

# 켄터키 블루그래스에 있어서 캘러스 배양 및 식물체 재분화에 미치는 요인의 영향

이기원\*·이상훈\*·이동기\*·우현숙\*·김도현\*·최명석\*\*·원성혜\*\*\*·서 성\*\*\*\*·이병현\*

경상대학교 응용생명과학부\*, 산림자원과학부\*\*

경북대학교 농업과학기술연구소\*\*\*, 농촌진흥청 축산연구소\*\*\*\*

## Factors Affecting Callus Culture and Plant Regeneration in Kentucky Bluegrass

K. W. Lee\*, S. H. Lee\*, D. G. Lee\*, H. S. Woo\*, D. H. Kim\*, M. S. Choi\*\*, S. H. Won\*\*\*, S. Seo\*\*\*\* and B. H. Lee\*

Division of Applied Life Science\*, Division of Forest Science\*\*, Gyeongsang National University  
Institute of Agri. Sci. & Tech., Kyungpook National University\*\*\*  
National Livestock Research Institute, R.D.A.\*\*\*\*

### ABSTRACT

In order to optimize tissue culture conditions of Kentucky bluegrass(*Poa pratensis* L.), effects of culture medium supplements, media and cultivars on embryogenic callus induction and regeneration of plants were investigated. MS medium containing 3 mg/L 2,4-D and 0.1mg/L BA was optimal for embryogenic callus induction from mature seeds. The highest plant regeneration frequency(57.7%) was observed when the embryogenic calli were cultured on N6 medium supplemented with 1mg/L 2,4-D and 3 mg/L BA. Among several basic media, MS and N6 medium were optimal for callus induction and plant regeneration, respectively. Genotype was an important factor in plant regenerability. ‘Newport’ showed to have higher regeneration frequency of 53.4%. Regenerated plants were grown normally when shoots transplanted to the soil. A short tissue culture period and high-frequency regeneration system would be beneficial for molecular breeding of Kentucky bluegrass through genetic transformation.

(Key words : Embryogenic callus, Forage crop, Plant tissue culture, Transformation)

### I. 서 론

켄터키 블루그래스(*Poa pratensis* L.)는 다년생의 화분과 목초로서 지하경을 가지며 추위에 강하여 겨울철 목초용으로 많이 이용되고 있다. 특히 내음성이 비교적 우수하여 음지의 서늘한 기후에서도 잘 자라며, 엽질이 부드럽고 재생 속도가 빨라 최근에는 정원, 공원 및 골프장 등의 잔디용으로 널리 재배되고 있는

초종 중의 하나이다. 그러나 생육적온이 15-20℃의 한지형 목초인 켄터키 블루그래스는 더위에 약하여 우리나라에서 재배할 경우 고온 건조한 여름철에는 생육이 극도로 저하되는 하고 현상(summer depression)을 나타내어 적절한 재배관리를 해주지 못하면 생육이 나쁘고 고사되기 쉬우며 병충해의 발생이 급격히 증가하여 수량이 감소하는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해 지금까지 자연계에 존재하는 우

Corresponding author : B. H. Lee, Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea  
Tel : 055-751-5418, Fax : 055-751-5410, E-mail : hyun@gsnu.ac.kr

수형질을 가진 품종을 선발하고 이들 간의 교잡에 의해 유용한 유전형질을 고정시키는 전통적인 육종법에 의한 연구가 활발히 진행되어 왔다(Van Wijk 등, 1993). 그러나 켄터키 블루그래스는 번식에 있어 단위생식도 하기 때문에 이수체가 고정되어 염색체 수가  $2n=28 \sim 154$ 로 변이가 큰 점 등으로 인하여 전통적인 육종법을 이용한 유전적 개량에 어려움이 있다(Ke와 Lee, 1996).

최근에는 외부의 유용유전자 도입을 통한 사료작물의 신품종 개발을 위한 많은 연구가 시도되고 있다(McKersie, 1997; Spangenberg 등, 1998). 이러한 유용유전자의 형질전환에 의한 신 품종 사료작물의 분자육종을 위해서는 먼저 단기간 내에 높은 재분화율을 나타내는 효율적인 조직배양 기술체계가 확립되어야 한다(Forster와 Spangenberg, 1999).

