

난지형 목초 버뮤다그라스의 종자유래 캘러스로부터 식물체 재분화

이기원¹ · 박형수¹ · 최기준¹ · 김기용¹ · 지희정¹ · 김경희² · 이병현² · 이상훈¹

Plant Regeneration from Mature Seed-Derived Callus in Bermudagrass (*Cynodon dactylon*)

Ki-Won Lee¹, Hyung Soo Park¹, Gi Jun Choi¹, Ki-Yong Kim¹, Hee Chung Ji¹,
Kyung-Hee Kim², Byung-Hyun Lee² and Sang-Hoon Lee¹

ABSTRACT

The present study was conducted to determine the optimum *in vitro* culture condition for callus induction and plant regeneration from mature seeds of bermudagrass (*Cynodon dactylon* cv. Common). It was revealed that mature seeds cultured on MS medium supplemented with 2 mg/L 2,4-D, 0.5 g/L proline, 0.5 g/L casamino acid and 3 g/L Gelrite under light condition produced the highest percentage of callus formation (39.2%). The most suitable medium for plant regeneration from dehydrated calli was MS agar medium supplemented with 0.5 mg/L 2,4-D, 2 mg/L BA, 0.5 g/L proline, 0.5 g/L casamino acid 3 g/L Gelrite which induced the highest percentage of calli forming shoots (57.7%). The frequency of callus induction and plant regeneration were the highest on sucrose, followed by maltose. The shoots were rooted at the highest rate (100%) when transferred onto 1/2 MS medium. Regenerated plants were morphologically uniform with normal growth pattern.

(Key words : Bermudagrass, Callus, Plant regeneration, Tissue culture)

I. 서 론

버뮤다그라스 (*Cynodon dactylon*)는 남아프리카가 원산지인 난지형 화본과 초종으로서 건조와 고온에 강한 생육 특성을 가지고 있어 열대, 아열대 및 온대지역에 널리 분포하고 있는 초종중의 하나이다 (Taliaferro 등, 1995). 버뮤다그라스는 그 이용형태에 따라 골프장 그린, 운동경기장, 공원 등의 잔디조성용으로 많이 이용되고 있으며 목초용으로 초지조성 및 방목용

으로도 많이 이용되고 있다 (Zhang 등, 2007).

최근 기후 온난화로 인해 난지지역 확대로 난지형 목초 재배지역이 북상하고 있으며 한지형 목초의 수량이 봄철에 편중되고 여름철 하고현상으로 한지형 목초의 생산성 저하를 보완해 줄 대안으로서 난지형 목초의 중요성이 점차 증대되고 있다. 버뮤다그라스는 강방목과 잦은 예취에도 재생능력이 우수하며 질소 비료 시비에도 반응이 빠르고 사료가치가 높은 특성으로 인해 여름철 중요한 목초자원으로 활용가

¹ 농촌진흥청 국립축산과학원 (National Institute of Animal Science, RDA)

² 경상대학교 응용생명과학부 (Division of Applied Life Science (BK21 program), Gyeongsang National University)

Corresponding author : Sang-Hoon Lee, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 330-801, Korea.

Tel: +82-41-580-6754, Fax: +82-41-580-6779, E-mail: sanghoon@korea.kr

치가 높아지고 있는 추세이다. 그러나 우리나라의 경우 버뮤다그라스는 제주도 및 남해안 일부지역에서 일부 생태형으로 자생하고 있으나 난지형 목초의 특성상 내한성이 약하여 그 이용의 한계가 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해 최근에는 유용유전자의 직접도입을 통하여 버뮤다그라스의 분자육종 연구가 많이 시도되고 있다 (Goldman 등, 2004; Lu 등, 2007). 이러한 유용유전자의 형질전환을 통한 신품종 육종을 위해서는 우선 효율적인 세포배양기술과 식물체 재분화기술 등의 체계적인 조직배양기술이 확립되어야 한다. 지금까지 보고된 버뮤다그라스의 조직배양을 통한 식물체 재분화에 관한 연구는 미성숙 화서를 이용한 식물체 재분화 (Chaudhury와 Rongda, 2000; Li와 Qu, 2002; Lu 등, 2003), 현탁배양 세포배양을 이용한 식물체 재분화 (Lu 등, 2006) 및 포복경을 이용한 식물체 재분화 (Li와 Qu, 2004)에 관한 연구 등이 보고된 바 있으나 품종에 따른 배양 효율의 차이가 많이 나며 세포분열이 완성된 특수한 식물체 조직을 유지해야 하는 등의 번거로움이 있어서 형질전환의 재료로 이용하기에는 비효율적인 점이 많다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 난지권의 방목용 초지조성에 많이 이용되고 있는 버뮤다그라스의 유용유전자 형질전환을 통한 신품종 개발을 목적으로 연중 안정적으로 이용할 수 있는 성숙종자로부터 버뮤다그라스의 효율적인 캘러스유도와 식물체 재분화 체계를 확립하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 종자소득

