일치한다. 이와같이 화본과 식물인 들잔디가 벼 (Chu et al. 1975; Hiei et al. 1994), 옥수수 (Carvalho et al. 1997)와는 다르게 무기이온 함량이 다른 배지보다 비교적 높은 MS 배지에서 많이 유도된다는 것은 흥미 있는 결과이다.

Table 2. Effects of basal media on regenerative callus (RC) induction from seeds of *Zoysia japonica* Steud.

Basal media	No. of callus tested ^a	No. of RC (%)
MS	139	8 (5.8)
LS	141	2 (1.4)
N6	144	1 (0.7)
B5	141	1 (0.7)
R2	141	4 (2.8)

^aTwo-week cultured calli on N6 medium were plated on different basal media containing 1 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BAP, 4 mg/L thiamine-HCl and 100 mg/L α -ketoglutaric acid for 2 months.

생장조절제의 농도에 따른 종자로부터 재분화성 캘러스의 빈도

2,4-D와 BAP가 혼용된 배지에 종자를 치상한 후 3개월째 캘러스 유도율을 조사한 결과 (Table 3), 재분화 능력을 갖는 캘러스가 가장 많이 유도된 것은 2 mg/L 2,4-D와 0.2 mg/L BAP가 포함된 처리구로 출현빈도는 18.3%를 보여주었다. 그러나, 2,4-D가 포함되지 않는 배지에서는 캘러스의 유도 없이 유식물체만 관찰되었고, 또한 4 mg/L 이상의 고농도의 2,4-D와 BAP가 첨가된 처리구에서는 캘러스의 유도는 관찰되었으나 배양 시간이 경과할수록 갈변된 캘러스가 증가하였다. 이러한 결과는 재분화 능력이 있는 캘러스를 종자로부터 유도하는 데 있어서 2,4-D와 BAP의 농도가 매우 중요하다는 것을 보여준 것으로 이와 유사한 결과가 다른 품종의 잔디 (Ke and Lee 1996)와 옥수수 (Carvalho et al. 1997)에서도 보고되었다. 또한 이들 캘러스를 5주간 계대배양한 후 생장은 0.5 mg/L 2,4-D와 0.05 mg/L BAP가 포함된 처리구에서 가장 높았다.

생장조절제의 농도와 조합에 따른 캘러스의 유형

들잔디의 종자를 2,4-D와 BAP가 조합된 배지에서 배양하

Table 3. Effects of different hormonal combinations of 2,4-D and BAP on regenerative callus induction from seeds of *Zoysia japonica* Steud.^a

2,4-D (mg/L)	BAP (mg/L)	No. of seed tested	No. of seed formed callus (%)
0	0.00	337	0 (0.0)
0	0.02	250	0 (0.0)
0	0.20	233	0 (0.0)
0	2.00	239	0 (0.0)
0	4.00	337	0 (0.0)
1	0.00	304	47 (15.5)
1	0.02	421	65 (15.4)
1	0.20	389	49 (12.6)
1	2.00	360	61 (16.9)
1	4.00	363	39 (15.5)
2	0.00	115	18 (10.7)
2	0.02	334	54 (16.2)
2	0.20	355	65 (18.3)
2	2.00	348	59 (17.0)
2	4.00	250	39 (15.6)
4	0.00	121	19 (15.7)
4	0.02	330	46 (13.9)
4	0.20	344	56 (16.3)
4	2.00	314	35 (11.1)
4	4.00	336	20 (6.0)
8	0.00	341	38 (11.1)
8	0.02	354	35 (9.9)
8	0.20	362	28 (7.7)
8	2.00	296	19 (6.4)
8	4.00	339	14 (4.1)

^aSeeds were plated on MS media containing 4 mg/L thiamine-HCl, 100 mg/L α -ketoglutaric acid, and different combinations of 2,4-D and BAP for 3 months.

