

억새 성숙종자로부터 캘러스 유도 및 식물체 재분화에 있어서 식물생장호르몬의 영향

박충훈 · 김용구 · 김경희 · 알람 이프테칼 · 이효진 · 샤르민 샤미마 · 이기원* · 이병현

Effect of Plant Growth Regulators on Callus Induction and Plant Regeneration from Mature Seed Culture of *Miscanthus sinensis*

Choong-Hoon Park, Yong-Goo Kim, Kyung-Hee Kim, Iftekhhar Alam, Hyo-Jin Lee,
Shamima Akhtar Sharmin, Ki-Won Lee* and Byung-Hyun Lee

ABSTRACT

In order to optimize tissue culture conditions for genetic transformation of *Miscanthus sinensis*, we investigated the effects of different plant growth regulators on callus induction and plant regeneration using mature seeds as explant. Dehusked mature seeds were cultured on MS medium supplemented with 3 to 10 mg/L 2,4-D, dicamba or NAA, 30 g/L sucrose and 750 mg/L MgCl₂ · 6H₂O. A number of combinations of auxin and cytokinin (BA, kinetin) were also used. MS medium containing 3 mg/L 2,4-D was found optimal for embryogenic callus induction (75.7%) from mature seed. The highest number of plants were regenerated (44.6%) upon transferring the embryogenic callus to MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D plus 2 mg/L BA. This high efficient plant regeneration system could be useful to use for molecular breeding of new cultivars by genetic transformation.

(Key words : Callus, Plant growth regulators, *Miscanthus*)

I. 서 론

억새 (*Miscanthus sinensis*)는 국내에 흔히 자생하는 다년생 C4 식물이며, 건물수량이 매년 ha당 20~40톤 정도로 매우 높다. 또한, 비료나 농약 등이 거의 필요하지 않고 수분 이용 면에서 아주 효율적이기 때문에 생산비용이 저렴하며, 척박한 토양에서도 높은 생산성을 유지하는 식물이기도 하다 (Clifton-Brown 등, 2004;

Jones 및 Walsh, 2001; Lewandowski 등, 2000; Speller, 1993). 이러한 장점으로 인해 억새는 조사료 자원으로서 뿐만 아니라, 바이오에탄올 생산을 위한 원료작물로 활용하고자 하는 연구도 활발히 이루어지고 있다 (Clifton-Brown 등, 2008). 억새는 친환경 바이오에너지원으로서 지구온난화문제 해결에 큰 도움이 될 것이며, 섬유질 에탄올 생산용 원료작물로서 당질, 전분질 원료와는 달리 인류식량과 비경쟁적이기 때

경상대학교 응용생명과학부, 농업생명과학연구원 (Division of Applied Life Science (BK21), Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea)

* 농촌진흥청 국립축산과학원 (National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 330-801, Korea)

Corresponding author : Byung-Hyun Lee, Division of Applied Life Science (BK21), Gyeongsang National University Jinju 660-701, Korea, Tel: +82-55-751-5418, Fax: +82-55-751-5410, E-mail: hyun@gsnu.ac.kr

문에 윤리적인 문제가 나타나지 않는다. 하지만, 역새의 높은 리그닌 함량은 조사료로서 세포벽 소화효율을 감소시킬 뿐만 아니라, 바이오에탄올로의 전환효율을 감소시켜 실용화에 제약이 되고 있다. 따라서 역새의 조사료 건물 소화효율을 높이고 바이오에탄올로의 당화공정 효율을 높이기 위해서는 리그닌 함량을 줄인 신품종 역새 개발이 절실하다. 저 리그닌 신품종 역새가 개발되면 소화효율 증가로 가축생산성이 증가되고 에탄올 당화효율도 증대되어 산업적 가치도 극대화할 수 있을 것이다.

작물의 육종에는 크게 전통육종법과 분자유종법 2가지로 나누어 볼 수 있다. 전통육종법은 신품종 개발에 있어서 넓은 경작시설이 필요하고 오랜 기간이 소요되며 속간의 교잡에 의해서만 육종이 이루어지는 등 많은 제약이 따른다. 하지만 분자유종은 짧은 기간 내에 실험실 규모에서 신품종 개발이 가능하고 특정 유전형질을 다른 종으로 전이시킬 수 있어서 전통육종의 한계를 보완할 수 있다. 따라서 저 리그닌 신품종 역새 개발을 위해서는 분자유종 기법의 도입은 필수적이라 할 수 있다.

