

조직배양을 이용한 Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.)의 식물체 재분화 및 형질전환 조건의 검토

草野 美樹, 遠山 絃一, 배창휴¹, 류기중, 이효연*
제주대학교 농업생명과학대학, ¹순천대학교 농업생명과학대학

Plant Regeneration and Transformation of Kentucky Bluegrass (*Poa pratensis* L.) via the Plant Tissue Culture

Miki Kusano, Koichi Tohyama, Chang-Hyu Bae¹, Key-Zyung Riu, Hyo-Yeon Lee*

College of Agricultural and Life Science, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

¹College of Agricultural and Life Science, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

ABSTRACT In this study, plant regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L. steud.) were evaluated. Three different types of calli were produced depending on the combinations of growth regulators. They were non-friable brown or gray-colored callus (type I), compact, friable and yellow or white-colored callus (type II), and soft, watery translucent callus with differentiated structure (type III). The highest regenerable organogenic callus (type II) was obtained on the medium containing 1 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L BA. Additionally, the production of type II calli increased significantly when AgNO₃ was added to the callus induction and growth medium. The highest frequency of multiple shoot formation from type II callus was obtained on MS medium containing 1 mg/L BA and 1 mg/L Thidiazuron (TDZ). The organogenic calli (type II) were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101 harboring the binary vector pLG121Hm with β -glucuronidase gene, and various factors were found to influence the transfer-DNA delivery efficiency. The highest transient GUS activity was observed on type II callus. In the present work, we reported the first transient GUS activity of Kentucky bluegrass mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Our system may contribute to genetic improvement for breed-recalcitrant grass species, Kentucky bluegrass.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, callus type, kentucky bluegrass, regeneration

서 론

잔디는 화본과의 다년생 초본으로서 재배 적온에 따라 한지형 잔디와 난지형 잔디로 구분된다. Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.)는 대표적인 한지형 잔디로 국내에서는 왕포아풀 또는 왕꾸러미풀로서 알려져 있다. 특히 근경의 발달이 매우 좋아서 손상을 받아도 회복이 빠르기 때문에 골프장, 축구장

등에서 많이 이용되고 있으며 또한 내한성이 매우 강해서 겨울철에도 녹색을 유지하는 특성을 가지고 있다. 국내의 경우 world cup 경기에 사용된 축구장의 잔디가 Kentucky bluegrass 로 알려지면서 일반인에게도 점차 친숙해지고 재배면적도 증가하는 추세를 보여주고 있다. 그러나 한지형 잔디인 Kentucky bluegrass는 하절기의 고온 다습 조건에서 생육이 나빠고, 병해충의 발생이 급격하게 증가하기 때문에 농약의 소비가 많아지고 유지 관리비가 많이 필요로 하는 단점이 있다. 따라서 Kentucky bluegrass 이러한 문제점을 개선하기 위해서는 고온 다습에 적합한 품종을 개발하는 것이 중요하다.

*Corresponding author Tel 016-754-3344 Fax 064-754-3340
E-mail hyoyeon@cheju.ac.kr

지금까지 잔디의 품종개발은 교배 등의 고전적 육종방법이 주로 이용되어 왔으나 Kentucky bluegrass는 단위생식을 하기 때문에 종래의 육종방법을 이용하여 신품종을 개발하는 것은 현실적으로 어려움이 많이 있다. 그러므로 이러한 문제를 해결하기 위해서는 조직배양기술을 이용한 외부 유전자 도입이 최선의 방법이라 생각된다. 특히 형질전환에 의한 품종개발은 목적하는 형질의 유전자를 직접 도입하기 때문에 시간의 단축뿐만 아니라 새로운 품종을 만드는 데도 매우 효과적이라 생각된다.