Table 4. Effects of different hormonal combinations of 2,4-D and BAP on morphology of callus derived from seeds of *Zoysia japonica* Steud.^a

2,4-D (mg/L)	BAP (mg/L)	No. of callus tested	No. of callus showed various morphology (%) ^b				
			Type I	Type II	Type III	Type I ~ III ^c	Type IV
1	0.00	47	2 (4.3)	0(0.0)	2 (4.3)	4 (8.5)	43 (91.5)
1	0.02	65	6 (9.2)	0(0.0)	0 (0.0)	6 (9.2)	59 (90.8)
1	0.20	49	8 (16.3)	0(0.0)	0 (0.0)	8 (16.3)	41 (83.7)
1	2.00	61	6 (9.8)	0(0.0)	1 (1.6)	7 (11.5)	54 (88.5)
1	4.00	39	4 (10.3)	0(0.0)	0 (0.0)	4 (10.3)	35 (89.7)
2	0.00	18	0 (0.0)	0(0.0)	1 (5.6)	1 (5.6)	17 (94.4)
2	0.02	54	2 (3.7)	0(0.0)	1 (1.9)	3 (5.6)	51 (94.4)
2	0.20	65	8 (12.3)	1 (1.5)	2 (1.5)	11 (16.9)	54 (83.1)
2	2.00	59	5 (8.5)	0(0.0)	4 (6.8)	9 (15.3)	52 (84.7)
2	4.00	39	0 (0.0)	0(0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	39 (100.0)
4	0.00	19	0 (0.0)	0(0.0)	1 (5.3)	1 (5.3)	18 (94.7)
4	0.02	46	0 (0.0)	0(0.0)	1 (2.2)	2 (4.3)	44 (95.7)
4	0.20	56	0 (0.0)	0(0.0)	8 (14.3)	8 (14.3)	48 (85.7)
4	2.00	35	0 (0.0)	0(0.0)	1 (2.9)	1 (2.9)	34 (97.1)
4	4.00	20	0 (0.0)	0(0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	20 (100.0)
8	0.00	38	0 (0.0)	0(0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	38 (100.0)
8	0.02	35	0 (0.0)	0(0.0)	1 (2.9)	1 (2.9)	34 (97.1)
8	0.20	28	0 (0.0)	0(0.0)	1 (3.6)	1 (3.6)	10 (96.4)
8	2.00	19	0 (0.0)	0(0.0)	2 (10.5)	2 (10.5)	17 (89.5)
8	4.00	14	0 (0.0)	0(0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	14 (100.0)

^aSeeds were plated on MS media containing 4 mg/L thiamine-HCl, 100 mg/L α -ketoglutaric acid, and different combinations of 2,4-D and BAP for 3 months.

^bCallus morphology was rated by type I =with yellow, differentiated structure, type II =with white, non-friable and compact, type III =with yellow, friable and compact, type IV =with whitish yellow, friable, soft and watery.

^cType I ~ III represents sum of number of type I to type III.

여 캘러스 형태별로 관찰하였다 (Table 4). 그 유형을 보면 4 가지 Type으로 분류되었는데, 노란색을 띠며 분화가 진전된 조직구조를 보이는 Type I 캘러스 (Figure 1A), 희고 치밀하며 표면이 단단한 Type II 캘러스 (Figure 1B), 노랑고 치밀한 조직이지만 부스러지기 쉬운 Type III 캘러스 (Figure 1C), 부드럽고 물기가 있는 Type IV 캘러스 (Figure 1D)로 분류할 수 있었다. Type I 캘러스는 1 mg/L 2,4-D와 0.2 mg/L BAP가 포함된 배지에서 16.3%로 가장 높은 빈도로 관찰되었으나 2,4-D 2 mg/L와 BAP 4 mg/L 이상 농도의 조합에서는 전혀 관찰되지 않았다. Type II 캘러스는 다른 Type 캘러스에 비해서 매우 적게 유도되었으며, 오직 2 mg/L 2,4-D와 BAP 0.2 mg/L의 조합에서 1.5%만 관찰되었다. Type III 캘러스는 생장조절물질의 대부분 (65%)의 조합처리구에서 관찰되었으며, 2,4-D 2 mg/L와 BAP 0.2 mg/L의 처리구에서 가장 높게 나타났고 그 빈도는 14.3%였다. Type IV 캘러스는 모든 처리구에서 83.1%에서 100%까지 높게 나타났다. 이러한 형태로 분류된 캘러스 중에서 Type I, II, III는 캘러스 간에 차이는 있으나 모두 식물체 재분화 능력을 가지고 있었다. 그러나, Type IV 캘러스는 본 연구의 어떠한 조합의 배지에서도 신초의 재분화가 관찰되지 않았다 (Figure 2). 또한 흥미있는 사실은 Type I, II, III의 캘러스를 각각 분리하여 Type별로 상기의 최적 농도조건에서 계대배양할 경우 빈도의 차이는 있으나 모든 Type의 캘러스에서 4 Type의 캘