분자유종을 통한 신품종 역새 개발을 위해서는 우선 안정적인 캘러스 유도과 식물체 재분화를 위한 효율적인 역새 조직배양 체계가 확립되어야 한다. 1990년대에 역새의 미성숙 화서, 정단조직, 잎, 뿌리를 이용한 캘러스 유도와 식물체 재분화 연구(Holme 및 Petersen, 1996; Holme 등, 1997; Petersen, 1997; Petersen 등, 1999)가 보고되었으나, 연중 어느 때든지 활용이 가능한 성숙종자를 이용한 캘러스 유도와 식물체 재분화 연구에 관한 보고는 아직까지 없다.

따라서 본 연구에서는 저 리그닌 신품종 역새를 개발함에 있어 우선 연중 안정적인 실험 재료로 공급될 수 있는 성숙종자로부터 효율적인 캘러스 유도와 식물체 재분화 체계를 확립하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 종자살균

조직배양을 위한 식물재료로는 국내 자생종 역새의 성숙종자를 사용하였다. 성숙종자의 종피는 50% H₂SO₄를 사용하여 제거하였다. 캘러스 유도를 위해 종자의 살균은(이 등, 2003; 2004a)의 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 종피가 제거된 성숙종자를 70% ethanol에서 30초간 표면살균하고 멸균수로 3회 세정한 후, 다시 30% (v/v) sodium hypochlorite 용액을 첨가하여 60분간 교반하면서 표면살균 하였다. 살균된 종자는 멸균수로 3회 이상 세정한 다음 멸균된 filter paper로 옮겨 물기를 제거한 후, 캘러스 유도배지에 치상하였다.

2. 배발생 캘러스 유도

성숙종자로부터 캘러스를 유도하기 위한 기본적인 캘러스 유도배지는 Holme 및 Petersen (1996)의 방법에 준하여 30 g/L sucrose, 750 mg/L MgCl₂ · 6H₂O, 2 g/L gelrite가 함유된 MS 배지(Murashige 및 Skoog, 1962)를 사용하였다. 캘러스 유도시의 식물생장조절물질의 종류와 농도에 따른 배발생 캘러스 유도효율을 조사하기 위하여 상기의 캘러스 유도배지에 auxin류로 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 3,6-dichloro-o-anisic acid (dicamba), α-naphthalene acetic acid (NAA)를 사용하였고 cytokinin류로 6-benzyladenine (BA), N6-furfuryladenine (kinetin)을 사용하였으며, auxin과 cytokinin을 단용 또는 혼용 첨가한 배지를 사용하였다. 배지에 살균된 종자를 치상한 다음, 24±2℃의 성장실에서 약광 조건으로 4주간 배양하였다. 캘러스 형성능은 치상한 종자에 대한 유도된 캘러스의 수를 백분율로 나타내었고 3반복으로 조사하여 비교하였다.

3. 식물체 재분화

성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체로 재분화시키기 위한 재분화 배지로는 Holme 등 (Holme 및 Petersen, 1996)의 방법에 준하여 30 g/L sucrose, 750 mg/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2 g/L gelrite가 함유된 MS 배지를 사용하였다. 식물체 재분화를 위한 적정 식물생장조절물질의 종류와 농도를 조사하기 위하여 4주령의 배발생 캘러스를 auxin류인 2,4-D, dicamba와 cytokinin류인 BA, kinetin을 단독 또는 조합 첨가한 재분화 배지에 옮겨 24±2℃, 16 h light / 8 h dark 조건에서 4주간 배양하였다. 배양 후 각각의 처리구에서 형성된 2 cm 이상으로 자란 shoot을 재분화개체로 조사하였다. 식물체 재분화효율은 이식된 캘러스에 대한 식물체가 유도된 캘러스의 수를 백분율로 나타내었으며 3반복으로 조사하여 비교하였다. 재분화된 shoot은 1/2 MS 배지에 이식하여 뿌리발생을 유도하여 완

전한 식물체로 분화시킨 후 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 식물생장조절물질의 종류와 농도에 따른 캘러스의 유도효율