지금까지 외부 유전자 도입에 의한 잔디의 형질전환은 Italian rye grass (Dalton 1988), orchard grass (Horn et al. 1988), tall fescue (Ha et al. 1992), red top (Asano and Ugaki 1994), creeping bentgrass (Zhong et al. 1993; Hartman et al. 1994), dallis grass (Akashi and Adachi, 1992), 들잔디 (Bae et al. 2001) 등에서 보고되었다. 그러나 Kentucky bluegrass의 품종에서는 현재까지 형질전환에 관련된 결과가 보고되고 있지 않다. 그 이유는 Kentucky bluegrass 품종에 대한 조직배양계가 확립되어 있지 않기 때문으로 생각된다. 특히 다른 잔디에 비해서 Kentucky bluegrass 품종에 대한 조직배양계의 미확립은 식물재료의 특성상 다른 잔디에 비해 조직배양을 통한 식물체 재분화가 어려운 것이 하나의 원인이다. Kentucky bluegrass에서 캘러스 유도에 사용하는 조직으로는 완속종자, 자엽초, 줄기 등이 이용되고 있다 (McDonnell and Conger 1984; Valk and Zaal 1988; Valk et al. 1989; Ke and Lee 1996). 그러나 대부분의 잔디의 경우 벼 (Kumria and Rajam 2002; Wang et al. 2002; Seo et al. 2002) 등의 완속 종자와는 다르게 실험재료로 이용할 경우 식물체 재분화 능력이 있는 캘러스의 유도가 매우 낮기 때문에 실제로 형질전환 연구에 이용하기는 어려운 부분이 많이 있다. 그러므로 본 연구는 Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) 성숙종자의 캘러스를 이용하여 조직배양을 통한 식물재분화계를 확립하고, 동시에 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환법을 사용하여 Kentucky bluegrass에 대한 외래 유전자의 도입 가능성을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 캘러스 유도

본 연구에 사용된 잔디는 Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.)의 Nubluce origin 품종이다. 종자의 종피를 제거한 후 10 μ L tween 20이 첨가된 sodium hypochloride (5% active chloride) 용액에서 15분 동안 표면을 살균하였다. 살균된 종자는 멸균수로 3회 세척한 후 4°C에서 7일간 저온 처리하였다. 그 후 GA₃ 10 mg/L 침적한 여과지 위에서 종자를 발아시키고 발아된 개체만을 2,4-D 1 mg/L 포함한 MS배지 (30 g/L sucrose, 2 g/L gelrite, pH 5.8)에 치상한 후 25°C, 암 조건 하에서 50일 동안

배양하였다.

생장조절물질에 따른 재분화성 캘러스 유도 및 외형적 분류

상기의 MS 배지에서 유도 및 증식시킨 캘러스를 2 mm 크기로 절단하여 2,4-D (0, 1, 2, 4, 8 mg/L) 및 BA (0, 0.01, 0.1, 1, 2 mg/L) 혼합 배지에 처리구 당 30개씩 치상하였다. 배양은 25°C, 암조건하에서 4주간 행하였다. 그 후 캘러스 중량, 형태, 견고도를 기준으로 세 가지 type으로 캘러스를 분류하였다. 각 캘러스 type의 중량은 백분율로 나타내었다 (각 캘러스 type 중량/캘러스 총 중량×100).

AgNO₃ 첨가에 의해 유도된 캘러스의 식물체 재분화 효과

발아시킨 종자를 여러 농도의 AgNO₃ (0, 5, 10, 30 mg/L)가 첨가된 MS 캘러스 유도배지 (2,4-D 1 mg/L, 30 g/L sucrose, 2 g/L gelrite, pH 5.8)에 치상한 후 25°C, 암조건에서 50일간 배양하여 캘러스를 유도 증식하였다. 각각의 캘러스는 MS재분화배지 (BA 1 mg/L, TDZ 1 mg/L, 30 g/L sucrose, 2 g/L gelrite, pH 5.8)에 치상하고 25°C, 연속광 조건 (30 μ mol \cdot m² \cdot s⁻¹)에서 50일간 배양한 후 shoot 형성률을 측정하였다.

BA 및 Thidiazuron(TDZ)의 혼합처리구가 식물 재분화에 미치는 영향

캘러스를 MS배지 (2,4-D 1 mg/L, BA 0.1 mg/L, AgNO₃ 5 mg/L, gelrite 2 g/L)에서 3개월간 증식시키고 본 실험에 사용하였다. 증식된 캘러스를 5 mm로 절단한 후 BA (0, 0.5, 1, 2, 4 mg/L)와 TDZ (0, 1 mg/L)를 조합한 배지에 각 처리구당 32개씩 치상하였다. 그 후 25°C, 연속광 조건 (30 μ mol \cdot m² \cdot s⁻¹)에서 50일간 배양하고 shoot의 형성률을 측정하였다.

캘러스 type에 의한 식물체 재분화 검토

암조건에서 계대배양된 3 type의 캘러스를 5 mm씩 절단한 후 MS 재분화배지 (BA 1 mg/L, TDZ 1 mg/L, 30 g/L sucrose, 2 g/L gelrite, pH 5.8)에 각각 36개씩 치상한 후 50일간 배양하고 shoot 형성률을 측정하였다. 배양은 25°C, 연속광 조건 (30 μ mol \cdot m² \cdot s⁻¹)에서 행하였다.