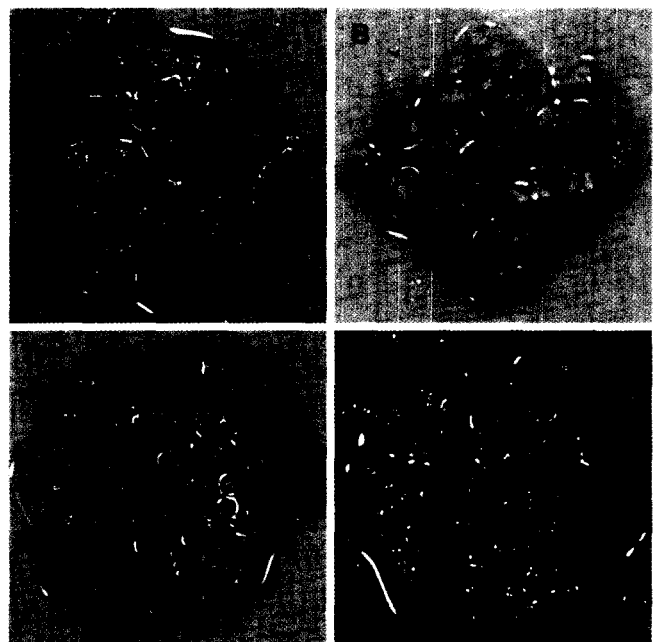


Figure 1. Four morphological types of callus induced from calli of seeds of *Zoysia japonica* Steud. grown on MS media containing various combinations of 2,4-D and BAP for 5 weeks in dark. A, Callus with yellow, differentiated structure (type I) from MS medium containing 1 mg/L 2,4-D and 0.2 mg/L BAP; B, White, non-friable and compact callus (type II) from MS medium containing 2 mg/L 2,4-D and 0.2 mg/L BAP; C, Yellow, friable and compact callus (type III) from MS medium containing 4 mg/L 2,4-D and 0.2 mg/L BAP; D, Whitish yellow, friable, soft and watery callus (type IV) from MS medium containing 1 mg/L 2,4-D and 0.2 mg/L BAP.

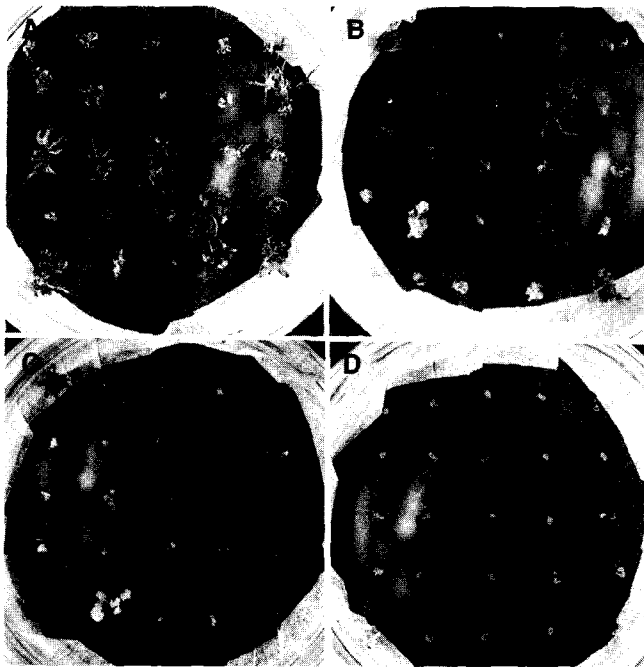


Figure 2. Shoot formation by callus type in *Zoysia japonica* Steud. Calli were transferred to MS medium containing 1 mg/L BAP and 30 g/L maltose for 2 weeks in light. A, Shoots from callus type I; B, Shoots from callus type II; C, Shoots from callus type III; D, Shoot from callus type IV.

러스가 모두 관찰되었다. 그러나, Type IV 켈러스는 상기의 어떠한 혼용 농도조건의 배지에 배양하여도 Type IV의 켈러스만 증식되고 그 외 어떤 Type의 켈러스도 관찰되지 않았다 (결과 미제시). 이와같이 성장조절제의 종류 및 농도에 따라서 켈러스의 유형이 다르게 나타나고, 그 유형에 따라서 신초재분화에 영향을 미치는 결과가 Kentucky bluegrass (Ke and Lee 1996)와 옥수수 (Carvalho et al. 1997)에서도 보고되었다. 따라서 종자 또는 기타 조직으로부터 켈러스를 유도한 후 식물체를 재분화시킬 경우 켈러스를 형태별로 분리하여 이용한다면 식물체의 재분화에 있어 보다 효율적인 연구 결과가 기대된다.