지금까지 켄터키 블루그래스의 조직배양에 관한 연구는 미숙화서를 이용한 식물체 재분화(Van der Valk 등, 1995)와 현탁배양세포로부터 식물체 재분화에 관한 연구(Nielson과 Knudsen, 1993) 등이 있다. 그러나 이러한 조직 및 현탁배양세포를 이용한 식물체 재분화 체계는 시료조직을 분리하고 채취하거나, 배양세포를 유지하는 등의 조작이 번거로울 뿐만 아니라 재료식물의 성장시기에 따라 시료의 확보 자체가 제한받는 등의 단점이 있다. 이러한 단점을 보완할 목적으로 연중 안정적인 시료 확보가 가능한 성숙종자를 이용한 조직배양체계의 확립이 Van Ark 등(1991)과 Van der Valk 등(1995)에 의해 보고된 바 있다. 그러나 식물체의 재분화율이 비교적 낮고 체계적인 재분화 조건이 확립되어 있지 않을 뿐만 아니라, 특히 식물체 재분화에 장기간의 배양기간이 소요되는 등의 제한요인으로 인해 유전자 형질전환에 적용하기에는 효율적이지 못한 측면이 있다.

따라서 본 연구에서는 유용유전자 형질전환을 통한 신품종 켄터키 블루그래스를 개발할 목적으로 우선 성숙종자로부터 캘러스를 유도하여 단기간 내에 완전한 식물체로 재분화시킬 수 있는 효율적인 재분화 시스템을 확립하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 식물재료 및 종자살균

켄터키 블루그래스 성숙종자로부터 캘러스 유도 및 식물체 재분화 조건을 확립하기 위한 식물재료로서 켄터키 블루그래스의 Newport, Ampellia 및 Kenblue 3가지 품종을 사용하였다. 종자의 살균은 Lee 등(2003)의 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 종피를 제거한 종자를 70% 에탄올에서 1분, 5% NaOCl 용액에서 30분간 교반하면서 표면살균 하였다. 살균한 종자는 멸균수로 3회 이상 세정한 후 멸균된 filter paper에 옮겨 물기를 제거하고 캘러스 유도배지에 치상하였다.

### 2. 배발생 캘러스의 유도 및 증식

성숙종자로부터 캘러스를 유도하기 위한 기본적인 캘러스 유도배지는 MS 기본배지(Murashige와 Skoog, 1962)에 1 mg/L thiamin-HCl, 2 mg/L copper, 250 mg/L myo-inositol, 30 g/L sucrose 및 5 g/L Gelrite가 첨가된 배지를 사용하였다. 성숙종자로부터 캘러스를 유도하기 위한 캘러스 유도배지에 첨가되는 성장조절물질의 종류와 농도에 따른 배양효과를 규명하기 위하여 auxin으로서 2,4-D(2,4-dichloro phenoxy acetic acid)와 NAA( $\alpha$ -naphthalene acetic acid), cytokinin으로서 BA(6-benzyladenine)와 Kinetin을 다양한 농도와 조합으로 단용 또는 혼용 첨가한 배지를 사용하여 4주간 암상태에서 배양한 다음, 종자로부터 유도된 캘러스를 동일성분의 새 배지에 계대한 후 2주간 배양하여 캘러스를 증식시켰다. 캘러스 유도효율은 치상한 종자에 대한 유도된 캘러스의 수를 백분율로 나타내었고, 1개의 종자로부터 형성된 캘러스의 생체중을 3반복으로 조사하여 비교하였다.

### 3. 캘러스로부터 식물체 재분화

성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체를 재분화시키기 위한 최적조건을 규명하기 위하여 6주령

의 배발생 캘러스를 N6 기본배지(Chu 등, 1975)에 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamin-HCl, 250 mg/L myo-inositol, 500 mg/L proline, 30 g/L sucrose 및 5 g/L Gelrite가 첨가된 배지를 사용하였다.