Agrobacterium tumefaciens 배양 및 캘러스의 형질전환

형질전환에 사용된 vector는 binary vector인 pIG121Hm (Figure 4)로서 T-DNA 내부에 carry intron을 포함한 GUS, Km^R (kanamycin 내성), 및 HPT (hygromycin phosphotransferase) 유전자를 포함하고 있다 (Hiei et al. 1994). pIG121Hm가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101은 hygromycin

(50 mg/L)과 kanamycin (100 mg/L)의 2종류 항생제가 포함된 LB 액체배지에서 배양을 한 후 이용하였다.

3 type의 캘러스는 상기의 pIG121Hm 유전자가 포함된 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 균 현탁액에 5분간 침적시킨 후 공동배양배지 (MS salt vitamin, 30 g/L sucrose, 1 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BA, 100 mg/L acetosyringone, 100 mg/L betaine, 2 g/L gelrite, pH 5.2) 위에서 25°C, 6일간 암배양하였다. 공동배양이 끝난 캘러스는 500 mg/L carbenicillin 첨가된 멸균수에서 3회 세척하고 250 mg/L의 carbenicillin 포함된 캘러스 증식배지에 25°C, 7일간, 연속광 조건에서 배양하였다. 배양된 캘러스로부터 GUS 유전자의 발현분석은 Jefferson 등 (1987)의 방법에 따라 조사되었다.

결과 및 고찰

캘러스 유도효율

완숙종자를 이용해서 캘러스를 유도할 경우 벼, 보리 등의 화분과 식물은 대부분의 종자에서 쉽게 캘러스를 유도할 수 있다. 그러나 Kentucky bluegrass와 같은 잔디의 경우 종자의 발아율이 대단히 낮기 때문에 효율적으로 캘러스를 유도할 수 없다. 본 연구에서는 종피를 제거한 멸균종자에 저온 및 GA처리를 두 단계로 나누어 처리하였다. 그 결과 종자의 발아율이 약 30% 높아졌으며, 발아된 종자만을 이용하여 캘러스를 유도한 결과 100%의 종자부터 캘러스가 유도되었다 (결과 미제시). 이러한 방법의 캘러스 유도는 종자의 발아율이 좋지 않은 잔디 및 기타 화분과 식물의 완숙종자로부터 높은 효율로 캘러스를 유도할 수 있다.

생장조절물질에 따른 재분화성 캘러스 유도 및 외형적 분류

종자로부터 유도된 캘러스를 증식시킨 후 여러 농도의 2,4-D 및 BA가 포함된 MS 배지에 치상하였다. 그 결과 사 처리구에서 증식된 캘러스로부터 외형적으로 3가지 형태가 혼재되어 있다는 것을 관찰하였다 (Figure 1). 본 연구에서는 3가지 형태를 다음과 같이 분류하였다. 먼저 type I은 갈색 또는 회색으로 치밀하며 표면이 단단한 캘러스이고, type II는 회색 및 노란색으로 치밀하고 부스러지기 쉬운 캘러스이며, type III는 부드럽고 물기 및 당 분비가 많고 초기단계의 분화가 관찰되는 캘러스이다. 캘러스 증식은 2,4-D 1 mg/L, BA 0.1 mg/L 포함된 처리구에서 가장 좋았으며, 캘러스의 중량도 129.5 mg으로 가장 무거웠다 (Table 1). type I의 캘러스가 가장 많이 증식된 처리구는 2,4-D 1 mg/L, BA 2 mg/L 이었고, type II가 많이 관찰된 배지는 2,4-D 1 mg/L, BA 0.1 mg/L 이었다. 특히 type II 캘러스는 2,4-D와 BA가 혼합된 처리구에서 많이 관찰되는 경향을 보여주었다. type III는 2,4-D 8 mg/L,

BA 0 mg/L의 처리구에서 증식된 캘러스로 이러한 캘러스의 89.9%가 type III로 판명되었다. 또한 type III는 BA 무첨가 배지에서 많이 증식되는 경향을 보여주었다. 이상의 결과 Kentucky bluegrass 종자 유래 캘러스가 증식되는 과정에서 외형적으로 다양하게 관찰되는 원인에 대해서는 불분명하지만 식물체의 각 기관으로 발전할 때 유래의 각각의 세포가 캘러스 증식에 의해 세포분열 과정을 거치면서 서로 다른 형태의 캘러스로 발전한다고 생각된다. 또한 서로 다른 종류의 생장조절물질 첨가가 상기의 서로 다른 형태의 캘러스 분열 증식에 어떠한 영향을 미친다고 생각된다. 그 외 동일한 조건의 배지에서 특정한 type의 캘러스만 증식되지 않고 여러 type의 캘러스가 혼재되어 증식하는 것은 치상된 캘러스 자체에 여러 형태의 세포가 혼재되어 있다고 생각되며, 또한 동일한 type의 캘러스를 배양한 경우에도 세포분열을 통해서 증식되는 과정에 변이가 발생할 수도 있다고 생각된다. 이와