식물체 재분화에 미치는 당류의 영향

5종류의 당류에 따른 식물체 재분화 효율을 검토한 결과, 신초를 형성한 켈러스의 빈도는 기존에 주로 사용된 sucrose 포함배지에서 가장 높았으나 켈러스 당 신초수는 maltose 및 glucose 첨가배지에서 훨씬 높은 빈도로 분화되었다. 특히 maltose가 첨가된 배지에서는 정상적으로 신장하는 2 mm 이상의 신초가 sucrose 배지에 비해 10배 이상 많았다 (Table 5). 그러나, galactose가 첨가된 배지에서는 신초의 재분화가 관찰되지 않고 배양기간이 경과함에 따라서 켈러스가 갈변 고사하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 당류의 종류에 따라서 켈러스로부터 식물체의 재분화 과정에서 이용하기 쉬운 형태의 당류가 있는 것으로 생각된다.

켈러스로부터 신초형성이 가장 높은 maltose를 농도별로 처리하여 신초의 재분화 빈도를 조사한 결과, 30 g/L 이하 저농도의 maltose를 포함한 배지에서 신초를 형성한 켈러스의 수와 켈러스당 신초의 재분화율이 비교적 높았다. 또한 2 mm 이상의 정상적인 신초의 재분화는 maltose 30 g/L의 배지에서 약 51%로 가장 높았다 (Table 6). 이와 같이 maltose가 일반적으로 사용하는 sucrose에 비해서 켈러스로부터 식물체의 재분화를 촉진하는 것은 화분과인 벼 (Ghosh Biswas and Zapata 1993), 밀 (Last and Brettell 1990), creeping bentgrass (Asano et al. 1994)에서도 보고되었다. 그 외 6.0%의 고농도 maltose가 포함된 배지에서 분화된 신초는 줄기와 잎의 가장자리에 안토시아닌계의 적색이 나타나는 특징을 보여주었다. 이것은 딸기 배양세포의 경우 고농도의 당류가 식물체의 재분화 과정에 조직세포에 물리적 스트레스를 주어서 그것에 대한 반응기작으로 나타나는 현상으로 보고 있다 (Sato et al. 1996).

식물체 재분화에 미치는 cytokinin류의 영향

Cytokinin의 종류 및 농도에 따른 신초 재분화의 빈도를 조사한 결과, 1 mg/L의 BAP와 TDZ가 각각 포함된 배지에서 신초를 형성한 켈러스의 수, 켈러스 당 신초의 수 및 신초의 신장 (5 mm 이상)이 가장 좋았다 (Table 7). 그러나, TDZ

Table 5. Effects of carbohydrates on shoot formation of callus derived from seeds of *Zoysia japonica* Steud.^a

Carbohydrates (30g/L)	Callus with green shoot (%)	No. of shoots per callus	Shoot over 2 mm (%)
Glucose	37.3±2.7 ^b	6.9±0.3 ^c	39.8±7.3
Maltose	33.3±2.7	9.4±0.3	46.4±5.0
Sucrose	45.3±9.3	4.5±0.1	4.5±0.2
Fructose	17.3±2.7	4.4±0.8	12.6±3.0
Galactose	0	0	0

^aType I calli were cultured on MS medium containing 1 mg/L TDZ for 2 weeks.

^bEach value represents a mean and the S. E. from independent experiments with 25 calli per experiments.

^cEach value represents a mean and the S. E. from number of shoot per 10 calli with highest number of shoots.

Table 6. Effects of maltose concentration on shoot formation of callus derived from seeds of *Zoysia japonica* Steud.^a

Maltose (g/L)	Callus with green shoot (%)	No. of shoots per callus	Shoot over 2 mm (%)
15	37.3	9.9±0.1	45.2±3.4
30	36.0	12.9±1.2	51.4±3.9
45	32.0	10.2±1.3	32.1±3.6
60	29.3	4.9±0.6	14.5±5.5
75	30.7	8.3±0.9	27.3±4.0
90	28.0	2.5±0.3	6.7±0.2

^aType I calli were cultured on MS medium containing 1 mg/L TDZ and various level of maltose for 2 weeks.

Table 7. Effects of cytokinins on shoot induction of callus derived from seeds of *Zoysia japonica* Steud.^a

	Growth regulators (mg/L)	No. of callus tested	No. of callus with shoot	No. of shoot /callus	No. of shoot over 5 mm
Control	0	44	6	4.0	0
Kinetin	1	44	8	3.0	0
	4	44	7	1.7	0
BAP	1	44	17	5.2	19
	4	44	9	3.7	1
TDZ	1	44	17	4.8	14
	4	44	10	4.1	1

^aType I calli were cultured on MS medium containing 30 g/L maltose and various level of cytokinins for 2 weeks.