식물조직배양에 있어서 캘러스 유도는 동일한 식물체내에서도 이용되는 explant의 부위나 식물생장조절물질의 종류와 농도에 따라 그 양상이 달라진다(우 등, 2004; 이 등, 2003; 이 등, 2004b). 역세의 종자배양에 있어서 캘러스 유도배지에 첨가되는 auxin의 종류와 농도에 따른 최적의 배양효과를 조사하기 위하여 살균된 역세 성숙종자를 2,4-D, dicamba, NAA가 각각 0, 3, 5, 7 및 10 mg/L의 농도로 첨가된 캘러스 유도배지에서 배양한 결과 Table 1과 같이 나타났다. 배발생 캘러스의 유도효율은

Table 1. Effect of different concentration of auxins on callus induction from mature seeds of *Miscanthus sinensis*

Auxins (mg/L)	No. of seeds transferred	No. of callus induced*	Callus induction (%)*
2,4-D	0	150	0
	3	150	113.6±2.5
	5	150	104.6±3.2
	7	150	97.0±4.0
	10	150	79.0±6.2
Dicamba	0	150	0
	3	150	77.3±1.5
	5	150	81.3±4.5
	7	150	73.0±3.6
	10	150	73.3±3.5
NAA	0	150	0
	3	150	3.3±0.5
	5	150	3.0±1.7
	7	150	4.6±2.0
	10	150	7.3±0.5

* Values represent the mean±standard deviation (SD) of three independent experiments

2,4-D와 dicamba 처리구가 NAA 첨가구보다 높게 나타났다. 2,4-D 처리구의 경우 3 mg/L 농도로 첨가해 주었을 때 75.7%의 가장 높은 캘러스 유도효율을 나타내었으며 2,4-D 첨가농도가 높아질수록 캘러스 유도효율이 조금씩 감소하는 경향을 보였고 장기간 배양시에는 갈변하면서 고사하는 현상을 보였다. Dicamba 처리구의 캘러스 유도효율은 5 mg/L에서 54.2%로 가장 높았으며 2,4-D와 마찬가지로 dicamba 농도가 증가할수록 점차적으로 감소하는 경향을 나타내었다. NAA 처리구의 경우 전체적으로 캘러스 유도효율이 매우 저조하였고 갈변 현상이 많이 나타났다.

이와 같은 결과는 식물의 배발생 캘러스를 유도함에 있어서 2,4-D의 첨가가 다른 종류의 auxin 첨가보다 더 효과적이라는 다른 연구결과(임 등, 2000; Bai 및 Qu, 2000; Griffin 및 Dibble, 1995; Petersen, 1997)와 유사한 경향을

나타낸 것이다. 따라서 역새의 성숙종자로부터 캘러스를 유도함에 있어 유도배지에 첨가되어 질 auxin류로는 3 mg/L 2,4-D가 가장 효율적인 것으로 판단되었다.

한편 auxin 단일처리구에서 가장 높은 효율을 보였던 3 mg/L 2,4-D 처리구와 두 번째로 높은 효율을 보였던 5 mg/L dicamba 처리구에 각각 0.1~0.3 mg/L의 BA와 kinetin을 혼용처리했을 때의 캘러스 유도효율을 조사한 결과 Table 2와 같다.

3 mg/L 2,4-D와 cytokinin류 혼용처리구의 경우 0.1 mg/L kinetin을 혼용처리 했을 때 27.1%로 가장 높았으며, 5 mg/L dicamba와 cytokinin류 혼용처리구의 경우도 0.1 mg/L kinetin을 혼용처리 했을 때 18.6%로 가장 높았다. 이와 같이 캘러스 유도배지에 cytokinin류인 BA와 kinetin이 첨가되었을 때 캘러스 형성능이 급격히 저하하였으며 캘러스 유도시에 shoot이 많

Table 2. Effect of auxins and cytokinins on callus induction from mature seeds of *Miscanthus sinensis*

Growth regulators (mg/L)		No. of seeds transferred	No. of callus induced*	Callus induction (%)*
2,4-D	BA			
	0	150	112.3±2.5	74.8±1.6
	3			
	0.1	150	29.0±4.5	19.3±3.0
	0.3	150	32.0±4.5	21±3.0
2,4-D	Kinetin			
	0	150	112.3±2.5	74.8±1.6
	3			
	0.1	150	40.6±3.2	27.1±2.1
	0.3	150	12.6±2.0	8.4±1.3
Dicamba	BA			
	0	150	79.6±4.0	53.1±2.6
	5			
	0.1	150	24.6±2.0	16.4±1.3
	0.3	150	20.3±4.5	13.5±3.0
Dicamba	Kinetin			
	0	150	79.6±4.0	53.1±2.6
	5			
	0.1	150	28.0±6.2	18.6±4.1
	0.3	150	21.0±1.7	13.9±1.1

* Values represent the mean±standard deviation (SD) of three independent experiments.