캘러스로부터 식물체 재분화배지에 첨가되는 성장조절물질의 종류와 농도에 따른 배양효과를 규명하기 위하여 auxin류로 2,4-D(2,4-dichloro phenoxy acetic acid)와 NAA( $\alpha$ -naphthalene acetic acid), cytokinin류로 BA(6-benzyladenine)와 kinetin을 다양한 농도와 조합으로 혼용 첨가한 배지에 배발생 캘러스를 치상하여 24 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 16 h light/8 h dark 조건에서 3주간 배양하고 동일성분의 새 배지에 계대한 후 3주간 더 배양하여 각각의 처리구에서 형성된 1 cm 이상으로 자란 shoot을 재분화개체로 조사하였다. 재분화된 싹은 1/2 MS 배지에 이식하여 뿌리발생을 유도하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

#### 4. 기본배지에 따른 배양효과

성숙종자로부터 캘러스 유도과 식물체 재분화를 위한 적정 기본배지의 종류를 규명하기 위하여 MS, N6 및 SH배지(Schenk와 Hildebrandt, 1972)에 상기와 동일방법으로 살균된 종자 및 캘러스를 배양하여 기본배지의 종류에 따른 캘러스 유도효율과 식물체 재분화율을 각각 조사하였다.

#### 5. 통계처리

상기의 실험에서 얻어진 결과는 SAS(1999) 프로그램을 이용하여 분산분석을 수행하였으며, Duncan의 multiple range test로 5%수준에서 평균 간의 유의성을 검정하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 성장조절물질의 종류와 농도에 따른 배양효과

켄터키 블루그래스의 종자배양에 있어서 캘러스 유도배지에 첨가되는 성장조절물질의 종

류와 농도에 따른 효과를 규명하기 위하여 2,4-D와 BA를 단용 또는 혼용 처리한 결과는 Table 1과 같다. 종자로부터의 캘러스 유도율은 3mg/L 2,4-D 단용 처리구에서 60.8%로 가장 높게 나타났으며 형성된 캘러스는 형태적으로도 조직이 치밀하고 유백색을 나타내는 배발생 캘러스가 가장 많이 형성되었으며, 이 보다 높거나 낮은 농도에서는 감소하는 추세를 보였다. 종자 한 개당 형성된 캘러스의 생체중도 3 mg/L 2,4-D 첨가구에서 64.3 mg으로 가장 높게 나타났다(Table 1). 이러한 결과는 성숙종자로부터 배발생 캘러스 유도에는 auxin으로는 3 mg/L 2,4-D가 효율적임을 나타낸 것이며, 화분과 목초인 tall fescue(Bai와 Qu, 2000)의 경우와도 유사한 결과를 나타낸 것이다.

Table 1. Effect of 2,4-D and BA on callus formation from mature seed culture of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L. cv. Newport).

Growth regulators (mg/L)		No. of seeds transferred	Callus formation (%) <sup>*</sup>	Callus fresh weight per seed(mg) <sup>**</sup>
2,4-D	BA			
1	0	120	32.5	33.4 $\pm$ 0.7 <sup>d</sup>
3	0	120	60.8	64.3 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>
5	0	120	35.8	62.5 $\pm$ 2.4 <sup>b</sup>
3	0.1	120	53.3	68.7 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>
3	0.5	120	38.3	46.1 $\pm$ 1.6 <sup>c</sup>
3	1.0	120	25.8	30.3 $\pm$ 4.3 <sup>d</sup>

<sup>\*</sup> Dehusked mature seeds were placed on MS medium containing 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 500 mg/L L-proline, 250 mg/L myo-inositol, 30 g/L sucrose, 2 mg/L copper sulfate, 5 g/L Gelrite, and cultured for 6 weeks.

<sup>\*\*</sup> Data represent mean of callus fresh weight formed from one seed.

Different superscripts of same row indicate significant differences at p<0.05.

한편 가장 높은 캘러스 유도율을 보였던 3 mg/L 2,4-D에 BA를 혼용처리하였을 때의 배양효과를 조사한 결과, 전체적으로는 2,4-D 단용처리구에 비해 캘러스 유도율은 약간 감소하였으나, 생체중은 3 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA를 혼

용처리하였을 때 68.7 mg으로 가장 높게 나타났으며, 그 이상의 BA 농도에서는 캘러스 유도율과 생체중이 감소하는 경향을 보였다. 따라서 식물체 재분화를 위한 배발생 캘러스는 3 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA를 혼용처리한 배지에서 유도한 캘러스를 이용하였다.