식물재료로는 버뮤다그라스 (*Cynodon dactylon*)의 Common 품종을 사용하였다. 성숙종자의 종피를 제거하기 위해 50% (v/v) sulfuric acid (H_2SO_4)에서 10분간 교반한 다음 멸균수로 5회

이상 세정하였다. 종피가 제거된 종자는 다시 70% ethanol에 1분간 살균한 후, 30% (v/v) sodium hypochlorite 용액에서 30분간 교반하면서 표면살균 하였다. 살균된 종자는 멸균수로 5회 이상 세정한 다음 멸균된 filter paper로 옮겨 물기를 완전히 제거한 후, 캘러스 유도배지에 치상하였다.

2. 성숙종자로부터 캘러스의 유도

성숙종자로부터 캘러스를 유도하기 위하여 MS (Murashige와 Skoog, 1962) 기본배지에 0.5 g/L proline, 0.5 g/L casamino acid 및 3 g/L Gelrite가 첨가된 배지를 사용하였다. 캘러스 유도시의 식물생장조절물질 중 auxin류의 종류와 농도에 따른 배발생 캘러스 유도효율을 조사하기 위하여 상기의 캘러스 유도배지에 2,4-D와 NAA (α -naphthalene acetic acid)를 각각 0.5~5 mg/L를 첨가한 배지를 사용하였다. 캘러스 유도배지에 살균된 종자를 100개씩 치상한 다음, $24\pm 2^\circ C$ 의 생장실에서 암 조건으로 4주간 배양한 후, 종자로부터 형성된 캘러스의 비율을 조사하여 비교하였다. 종자로부터 유도된 캘러스는 상기와 동일한 캘러스 유도배지에서 3주 간격으로 계대배양하여 유지하였다.

3. 캘러스로부터 식물체 재분화

성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체로 재분화를 유도하기 위하여 MS 기본배지에 0.5 g/L proline, 0.5 g/L casamino acid 및 3 g/L Gelrite가 첨가된 배지를 사용하였다. 식물체 재분화를 위한 적정 생장조절물질의 종류와 농도를 조사하기 위하여 100개의 캘러스를 2,4-D와 BA (6-benzyladenine) 및 NAA (α -naphthalene acetic acid)와 kiniten이 각각 조합처리된 재분화배지에 옮겨 $24\pm 2^\circ C$, 16 h light/8 h dark 조건에서 3주간 배양한 다음 동일한 새 배지에 1회 계대배양한 후, 총 6주 동안 배양하여 각각

의 처리구에서 형성된 1 cm 이상으로 자란 shoot를 재분화배지로 조사하였다. 재분화된 shoot는 1/2 MS 배지에 이식하여 뿌리발생을 유도하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

4. 탄소원 종류별 배양효율

성숙종자로부터 캘러스 유도배지와 식물체 재분화배지에 에너지원으로 첨가되는 탄소원의 종류별 배양효과를 조사하기 위하여 캘러스 유도배지 및 재분화 배지에 sucrose, maltose, glucose 및 sorbitol을 각각 30 g/L 농도로 배지에 첨가하여 배양한 후, 캘러스 유도율과 재분화된 식물체의 개체수를 각각 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 성장조절물질에 따른 캘러스 배양효과