이 형성되었고 초기에 갈변하면서 고사하는 현상을 보였다. 켄터키블루그래스, 버뮤다그래스, 보리 등의 단자엽 식물 (Chaudhury 및 Rongda, 2000; Cho 등, 1998; Griffin 및 Dibble, 1995; Van 등, 1995; Zhong 및 Sticklen, 1991)에서 배발생 캘러스 유도시 식물생장조절물질 BA의 첨가가 캘러스 유도효율을 높인다는 보고와 전혀 다른 결과를 보였다.

따라서, 이 후 실험에서 역새 성숙종자로부터 캘러스를 유도함에 있어 캘러스 유도배지에 3 mg/L 2,4-D를 단용 처리하여 사용하였다.

2. 식물생장조절물질의 종류와 농도에 따른 식물체의 재분화 효율

성숙종자유래의 캘러스로부터 식물체 재분화 효율을 알아보기 위해 배지에 첨가되는 식물생장조절물질의 종류와 적정농도를 조사한 결과 Table 3과 같이 나타났다. 배발생 캘러스 유도효율이 가장 우수한 3 mg/L 2,4-D가 첨가된 캘러스 유도배지에서 4주간 형성된 배발생 캘러스를 kinetin, BA가 각각 0, 2, 4 mg/L의 농도로 첨가된 재분화 배지에서 배양해 본 결과 2

Table 3. Effect of different concentration cytokinins on plant regeneration from mature seeds-derived callus of *Miscanthus sinensis*

Cytokinins (mg/L)		No. of calli transferred	Plant regeneration (%)*
BA	0	100	13.6±1.1
	2	100	37.3±3.0
	4	100	20.6±3.2
Kinetin	0	100	14.3±2.5
	2	100	40.6±3.5
	4	100	17.3±1.5

* Values represent the mean±standard deviation (SD) of three independent experiments.

Table 4. Effect of auxins and cytokinins on plant regeneration from mature seeds-derived callus of *Miscanthus sinensis*

Growth regulators (mg/L)		No. of calli transferred	Plant regeneration (%)*
2,4-D	BA	100	36.3±2.5
		100	44.6±3.5
		100	32.6±3.5
2,4-D	Kinetin	100	41.3±2.3
		100	24.0±2.6
		100	27.6±3.5
Dicamba	BA	100	36.3±2.5
		100	18.6±3.0
		100	36.0±4.0
Dicamba	Kinetin	100	41.3±2.3
		100	12.0±1.7
		100	22.0±2.6

* Values represent the mean±standard deviation (SD) of three independent experiments.

mg/L kinetin이 40.6%로 가장 높은 재분화효율을 나타내었고 2 mg/L BA가 37.3% 재분화효율을 나타내었다. 따라서 kinetin과 BA 사이에 큰 차이는 없었고 두 식물생장조절물질 모두 2 mg/L 농도에서 식물체 재분화효율이 뚜렷하게 감소함을 확인할 수 있었다.

또한 auxin (2,4-D, dicamba)과 cytokinin (BA, kinetin)을 혼용처리 했을 때 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사 결과는 Table 4와 같다. 여러가지 혼용처리구 중에서 1 mg/L의 2,4-D에 2 mg/L의 BA를 혼용처리한 처리구가 44.6%로 가장 높은 재분화효율을 나타냄으로써, 식물체 재분화의 경우 2,4-D와 BA 혼용처리가 auxin류의 단독처리보다 높은 식물체 재분화 효율을 보여주었다. 이러한 결과는 auxin류와 더불어 배지에 첨가된 BA가 배발생 캘러스로부터 신초형성에 있어서 상호 상승적으로 작용한 결과로 추측된다.