2. 캘러스로부터 식물체 재분화

성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체 재분화시에 배지에 첨가되는 성장조절제의 종류와 적정농도를 조사하기 위하여 캘러스 유도배지에서 형성된 캘러스를 우선 2,4-D와 BA가 첨가된 N6 배지를 기본으로 하는 재분화배지에 옮겨 배양한 후, 식물체 재분화율을 조사한 결과 Table 2와 같다. 캘러스로부터 식물체 재분화에는 1 mg/L 2,4-D와 3 mg/L BA 혼용처리구가 재분화율 57.7%로서 가장 높게 나타났으며, 0.5 mg/L 2,4-D와 3 mg/L BA 혼용처리구에서는 42.8%의 재분화율을 나타내었다. 반면 5 mg/L 이상의 BA 처리구에서는 재분화율이 오히려 감소하는 경향이 나타났다(Table 2).

한편 NAA와 kinetin을 혼용처리한 재분화배지에서의 식물체 재분화율에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 전체적으로는 2,4-D와 BA 혼용처리구에 비해 매우 낮은 식물체 재분화율을 나타내어, 1 mg/L NAA와 5 mg/L kinetin을 첨가해 주었을 때 31.7%의 재분화율을 보였다(Table 3). 따라서 켄터키 블루그래스의 효율적인 재분화를 위한 적정 식물체 성장조절물질의 처리는 캘러스 유도시에는 3 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA를 첨가해주어 재분화효율이 우수한 배발생 캘러스를 형성시키고, 이 캘러스를 1 mg/L 2,4-D와 3 mg/L BA가 첨가된 배지에서 배양함으로써 57% 이상의 높은 재분화율을 얻을 수 있을 것으로 판단된다. 이러한 경향은 화분과 목초인 오차드그래스(Lee 등, 2003)의 경우에도 보고된 바 있어서 이들 화분과 목초들의 경우, 고농도의 2,4-D와 저농도의 BA를 첨가한 배지에서 배발생 캘러스를 유도한 후, 식물체 재분화시에는 2,4-D의 농도를 감소시키고 BA를 고농도로 첨가시켜 줌으로써 높은 재분화효율을 나타내는 것으로 판단된다.

Table 2. Effect of 2,4-D and BA on plant regeneration from mature seed-derived callus of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L. cv. Newport).

2,4-D (mg/L)	BA (mg/L)	No. of calli transferred	Plant regeneration (%)*
0.5	1.0	100	21.2 ± 4.1 <sup>d</sup>
0.5	3.0	100	42.8 ± 0.9 <sup>b</sup>
0.5	5.0	100	36.2 ± 2.3 <sup>c</sup>
1.0	1.0	100	10.6 ± 1.7 <sup>d</sup>
1.0	3.0	100	57.7 ± 3.3 <sup>a</sup>
1.0	5.0	100	35.2 ± 2.6 <sup>c</sup>

\* Calli were transferred to the regeneration medium (N6 medium, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 250 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 2 mg/L copper sulfate, 5 g/L Gelrite) containing different concentrations of growth regulators, and cultured for 6 weeks. Different superscripts of same row indicate significant differences at p<0.05.

Table 3. Effect of NAA and kinetin on plant regeneration from mature seed-derived callus of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L. cv. Newport).

NAA (mg/L)	Kinetin (mg/L)	No. of calli transferred	Plant regeneration (%)*
0.5	1.0	100	26.2 ± 0.3 <sup>b</sup>
0.5	3.0	100	27.1 ± 0.7 <sup>b</sup>
0.5	5.0	100	29.1 ± 1.1 <sup>ab</sup>
1.0	1.0	100	21.2 ± 0.8 <sup>c</sup>
1.0	3.0	100	23.5 ± 2.1 <sup>c</sup>
1.0	5.0	100	31.7 ± 1.9 <sup>a</sup>

\* Calli were transferred to the regeneration medium (N6 medium, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 250 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 2 mg/L copper sulfate, 5 g/L Gelrite) containing different concentrations of growth regulators, and cultured for 6 weeks. Different superscripts of same row indicate significant differences at p<0.05.