Table 1. Change in the growth characteristics of calli induced from Kentucky bluegrass (cv. Nubluce origin) as affected by growth regulator combination^a

(mg/L)		Total callus fresh weight (mg)	Mixture ratio (%)		
2,4-D	BA		Type I ^b	Type II	Type III
1	0	91.2±16.5 ^c	8.8	18.9	72.4
1	0.01	47.4±11.9	27.2	33.5	39.5
1	0.1	129.5±33.9	17.8	50.9	31.3
1	1.0	113.3±35.2	22.0	42.2	35.8
1	2.0	43.0±10.0	44.7	3.7	51.6
2	0	68.5±16.6	29.6	0.0	70.5
2	0.01	62.6±18.5	29.9	0.0	70.4
2	0.1	49.2±15.7	26.2	29.1	44.7
2	1.0	73.6±17.3	25.0	8.4	66.6
2	2.0	61.8±12.7	2.1	14.2	83.7
4	0	75.2±26.5	23.3	10.6	66.1
4	0.01	47.3±13.9	18.8	3.0	78.2
4	0.1	41.8±9.4	19.4	8.1	72.5
4	1.0	63.3±14.9	44.9	14.1	41.0
4	2.0	75.9±24.8	54.4	12.9	32.7
8	0	28.6±7.3	4.9	5.2	89.9
8	0.01	27.4±10.7	17.6	22.7	59.7
8	0.1	59.8±7.9	22.9	26.4	51.0
8	1.0	68.9±11.1	25.0	19.9	55.3
8	2.0	50.1±7.9	23.6	30.5	45.9

^aCallus (5 mm size × 9 per 1 petri dish) from one-cell line was put on MS medium (30 g/L sucrose, 2g/L gel rite, pH 5.8) with various combinations of 2,4-D and BA for 4 week in dark at 25°C.

^bCallus morphology was rated by; Type I=compact, non-friable and brown or gray-colored; Type II=compact friable and yellow-colored; Type III=soft, watery and translucent and differentiated structure.

^cStandard error.

유사한 연구 결과가 보리 (Bregitzer 1992), 들잔디 (Bae et al. 2001)에서도 보고되었다.

AgNO₃가 캘러스증식 및 식물체재분화에 미치는 영향

AgNO₃가 캘러스로부터 식물체재분화에 미치는 영향을 조사한 결과 AgNO₃ 5 mg/L 첨가배지에서 가장 높은 30%의 shoot유도율을 보여주었다 (Table 2). 그리고 캘러스 당 shoot의 분화수는 AgNO₃ 10 mg/L에서 약 4개로 가장 좋았다. 그러나 AgNO₃ 첨가되지 않거나 30 mg/L의 고농도 처리구에서는 오히려 감소하는 경향을 보였다. 캘러스 유도 및 증식과정의 배지에 AgNO₃를 적당량 첨가할 경우 증식되는 캘러스로부터 type II 형태의 캘러스가 많이 관찰되었다. 결과적으로 이

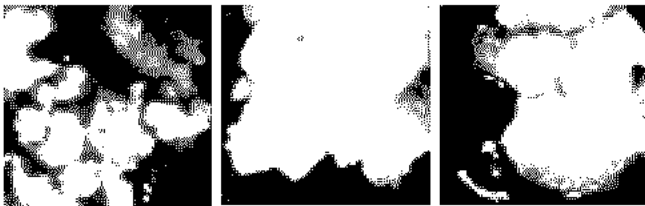


Figure 1. Three morphological types of callus induced from calli of seeds of Kentucky bluegrass grown on MS media containing various combinations of 2,4-D and BAP for 4 weeks in dark. A: Type I (Non friable brown or gray-colored) on MS medium containing 4 mg/L 2,4-D and 2 mg/L BAP. B: Type II (Compact friable and yellow-colored) on MS medium containing 1 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L BAP. C: Type III (Soft and watery translucent callus with differentiated structure) on MS medium containing 2 mg/L 2,4-D and 2 mg/L BAP.