본 실험을 통하여 식물생장조절물질의 종류와 농도의 최적조건을 확립함으로써 종자유래의 캘러스로부터 고효율 재분화 체계를 확립할 수 있었다. 배발생 캘러스 유도에서 식물생장조절물질 최적조건은 3 mg/L의 2,4-D이고 식물체 재분화에 있어서 식물생장조절물질 최적조건은 1 mg/L 2,4-D와 2 mg/L BA 혼용처리로 나타났다. 이러한 최적조건에서 역세 성숙종자를 배양했을 때 배발생캘러스는 캘러스 유도배지에서 70% 이상 형성되었으며 (Fig. 1A, B), 재분화 배지에 이식했을 때 배양 4주 후에는 높은 빈도로 신초가 재분화 되었다 (Fig. 1C, D). 재분화된 신초는 1/2 MS로 구성된 rooting 배지에서 2주간 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 (Fig. 1E) pot에 이식하여 재배할 수 있었다 (Fig. 1F). 금후 식물생장조절물질 외의 다른 요인에 의한 연구가 추진되면 더욱 고효율 재분화체계가 확립 될 것이고, 이는 곧 높

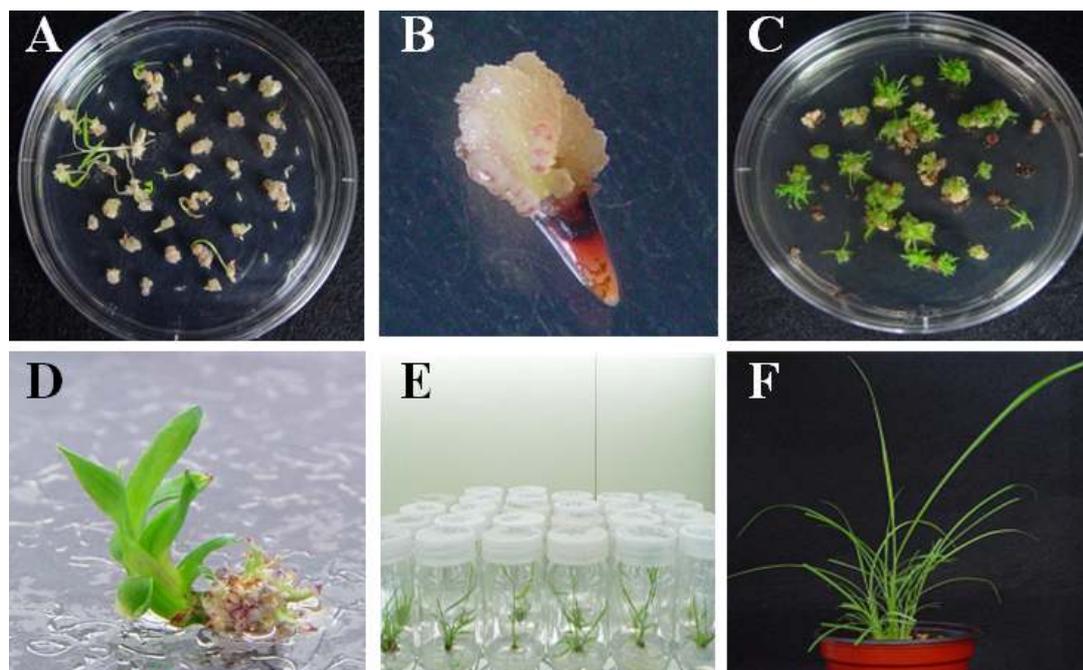


Fig. 1. Plant regeneration from seed-derived callus of *Miscanthus sinensis*. (A) Calli induced from mature seeds cultured on the callus induction medium; (B) Embryogenic callus formed from a seed; (C) Plant regeneration from embryogenic calli in the regeneration medium; (D) Development of a shoot cultured in the regeneration medium; (E) Plantlets cultured in the rooting medium; (F) Whole plant grown in pot.

은 유전자 형질전환 효율을 높이기 위한 기반 기술로 활용될 수 있을 것이다.

IV. 요약

역세의 최적 조직배양조건을 확립하기 위하여 성숙종자로부터 배발생 캘러스 유도 및 캘러스로부터 식물체 재분화에 미치는 식물생장 조절물질의 영향을 조사하였다. 배발생 캘러스 유도시 첨가되는 auxin으로는 2,4-D가 가장 효율적이었으며, 3 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지에서 배발생 캘러스가 가장 높은 빈도로 유도되었다. 식물체 재분화는 배발생 캘러스를 1 mg/L 2,4-D와 2 mg/L BA가 첨가된 재분화 배지에서 배양했을 때 가장 높은 재분화효율을 보여주었다. 본 연구를 통하여 확립된 효율적인 배발생 캘러스의 유도 및 식물체 재분화 체계는 역세의 신품종 개발을 위한 분자유종 기술 확립에 유용하게 이용 될 수 있을 것이다.