첨가 배지의 경우 캘러스로부터 신초의 재분화는 관찰되나 식물체의 신장은 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 cytokinin 종류에 따라서 신초의 재분화에 영향을 미치는 것을 보여준 것으로 특히 정상적인 신초를 얻기 위해서는 저농도의 BAP와 TDZ가 필요함을 보여준다. 본 연구에서 TDZ는 신초의 재분화에 효과적인 성장조절제이지만 고농도의 처리구에서는 기형적인 신초의 분화가 많이 관찰되고 동시에 장기간 배양할 경우 신초의 신장을 억제하는 경우가 있었다. 이와 유사한 연구결과는 땅콩 (Akasaka et al. 2000)에서도 보고되었다. 그러므로 TDZ는 캘러스로부터 초기의 식물체 재분화 과정에만 사용하고 그 후에는 제거하는 것이 바람직하다고 본다.

캘러스 유형에 따른 식물체 재분화

4가지 Type의 캘러스를 재분화 배지에 치상하여 식물체 재분화 빈도를 조사하였다. 그 결과, Type IV 캘러스는 식물체의 재분화가 전혀 관찰되지 않았으며, 배양 10일 후에 캘러스가 갈변하기 시작하였다 (Figure 2D). 그러나, Type I, II, III 캘러스는 식물체의 재분화가 관찰되었으며 (Figure 2A, B, C), 특히 Type I 캘러스는 82%의 식물체 분화를 보였으며, 알비노 식물체의 분화도 가장 낮게 관찰되었다 (Table 8). 상기의 배지에서 유도된 신초는 성장조절제가 첨가되지 않는 MS 배지에 이식하여 뿌리를 유도하였고 pot에 심어 정상 식물체로 육성하였다 (Figure 3). 또한 Type I, II, III 캘러스는 종자 유도로부터 1년 이상 계대배양되고 있으나 식물체의 재

Table 8. Effects of callus type of *Zoysia japonica* Steud. on shoot induction of callus derived from seeds.^a

Callus type	Callus with green shoots (%)	Callus with albino shoots (%)
Type I	82	4
Type II	62	26
Type III	38	22
Type IV	0	0

^aTwenty five calli per each callus type were cultured on MS medium containing 1 mg/L BAP and 30 g/L maltose for 2 weeks.

**Figure 3.** Plants of *Zoysia japonica* Steud. established in soil and grown for 3 months.

분화 능력은 감소되지 않고 있다. 지금까지 화분과 식물을 캘러스로부터 재분화시킬 경우 알비노 식물체의 분화가 많이 관찰되는 경향이 있었다. 특히 장기간 계대배양된 캘러스의 경우 알비노 출현빈도는 더욱 증가된다. 따라서 알비노 식물체의 분화를 억제하기 위하여 배지의 종류, 성장조절제 및 무기이온 등이 검토되어 왔다 (Cho et al. 1998). 이에 비하여 본 연구에서는 캘러스의 형태적 분류를 통해서 알비노 식물체의 분화를 억제할 수 있다는 것을 제시하였으며, 이러한 결과는 Kentucky bluegrass (Ke and Lee 1996)와 옥수수 (Carvalho et al. 1997)에서도 보고되었다.

이상과 같이 본 연구에서 확립한 들잔디의 조직배양계는 캘러스의 형태에 따라서 고빈도의 식물체 재분화를 유도한 것이 특징이며, 알비노의 출현율도 감소시킬 수 있기 때문에 들잔디의 기내배양을 통한 캘러스의 분화능을 형태학적으로 연구하는 데 많은 도움이 될 것이다. 또한 유용유전자를 분자생물학적 방법을 통해 들잔디에 도입할 경우에도 본 연구에서 개발된 조직배양계가 많은 참고가 되리라 기대된다.