Figure 2. Effect of TDZ and BA on shoot regeneration of Kentucky bluegrass. A: Small and normal shoot on MS medium containing BA 1 mg/L. B: Big and abnormal shoot on MS medium containing TDZ 1 mg/L. C: Big and normal shoot on MS medium containing TDZ 1mg/L and BA 1 mg/L.

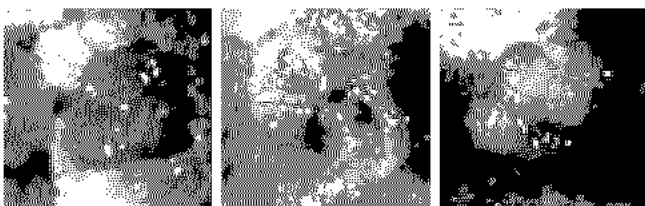


Figure 3. Transient GUS expression of 3 callus types of Kentucky bluegrass. A: Type I, B: Type II, C: Type III. Each callus was infected with EHA101 (pIG121Hm) and co-cultivated at 25°C under dark condition for 6 days. After 7 days GUS expression was evaluated.

러한 형태의 캘러스가 많이 증식된다는 것은 식물체 재분화에 유리한 캘러스가 다수 증식되고 있다는 것을 보여준 것이다.

BA 및 TDZ의 혼합처리구가 식물체 재분화에 미치는 영향

TDZ 및 BA가 식물재분화에 미치는 영향을 검토한 결과 식물체 재분화는 BA 0.5 mg/L와 TDZ 1 mg/L의 처리구 및 BA 1 mg/L, BA 2 mg/L의 단독 처리구에서 가장 많이 관찰되었다 (Table 3). BA 단독 처리구에서 유도된 shoot는 외관상 정상적으로 분화하나 shoot의 생장이 늦은 것이 단점이고 (Figure 2A), TDZ 단독 처리구의 경우는 식물체 재분화 과정에서 외관상 기형을 보인 shoot가 다수 발생하였다 (Figure 2B). 지금까지 TDZ는 cytokinin과 유사한 역할을 하는 물질

Table 2. Effect of AgNO₃ on callus growth and shoot regeneration^a

AgNO ₃ (mg/L)	No. of callus tested	No. of calli with shoots (%) ^b	No. of shoot per callus ^c
0	40	5 (13)	1.740.83 ^d
5	40	12 (30)	3.311.10
10	40	7 (18)	4.061.46
30	40	4 (10)	2.891.77

^aCalli were induced on MS medium (1 mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, 2 g/L gelrite, pH 5.8) with different concentration of AgNO₃, and put on the same medium after 50 days and cultured in dark at 25°C. After 30 days the calli were transferred to MS shoot induction media (1 mg/L BA, 1 mg/L TDZ, 30 g/L sucrose, 2 g/L gelrite, pH 5.8) and cultured under continuous light at 25°C for 50 days.

^bShoots induction efficiency= No. of calli with shoots / No. of calli tested × 100.

^cDate were gained from calli with shoots.

^dStandard error.

Table 3. Effect of different combination of TDZ and BA on shoot induction from calli of Kentucky bluegrass^a

BA (mg/L)	TDZ (mg/L)	No. of calli tested	No. of calli with shoots	Shoots induction efficiency ^b (%)	No. of shoots per callus with shoots ^c
0	0	32	5	15.6	2.20.97 ^d
0	1	32	6	18.8	1.70.33
0.5	0	32	11	34.4	2.30.73
0.5	1	32	12	37.5	2.20.46
1	0	32	12	37.5	1.60.26
1	1	32	11	34.3	2.30.52
2	0	32	12	37.5	1.90.40
2	1	32	10	31.3	2.20.60
4	0	32	9	28.1	2.10.65
4	1	32	8	25.0	1.40.26

^aTwo cell line calli were transferred to MS medium (30 g/L sucrose, 2 g/L gelrite, pH 5.8) contain of various combinations BA and TDZ (Thidiazuron).

^bShoots induction efficiency= No. of calli with shoots / No. of calli tested × 100.

^cDates were sampled from calli with shoots.

^dStandard error.

로 알려져 있으며 들잔디 (Griffin and Dibble 1995; Bae et al. 2001), 난 (Nayak and Rath 1997) 등에서 식물체재분화에 매우 유용하다고 보고하였다. 그러나 땅콩 및 벼 등에서는 TDZ를 첨가하면 재분화된 식물체로부터 상당수의 식물이 기형을 보인다고 보고하였다 (Akasaka et al. 2000; Seo et al. 2002). 본 실험에서도 TDZ는 shoot의 생장을 촉진시켰지만 반대로 기형적인 shoot의 발생도 많이 관찰되었다. 그러나 BA와 혼합하여 첨가한 경우에는 정상적인 shoot가 발생하고 동시에 생장도 빠른 경향을 보여주었다 (Figure 2C). 따라서 본 연구는 shoot수가 많고 정상적으로 식물체를 분화시키는 BA 1 mg/L 및 TDZ 1 mg/L의 처리구가 가장 효율적이라 판단된다.