V. 사 사

본 연구는 KRIBB 주요사업의 연구비 지원 및 농촌진흥청 농업현장대응사업의 연구비지원 (과제번호: 2009010FT12 3475088)에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

VI. 인용 문헌

- 우현숙, 이상훈, 이동기, 김진수, 원성혜, 이병현. 2004. 이탈리아 라이그래스의 성숙종자 유래 캘러스로부터 효율적인 식물체 재분화. 한국식물생명공학회지 31(1):43-48.
- 이상훈, 이동기, 김진수, 이병현. 2003. 오차드그래스 성숙종자로부터 캘러스 유도 및 고효율 식물체 재분화. 한국식물생명공학회지 30(4):341-346.
- 이상훈, 우현숙, 이병현. 2004a. 이탈리아 라이그래스의 형질전환에 미치는 몇 가지 요인의 영향. 한국동물자원과학회지 46(2):235-242.
- 이상훈, 김범수, 원성혜, 조진기, 김기용, 박근제, 성병렬, 이효신, 이병현. 2004b. 들잔디 성숙종자로부터 캘러스배양 및 식물체 재분화에 미치는 몇 가지 요인의 영향. 한국초지학회지 24(1):29-36.
- 임용우, 김기용, 최기준, 성병렬, 신정섭. 2000. 이탈리아 라이그래스 종자로부터 캘러스 유도 및 식물체 재분화. 한국초지학회지 20(1):25-30.
- Bai, Y. and R. Qu. 2000. An evaluation on callus induction and plant regeneration of turf-type tall fescue (*Festuca arundinacea Schreb.*) cultivars. Grass Forage Sci. 55:326-330.
- Chaudhury, A. and Q. Rongda. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type Bermuda grass: effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 60:113-120.
- Cho, M.J., W. Jiang and P.G. Laumaux. 1998. Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. Plant Sci. 138:229-244.
- Clifton-Brown, J.C., P.F. Stampfl and M.B. Jones. 2004. *Miscanthus* biomass production for energy in Europe and its potential contribution to decreasing fossil fuel carbon emissions. Global Change Biology. 10:509-519.
- Clifton-Brown, J. C., Y.-C. Chiang and T. R. Hodkinson. 2008. *Miscanthus*: Genetic resources and breeding potential to enhance bioenergy production. pp. 273-294 in: Genetic Improvement of Bioenergy Crops, Vermerris, W.(Ed.). ISBN: 978-0-387-70804-1.
- Griffin, J.D. and M.S. Dibble. 1995. High frequency plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis L.*). Plant Cell Rep. 14:721-724.
- Holme, I.B. and K.K. Petersen. 1996. Callus induction and plant regeneration from different explant types of *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus'. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 45:43-52.
- Holme, I.B., P. Krogstrup and J. Hansen. 1997. Embryogenic callus formation, growth and regeneration in callus and suspension cultures of *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus' as affected by proline. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 50:203-210.
- Jones, M.B. and M. Walsh. 2001. *Miscanthus* for

- energy and fibre. James and James (Science Publishers). London.
15. Lewandowski, I., J.C. Clifton-Brown, J.M.O. Scurlock and W. Huisman. 2000. *Miscanthus*: European experience with a novel energy crop. *Biomass and Bioenergy*. 19:209-277.
 16. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revise medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15:473-497.
 17. Petersen, K.K. 1997. Callus induction and plant regeneration in *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus' as influenced by benzyladenine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 49:137-140.
 18. Petersen, K.K., J. Hansen and P. Krogstrup. 1999. Significance of different carbon source and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus'. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 58:189-197.
 19. Speller, C.S. 1993. The potential for growing biomass crops for fuel on surplus land in the UK. *Outlook Agric.* 22:23-29.
 20. Van, D., P. Valk, F. Ruis, A.M. Tettelaar-Schrier, D. Van and C.M. Velde. 1995. Optimizing plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass, the effect of benzyladenine. *Plant Cell Tiss. Org. cult.* 40:101-103.
 21. Zhong, H. and M.B. Sticklen. 1991. Plant regeneration via somatic embryogenesis in creeping bentgrass. *Plant Cell Rep.* 10:453-456.
- (접수일: 2009년 10월 16일, 수정일 1차: 2009년 10월 20일, 수정일 2차: 2009년 11월 19일, 게재확정일: 2009년 12월 7일)