### 3. 기본배지 종류별 배양효과

켄터키 블루그래스의 종자로부터 캘러스유도 및 식물체 재분화에 미치는 기본배지의 종류에 따른 영향을 조사하기 위하여, MS, SH 및 N6 기본배지를 사용하여 조사한 결과는 Table 4와 같다. 캘러스 유도율은 MS 배지와 N6 배지가 각각 51.6 및 49.1%로서 SH 배지의 31.7%에 비해 높은 효율을 나타내었으며, 식물체 재분화율은 N6 배지가 52.4%로서 MS 배지나 SH 배지에 비해 월등히 높은 재분화율을 보였다 (Table 4). 화분과 목초의 캘러스 유도배지의 경우 일반적으로 N6 배지가 효율적인 것으로 알려져 있으나(Vasil 및 Vasil 1984), 톨 페스큐의 미숙배 배양(Bai와 Qu 2000) 및 이탈리아 라이그래스의 종자배양(Wang 등, 1993; Ye 등, 1997) 등의 경우에는 MS 배지가 캘러스 유도에 더 효율적인 것으로 보고된 바 있으며, 켄터키 블루그래스의 경우도 톨 페스큐와 이탈리아 라이그래스와 유사한 경향을 나타내는 것으로 판단되었다.

Table 4. Effect of the basal medium on callus formation and plant regeneration from mature seed culture of Kentucky bluegrass(*Poa pratensis* L. cv. Newport).

Culture media	No. of seeds transferred	Callus formation (%)*	No. of calli transferred	Plant regeneration (%)**
MS	120	51.6	100	48.1 ± 1.5 <sup>b</sup>
N6	120	49.1	100	52.4 ± 2.0 <sup>a</sup>
SH	120	31.7	100	34.2 ± 2.8 <sup>c</sup>

\* Calli cultured on the callus induction medium (basal medium, 3 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 250 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 2 mg/L copper sulfate, 5 g/L Gelrite).

\*\* Calli were transferred to the regeneration medium (basal medium, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 250 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 2 mg/L copper sulfate, 5 g/L Gelrite), and cultured for 6 weeks.

Different superscripts of same row indicate significant differences at p<0.05.

### 4. 품종에 따른 배양효율의 차이

켄터키 블루그래스의 각 품종간의 배양효율의 차이를 조사하기 위하여 Ampellia, Kenblue 및 Newport의 세 가지 품종의 성숙종자를 이용하여 배발생 캘러스의 유도율과 식물체 재분화율을 각각 비교하였다(Table 5). 그 결과, 배발생 캘러스 유도율의 경우 Newport 품종이 50.8%로서 가장 높았으며 Ampellia가 38.3%, Kenblue가 27.5%의 순으로 나타났다. 캘러스로부터 식물체 재분화율은 Newport 품종이 53.4%로서 가장 높았으며 Ampellia가 36.4%, Kenblue가 22.9%의 재분화율을 각각 나타내어 품종간의 배양효율에 있어서 큰 차이가 관찰되었다. 이와 같은 품종간에 배양효율의 차이를 보이는 현상은 화분과 목초인 이탈리아 라이그래스(Rim 등, 2000), 페레니얼 라이그래스(Wang 등, 1993) 및 레드 페스큐(Altpeter와 Xu, 2000) 등에서도 보고된 바 있다. 이러한 품종간 차이는 모식물체의 genotype에 따른 차이, 품종에 따른 최적 재분화 배지조건의 차이, 기내 배양시 세포의 활력 등에 따른 배양효율의 차이 때문일 것으로 추측된다 (Vasil과 Vasil, 1984).

Table 5. Effect of cultivars on callus formation and plant regeneration from mature seed culture of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.)

Cultivars	No. of seeds transferred	Callus formation (%)*	No. of calli transferred	Plant regeneration (%)**
Ampellia	120	38.3 ± 0.6 <sup>b</sup>	100	36.4 ± 3.1 <sup>b</sup>
Kenblue	120	27.5 ± 0.3 <sup>c</sup>	100	22.9 ± 2.6 <sup>c</sup>
Newport	120	50.8 ± 2.3 <sup>a</sup>	100	53.4 ± 3.7 <sup>a</sup>

\* Dehusked mature seeds were placed on the callus induction medium and cultured for 6 weeks.

\*\* Calli were transferred to the regeneration medium (N6 medium, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 250 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 2 mg/L copper sulfate, 5 g/L Gelrite), and cultured for 6 weeks.

Different superscripts of same row indicate significant differences at p<0.05.