버뮤다그라스의 성숙 종자배양에 있어서 캘러스 유도배지에 첨가되는 성장조절물질의 종류와 농도에 따른 효과를 규명하기 위하여 살균된 common 품종의 종자를 2,4-D와 NAA가 각각 0.5~5 mg/L의 농도로 첨가된 캘러스 유도배지에서 배양해 본 결과, 종자로부터의 캘러스 유도율은 2 mg/L 2,4-D가 첨가된 처리구에서 약 39.2%로 가장 높게 나타났다(Fig. 1A). 저농도의 2,4-D가 첨가된 처리구에서 서서히 캘러스 유도율이 높게 나타났으며 3 mg/L 이상의 고농도의 2,4-D가 첨가된 처리구에서는 농도가 높아질수록 캘러스 유도율은 오히려 점점 감소하는 경향을 보였다(Fig. 1A). 또한, NAA 처리구에서의 캘러스 유도효율은 2 mg/L NAA가 첨가된 처리구에서 30.8%로 가장 높게 나타났으나 2,4-D 처리구에 비해 전반적으로 낮은 캘러스 유도효율을 보였다(Fig. 1B). 캘러스 유도배지에 첨가되는 성장조절물질의 종류와 농도에 따른 캘러스 생체중과 형태적인 차이는

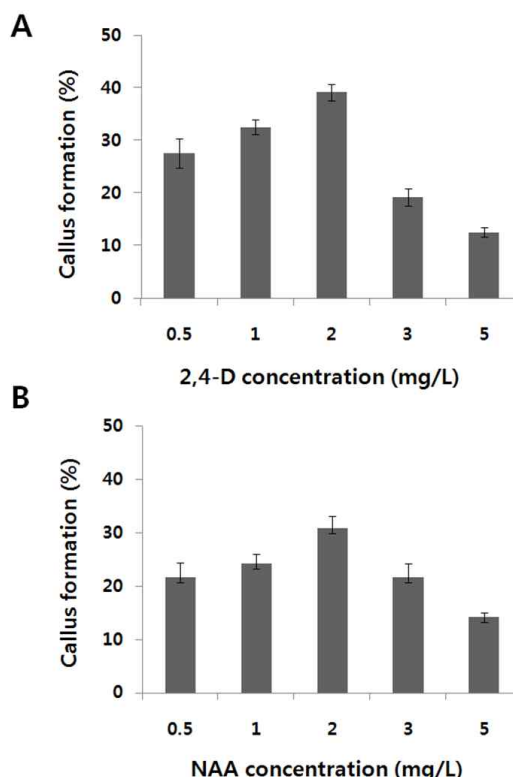


Fig. 1. Effect of different auxins on callus induction from mature seeds of bermudagrass (*Cynodon dactylon*). (A) Addition of different concentrations of 2,4-D, (B) Addition of different concentrations of NAA.

나타나지 않았다 (결과미제시).

지금까지 연구된 화분과 목초의 캘러스를 배양함에 있어 첨가되어지는 옥신류로 2,4-D를 캘러스 유도배지에 첨가해주는 것이 배발생 캘러스의 형성율을 개선시킨다는 결과가 화분과 작물인 오차드그라스(Lee 등, 2003) 이탈리아 라이그라스(Lee 등, 2009b), 페레니얼 라이그라스(Lee 등, 2009a), 티모시(Lee 등, 2008) 배양 등에서도 보고된 바가 있다.

2. 성장조절물질에 따른 식물체 재분화

성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체 재분화시에 배지에 첨가되는 성장조절제의 종류와

적정농도를 조사하기 위하여 캘러스 유도배지에서 형성된 캘러스를 2,4-D와 BA 및 NAA와 BA가 각각 혼용 첨가된 MS 배지를 기본으로 하는 재분화 배지에 옮겨 배양한 후, 식물체 재분화율을 조사한 결과 Table 1과 2와 같이 나타났다. 성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체 재분화에는 0.5 mg/L 2,4-D와 2 mg/L BA 혼용 처리한 처리구에서 재분화율이 57.7%로서 가장 높게 나타났으며, 3 mg/L 이상의 BA가 첨가된 처리구에서는 재분화율이 오히려 감소하는 경향이 나타났으며 1 mg/L 2,4-D와 1 mg/L BA 혼용처리구에서는 19.3%의 가장 낮은 재분화율을 나타내었다 (Table 1). 한편 NAA와 BA를 혼용으로 처리한 재분화 배지에서의 식물체 재분화율에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같이 나타났다. 전체적으로는 2,4-D와 BA 혼용처리구에 비해 낮은 식물체 재분화율이 나타났다. NAA와 BA 혼용 처리구의 경우 0.5 mg/L NAA와 2 mg/L BA를 첨가해 주었을 때 53.3%의 가장 높은 재분화율을 나타내었고 NAA와 BA 혼용처리 또한 NAA 첨가 농도와 BA 첨가 농도가 높아질수록 재분화율이 오히려 감소하는 경향이 나타났다. 따라서 벼류다그라스의 효율적인 재분화를 위한 적정 식물생장조절물질의 처리는 성숙종자로부터 캘러스 유도시에는 2 mg/L 2,4-D를 첨가하여 캘러스를 형성시키고 캘러스로부터 식물체 재분화에는 0.5 mg/L 2,4-D와 2 mg/L BA가 첨가된 배지에서 배양함으로써 50% 이상의 높은 재분화율을 얻을 수 있을 것으로 판단된다. 지금까지 보고된 벼류다그라스의 조직배양에 관한 연구에서는 배양되는 식물체 조직과 품종에 따라 배양효율에 많은 차이가 나타났다 (Chaudhury와 Rongda, 2000; Zhang 등, 2007).