캘러스 type에 의한 식물체재분화의 검토

Kentucky bluegrass의 type I, type II, type III 캘러스의 식물체 재분화 능력을 검토한 결과 (Table 4) 식물체 재분화가 가장 좋은 것은 type II로서 shoot의 분화율이 55.6%이었다. 또한 type III 캘러스의 경우 식물체 재분화는 16.7%를 보여주었다. 그러나 갈색 또는 회색으로 치밀하고 표면이 단단한 type I 캘러스는 식물체 재분화가 전혀 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 동일 종자에서 캘러스가 증식되어도 캘러스의 형태에 따라서 분화율이 차이를 보이는 것으로 판단된다. 따라서 이러한 방법으로 캘러스를 선발 증식하게 되면 캘러스로부터 식물체 재분화와 관련된 연구를 보다 효율적으로 진행할 수 있으리라 기대된다.

캘러스 type에 따른 GUS 유전자의 발현

pIG121Hm 유전자가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101을 Kentucky bluegrass의 3가지 type의 캘러스에 형질전환한 결과 type I에서는 청색으로 염색된 spots를 전혀 관찰할 수 없었다 (Figure 4A). 그러나 type II 및 III 캘러스에서는 청색으로 염색된 spots를 관찰할 수 있었다 (Figure 4B, C). 특히 type II캘러스에서는 캘러스 100 mg당 가장 많은 약 103

개의 청색 spot이 관찰되었다 (Table 5). 이와 같이 캘러스 type에 따라 유전자 도입 효율에 차이를 보이는 것은 대단히 흥미로운 연구 결과이다. 이러한 현상에 대해서는 불분명하지만 한가지의 가능성은 캘러스의 세포벽과 *Agrobacterium* 감염과의 친화력에 원인이 있다고 생각되나 현재로서는 구체적인 증거를 제시할 수는 없다.

이상의 연구결과를 종합해보면 Kentucky bluegrass의 경우 종자유래의 캘러스 유도부터 식물체 재분화 및 순화 과정 (Figure 5)까지 몇 가지 중요한 요인이 있었다. 그 중에서 특히 중요한 것은 재분화 능력이 좋은 캘러스를 유도하여 선발 증식하는 것으로서 이러한 캘러스가 형질전환 효율에도 차이를 보이는 것으로 판명되었다. 지금까지 *Agrobacterium* 감염법을 이용한 Kentucky bluegrass형질전환에 대한 결과는 아직 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서 개발된 방법을 적용하면 향후 Kentucky bluegrass를 포함하여 다른 잔디에 있어서도 유용유전자를 도입할 수 있으리라 기대된다.

적 요

조각배양을 이용한 Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.)의 식물체 재분화제와 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 식물체 형질전환계를 확립하기 위해서 본 연구가 진행되었다. 유도된 캘러스는 생장조절물질의 농도와 조합의 따라서 형태가 다른 3 type의 캘러스로 분류되었다. type I은 갈색 또는 회색으로

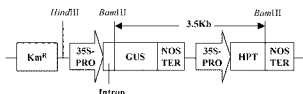


Figure 4. Schematic diagram of a part of the T-DNA region of transformation vector. pIG121Hm: Kan^R Gene for kanamycin resistance, 35S-PRO: CaMV35S-promoter, Intron: the first intron of the castor bean catalase gene, GUS: β -glucuronidase gene, NOS-TER: 3' signal of nopaline synthase, HPT gene for hygromycin phosphotransferase.

Table 4. Effect of callus type on shoot regeneration from calli of Kentucky bluegrass^a

Callus type	Shoot induction efficiency ^b (%)	No. of shoots per callus with shoots ^c
I	0	0
II	55.6	2.05 ± 0.30 ^d
III	16.7	1.7 ± 0.33

^aThe 3 types of callus were transferred to MS shoot induction media (1 mg/L BA, 1 mg/L TDZ, 2 g/L gel rite, pH 5.8) and cultured under continuous light.

^bShoots induction efficiency = No. of calli with shoots / No. of calli tested × 100.

^cData were gained from calli with shoots.