따라서 켄터키 블루그래스의 조직배양을 위한 최적 품종 및 배양조건은 품종은 Newport가, 배발생 캘러스 유도에는 3 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA가 첨가된 MS 배지가, 식물체 재분화에는 1 mg/L 2,4-D와 3 mg/L BA가 첨가된 N6 배지가 가장 효과적인 것으로 판단되었다. 이러한 조건에서 배양했을 때 배발생 캘러스는 캘러스 유도배지에서 배양 5일째부터 형성되기 시작하여 6주 후에는 50% 이상 형성되었으며 (Fig. 1. A, B), 재분화배지에 이식했을 때 배양 6

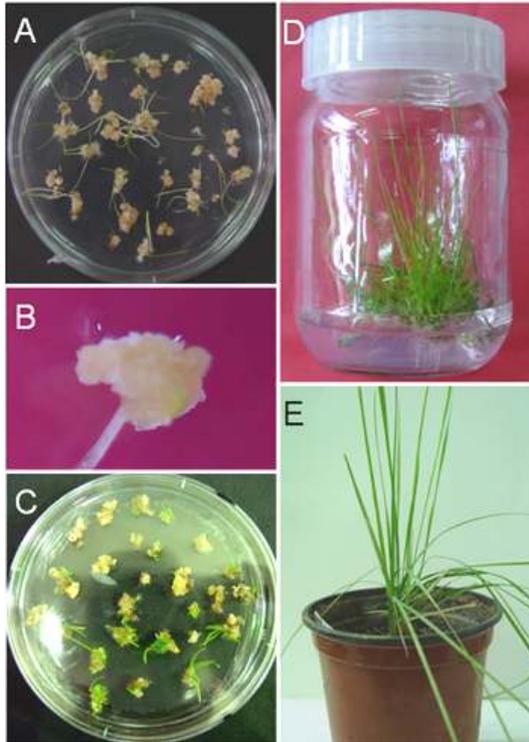


Fig. 1. Plant regeneration from seed-derived callus of Kentucky bluegrass. A, Mature seed-derived callus cultured for 4 weeks on the callus induction medium; B, Embryogenic callus formed from a seed; C, Plant regeneration from embryogenic calli cultured for 2 weeks on the regeneration medium. ; D, Plantlets cultured in the rooting medium for 2 weeks; E, Whole plants grown in pots under green house.

주 후에는 약 58%의 높은 빈도로 신초가 재분화되었다(Fig. 1. C). 재분화된 신초는 1/2 MS 배지로 구성된 rooting 배지에서 1주간 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 pot에 이식하여 재배할 수 있었다(Fig. 1. D, E).

켄터키 블루그래스는 현재 사료작물로 많이 이용되고 있을 뿐만 아니라, 잔디용으로도 많이 이용되고 있는 품종 중의 하나이다. 그러나 한지형 목초인 켄터키 블루그래스는 하절기의 고온 다습 조건에서 생육이 나쁘고, 병해충의 발생이 급격하게 증가하기 때문에 농약의 소비가 많아지고 유지 관리가 어려운 단점이 있다. 따라서 켄터키 블루그래스 이러한 문제점을 개선하기 위해서는 고온 다습과 같은 각종 환경 스트레스에 잘 견디는 신품종 개발이 시급한 실정이다. 본 연구에서 개발한 단기간 내에 캘러스로부터 식물체를 재분화시킬 수 있는 효율적인 재분화시스템은 장래에 각종 환경 스트레스에 대해 내성을 부여하는 유전자의 도입을 통한 신품종 개발에 유용하게 이용될 것으로 판단된다.

#### IV. 요약

켄터키 블루그래스의 최적 조직배양조건을 확립하기 위하여 성숙종자로부터 배발생 캘러스 유도 및 효율적인 식물체 재분화를 위한 품종별 배양효과, 배지종류 및 배지첨가물 등의 최적조건을 조사하였다. 배발생 캘러스 유도시 첨가되는 auxin으로는 2,4-D가 가장 효율적이었으며, 3 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA가 첨가된 MS 배지에서 배발생 캘러스가 가장 높은 빈도로 유도되었다. 식물체 재분화는 배발생 캘러스를 1 mg/L 2,4-D와 3 mg/L BA가 첨가된 N6 배지에서 배양했을 때 57.7%의 높은 재분화율을 나타내었다. 기본배지의 종류에 따른 배양효율의 차이는 캘러스 유도에는 MS 배지가, 식물체 재분화에는 N6 배지가 효과적이었다. 켄터키 블루그래스의 품종에 따른 배발생 캘러스의 유도율과 재분화 능력은 큰 차이를 나타내어 Newport가 가장 높은 배양효율을 나타내었다. 본 연구를 통하여 확립된 단기간의 효율적인 재분화시

시스템은 분자유종을 통한 신품종 켄터키 블루그래스 개발에 유용하게 응용되어질 수 있을 것이다.