적 요

들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)의 성숙종자 유래의 캘러스를 사용하여 캘러스 성장 및 재분화에 적합한 몇 가지 조건과 캘러스 유형에 따른 재분화 효율을 검토하였다. 종자로부터 캘러스 유도는 2 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L BAP, 4 mg/L thiamine-HCl, 100 mg/L α -ketoglutaric acid를 포함한 MS 배지에서 가장 좋았다. 캘러스 증식은 0.5 mg/L 2,4-D, 0.05 mg/L BAP, 4 mg/L thiamine-HCl, 100 mg/L α -ketoglutaric acid를 포함한 MS 배지가 가장 좋았다. 식물체의 재분화는 3% maltose, 1 mg/L BAP 또는 1 mg/L TDZ를 포함한 MS 배지에서 좋았다. 캘러스의 Type과 빈도는 2,4-D와 BAP 조

합과 농도에 따라 크게 영향을 받았고, 형태적으로 4가지 Type이 뚜렷하게 나타났다. Type I, II, III 캘러스는 계대배양으로 신초가 형성된 반면, 물기가 많은 캘러스인 Type IV에서는 뿌리만이 분화되었다. 이 중 Type I 캘러스는 신초의 재분화율이 82%로 가장 높고 albino체의 출현빈도가 4%로 가장 낮았다. 이와같이 캘러스를 유형별로 구분하여 배양함으로써 잔디 캘러스로부터 식물체의 재분화를 높일 수 있었다.

사사 - 본 연구는 제주대학교 RRC (2000년도) 연구비 지원에 의해 수행된 결과임.

인용문헌

- Akasaka Y, Daimon H, Mii M (2000) Improved plant regeneration from cultured leaf segments in peanut (*Arachis hypogaea* L.) by limited exposure to thidiazuron. *Plant Sci* **156**:169-175
- Al-Khayri JM, Huang FH, Thompson LF, King JW (1989) Plant regeneration of zoysiagrass from embryo-derived callus. *Crop Sci* **29**:1324-1325
- Asano Y, Ito Y, Ohara M, Sugiura K, Fujie A (1994) Improved regeneration response of creeping bentgrass and japonica rice by maltose and lactose. *Plant Cell Tiss Org Cult* **39**:101-103
- Asano Y, Katsumoto H, Inokuma C, Kaneko S, Ito Y, Fujie A (1996) Cytokinin and thiamine requirements and stimulative effects of riboflavin and α -ketoglutaric acid on embryogenic callus induction from the seeds of *Zoysia japonica* Steud. *J Plant Physiol* **149**:413-417
- Carvalho CHS, Bohorova N, Bordallo PN, Abreu LL, Valicente FH, Bressan W, Paiva E (1997) Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. *Plant Cell Rep* **17**:73-76
- Chai B, Sticklen MB (1998) Applications of biotechnology in turfgrass genetic improvement. *Crop Sci* **38**:1320-1338
- Cho M-J, Jiang W, Lemaux PG (1998) Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. *Plant Sci* **138**:229-244
- Chu C, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin C, Chu CY, Bi FY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sin (Peking)* **18**:659-668
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50**:151-158
- Ghosh Biswas GC, Zapata FJ (1993) High-frequency plant regeneration from protoplasts of indica rice (*Oryza sativa* L.) using maltose. *J Plant Physiol* **141**:470-475
- Han SS, Rim YS, Jeong JH (1996) Effect of growth regulators, carbon sources and silver nitrate on callus formation and callus formation of turfgrass. *Kor J Weed Sci* **16**:221-229
- Hansen G, Wright MS (1999) Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci* **4**:226-231
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (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
- Inokuma C, Sugiura K, Cho C, Okawara R, Kaneko S (1996) Plant regeneration from protoplasts of Japanese lawngress. *Plant Cell Rep* **15**:737-741
- Ke S, Lee CW (1996) Plant Regeneration in Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) *Plant Cell Rep* **15**:882-887
- Last DI, Brettell RIS (1990) Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant Cell Rep* **9**:14-16
- Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **18**:100-127
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Noh HY, Choi JS, Ahn BJ (1995) Plant regeneration through somatic embryogenesis in zoysiagrass (*Zoysia* spp.). *J Kor Soc Hort Sci* **36**:582-587
- Ohira K, Ojima K, Fujiwara A (1973) Studies on the nutrition of rice culture. ¥ . A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant Cell Physiol* **14**:1113-1121
- Park GH, Ahn BJ (1998) Electroporation conditions for DNA transfer into somatic embryogenic cells of *Zoysia japonica*. *Kor J Plant Tiss Cult* **25**:13-19
- Sato K, Nakayama M, Shhigeta J (1996) Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry. *Plant Sci* **113**:91-98
- Yoo YK, Kim KS (1991) Effects of plant growth regulators on callus formation and organogenesis from the shoot-tip cultures of five turfgrass species. *J Kor Soc Hort Sci* **32**:237-246