^dStandard error.

Table 5. Effect of callus type on GUS transient expression of Kentucky bluegrass

Callus type	Transient GUS expression	No. of blue spots / 100 mg
Type I	-	0
Type II	+	103.8
Type III	+	52.7

Medium agents: MS basal salts and vitamins, 100 g/L sucrose, 10 g/L glucose, 100 mg/L acetosyringone, 100 mg/L betaine, 1 mg/L 2,4-D, 0.01 mg/L BA, 2 g/L gelrite, pH5.2. *Agrobacterium tumefaciens* strain: EHA101 (pIG121Hm). Dark condition and co-culture period; 6 days.

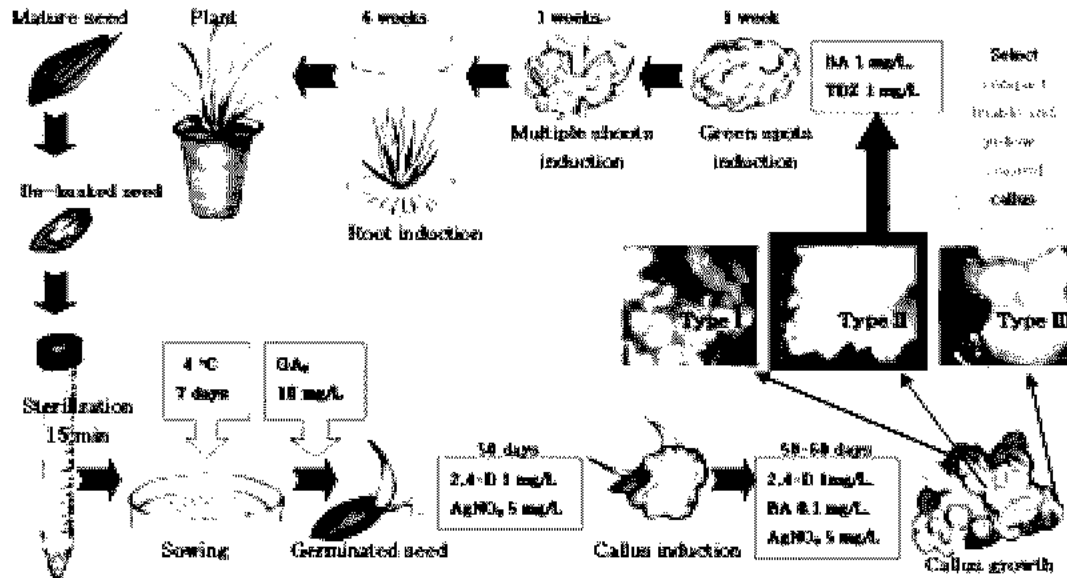


Figure 5. Regeneration system for Kentucky bluegrass. De-husked seeds were sterilized in NaOCl for 15 minutes. The seeds were allowed to imbibe sterile water at 4°C for 7 days then put in 10 mg/L GA₃. Seeds were cultured under continuous light for germination. The germinated seeds were put on MS callus induction media supplemented with 1 mg/L 2,4-D and 5 mg/L AgNO₃. Calli were induced after about 60 days of culture then transferred to growth media supplemented with 1 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BA, 5 mg/L AgNO₃. Type II calli were selected during subculture. The type II calli were transferred to regeneration media supplemented with 1 mg/L BA and 1 mg/L TDZ then cultured under continuous light. After 1 weeks green spots appeared and after 3 weeks changed to shoots.

치밀하며 표면이 단단한 것이고, type II는 회색 및 노란색으로 치밀하고 부스러지기 쉬운 것이며, type III는 부드럽고 물기 및 당 분비가 많으며 초기단계의 분화가 관찰되는 캘러스이다. 재분화 능력이 가장 좋은 type II 캘러스는 2,4-D 1mg/L, BA 0.1 mg/L을 첨가한 배지에서 가장 많이 관찰되었다. 5 mg/L AgNO₃를 배지에 첨가할 경우 type II 캘러스가 보다 많이 유도되었다. type II 캘러스를 BA 1 mg/L, TDZ 1 mg/L 첨가한 배지에 치상한 경우 multiple shoot의 유도율이 55.6%로 가장 높았다. type II 캘러스를 β-glucuronidase (GUS) 유전자를 포함한 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (binary vector pIG121)에 감염시켰을 때 가장 많은 blue spots이 관찰되었다. 그러나 type I 캘러스에서는 형질전환된 캘러스를 관찰할 수 없었다. 이상의 결과는 *Agrobacterium* 감염법을 이용한 Kentucky bluegrass 형질전환에 대한 최초의 보고이고, 이러한 배양계를 이용하면 향후 Kentucky bluegrass를 포함하여 다른 잔디의 품종 개발에 유용하게 이용되리라 기대된다.