## V. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 ‘바이오그린21사업’의 연구비 지원에 의해 이루어진 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

## VI. 인 용 문 헌

1. Altpeter, F. and Xu, J. 2000. Rapid production of transgenic turfgrass(*Festuca rubra* L.) plants. *Plant Physiol* 157:441-448.
2. Bai, Y. and Qu, R. 2000. An evaluation on callus induction and plant regeneration of 25 turf-type tall fescue(*Festuca arundinacea* Schreb.) cultivars. *Grass Forage Sci* 55:326-330.
3. Chu, C. C., Wang, C. S., Sun, C. C., Hsu, C., Yin, K. C., Chu, C. Y. and Bi, F. Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinic.* 18:659-668.
4. Forster, J. W. and Spangenberg, G. 1999. Forage and turf grass biotechnology: principles, methods and prospects. In: Setlow, J. K.(Ed.), *Genetic engineering: principles and methods*, Vol. 21, Kluwer Academic Publishers, New York, p. 191.
5. Ke, S. and Lee, C. W. 1996. Plant regeneration in Kentucky bluegrass(*Poa pratensis* L.) via coleoptile tissue cultures. *Plant Cell Rep.* 15:882-887.
6. Krans, J. V. 1981. Cell culture of turfgrass. pp. 27-33.
7. Lee, S. H., Lee, D. G., Kim, J. S. and Lee, B. H. 2003. High-frequency plant regeneration from mature seed-derived callus culture of orchardgrass. *Kor J Plant Biotechnology* 30:341-346.
8. McKersie, B. D. 1997. Improving forage production systems using biotechnology. In: McKersie, B. D. and Brown, D. C. W.(Eds), *Biotechnology in Agriculture* Series, No. 17, CAB International, Wallingford, p. 3.
9. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revise medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
10. Nielsen, K. A. and Knudsen, E. 1993. Regeneration of green plants from embryogenic suspension culture of Kentucky bluegrass(*Poa pratensis* L.). *Plant Cell Rep* 12:537-540.
11. Rim, Y. W., Kim, K. Y., Choi, K. J., Sung, B. R. and Shin, J. S. 2000. Callus induction from seeds of Italian ryegrass and plant regeneration. *J Kor Grassland Sci* 20:25-0.
12. SAS. 1999. SAS/STAT Software for PC. Release 8.1, SAS institute, Cary, NC, U.S.A.
13. Schenk, R. U. and Hildebrandt, A. C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50:199-04.
14. Spangenberg, G., Wang, Z. Y. and Potrykus, I. 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.
15. Van Ark, H. F., Zaal, M. A. C. M., Creemers-Molenaar, J. and Van der Valk, P. 1991. Improvement of tissue culture response of seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass. *Plant Vell Tiss Org Cult* 27:275-280.
16. Van der Valk, P., Ruis, F., Tettelaar-Schrier, A. M. and Van der Velde, C. M. 1995. Optimizing plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass, the effect of benzyladenine. *Plant Cell Tiss Org Cult* 40:101-103.
17. Van Wijk, A. J. P., Boonman, J. G. and Rumball, W. 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.
18. Vasil, V. and Vasil, I. K. 1984. Induction and maintenance of embryogenic callus cultures of Gramineae. In: Vasil IK(eds), *Cell culture and*

- somatic cell genetics of plants, Vol 1, Academic Press, Orlando, pp. 36-42.
19. Wang, Z. Y., Nagel, J., Potrykus, I. and Spangenberg, G. 1993. Plants from cell suspension-derived protoplasts in *Lolium* species. *Plant Sci* 94:179-193.
20. Ye, X., Wang, Z. Y., Wu, X., Potrykus, I. and Spangenberg, G. 1997. Transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. *Plant Cell Rep* 16:379-384.
- (접수일자 : 2005. 6. 16. / 채택일자 : 2005. 11. 22.)