사사 - 본 논문은 한국과학기술재단 (KOSEF)에서 지원하는 제주대 아열대 원예산업 연구센터 및 바이오그린21 사업 연구비 지원에 의해 일부 수행된 결과임.

인용문헌

Akasaka Y, Daimon H, Mii M (2000) Improved plant regeneration from cultured leaf segment in peanut (*Arachis hypogaea* L.) by

limited exposure to thidiazuron. *Plant Sci* 156: 169-175
 Akashi R, Adachi T (1992) Plant regeneration from suspension culture-derived protoplasts of apomictic dallis grass (*Paspalum dilatatum* Poir.). *Plant Sci* 82: 219-225
 Asano Y, Ugaki M (1994) Transgenic plants of *Agrostis alba* obtained by electroporation-mediated direct gene transfer into protoplasts. *Plant Cell Rep* 13: 243-246
 Bae CH, Tohyama K, Lee SC, Lim YP, Kim H, Song PS, Lee HY (2001) Efficient plant regeneration using mature seed-derived callus in Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). *Korean J Plant Tissue Culture* 28: 61-67
 Bregitzer P (1992) Plant regeneration and callus type in barley: Effects of genotype and culture medium. *Crop Sci* 32: 1108-1112
 Dalton SJ (1988) Plant regeneration from suspension protoplasts of *Festuca arundinacea* Schreb. (tall fescue) and *Lolium perenne* L. (perennial ryegrass). *J Plant Physiol* 132: 170-175
 Griffin JD, Dibble MS (1995) High-frequency plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). *Plant Cell Rep* 14: 721-724
 Ha SB, Wu FS, Thome TK (1992) Transgenic turf-type tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants regenerated from protoplast. *Plant Cell Rep* 11: 601-604
 Hartman CL, Lee L, Day PR, Turner NE (1994) Herbicide resistant turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) by biolistic transformation. *Bio/Technology* 12: 919-923
 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
- Hiei Y, Komari T, Kubo T (1994) Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* 35: 205-218
- Hom ME, Conger BV, Harms CT (1988) Plant regeneration from protoplasts of embryogenic suspension cultures of orchard grass (*Dactylis glomerata* L.). *Plant Cell Rep* 7: 371-374
- Jefferson RA, Kavanaugh TA, Bevan NH (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker for higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907
- Ke S and Lee CW (1996) Plant regeneration in Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) via coleoptile cultures. *Plant Cell Rep* 15: 882-887
- Kumria R, Rajam MV (2002) Alterations in polyamine titres during *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice with ornithine decarboxylase gene affect plant regeneration potential. *Plant Sci* 162: 769-777
- McDonnell RE, Conger BV (1984) Callus induction and plantlet formation from mature embryo explants of Kentucky bluegrass. *Crop Science* 24: 573-578
- Nayak PS, Rath SP (1997) Direct shoot regeneration from foliar explants of an epiphytic orchid, *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann. *Plant Cell Rep* 16: 583-586
- Seo MS, Bae CH, Choi DO, Rhim SL, Seo SC, Song PS, Lee HY (2002) Investigation of transformation efficiency of rice using *Agrobacterium tumefaciens* and high transformation of GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase) gene relative to chilling tolerance. *Korean J Plant Biotechnology* 29: 85-92
- Van der Valk P, Zaal MACM, Creemers-Molenaar J (1988) Regeneration of albino plantlets from suspension culture derived protoplasts of *Poa pratensis* L. (Kentucky bluegrass). *Euphytica* 5: 169-176
- Van der Valk P, Zaal MACM, Creemers-Molenaar J (1989) Somatic embryogenesis and plant regeneration in inflorescence and seed derived callus cultures of *Poa pratensis* L. (Kentucky bluegrass). *Plant Cell Rep* 7: 644-647
- Wang LJ, Ming XT, Cheng C, Yuan HY, Chen ZL (2002) Callus induction and regeneration from mature seeds of indica rice minghui 63 and anti-fungal assay of transgenic rice plants. *Chinese Journal of Biotechnology* 18: 323-326
- Zhong H, Bolyard MG, Srinivasan C, Stickelen M (1993) Transgenic plant of turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. *Plant Cell Rep* 13: 1-6

(접수일자 2003년 1월 22일, 수리일자 2003년 4월 11일)