3. 탄소원의 종류에 따른 배양효율

성숙종자로부터 캘러스유도와 식물체 재분화 배지에 에너지원으로 첨가되는 탄소원의 종류

Table 1. Effect of 2,4-D and BA concentrations on plant regeneration from mature seed-derived calli of bermudagrass (*Cynodon dactylon*)

	Growth regulators (mg/L)		No. of seeds transferred	Plant regeneration (%) ^a
	2,4-D	BA		
0.5		1	100	40.7±2.5
		2	100	57.7±4.2
		3	100	45.3±2.5
		5	100	35.0±3.6
1		1	100	19.3±1.5
		2	100	42.3±2.5
		3	100	48.3±2.5
		5	100	38.0±2.0

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

Table 2. Effect of NAA and BA concentrations on plant regeneration from mature seed-derived calli of bermudagrass (*Cynodon dactylon*)

	Growth regulators (mg/L)		No. of seeds transferred	Plant regeneration (%) ^a
	NAA	BA		
0.5		1	100	41.3±4.5
		2	100	53.3±1.2
		3	100	46.7±3.1
		5	100	30.7±1.5
1		1	100	22.7±2.1
		2	100	40.0±2.0
		3	100	46.7±3.2
		5	100	33.0±2.6

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

에 따른 배양효과를 조사한 결과 캘러스 유도에는 3%의 sucrose와 maltose를 첨가했을 때 30% 이상의 높은 캘러스 유도율을 나타내었으며 sucrose 첨가구가 maltose 첨가구에 비해 약 3% 높은 경향을 보였으며 sorbitol과 manitol의 경우는 10% 이하의 아주 낮은 캘러스 유도율

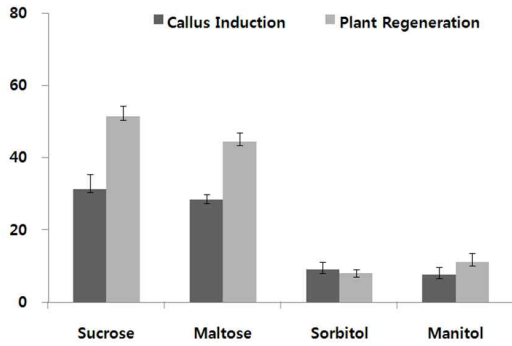


Fig. 2. Effect of different carbon sources on callus formation and plant regeneration from mature seed culture of bermudagrass (*Cynodon dactylon*).

을 나타내었다 (Fig. 3). 식물체 재분화율 또한 sucrose 혹은 maltose 첨가구에서 50% 이상의 높은 효율을 나타내었으며, sorbitol 혹은 manitol 첨가구의 경우는 10% 내외의 아주 낮은 효율을 나타내었다 (Fig. 3). 이러한 결과는 적정 성장조절제와 배지조건에서 배양하더라도 배지 내에 첨가되는 탄소원의 종류가 캘러스 유도과 식물체 재분화효율에 미치는 영향이 매우 크다는 것을 의미한다. 따라서 버뮤다그라스의 캘러스 유도와 식물체 재분화 배지에 필요한 배양 탄소원은 sucrose 첨가가 가장 효과적인 것으로 판명되었다.

이러한 조건에서 배양했을 때 배발생 캘러스는 캘러스유도 배지에서 배양 5일째부터 형성되기 시작하여 4주 후에는 30% 이상 형성되었

으며 (Fig. 3A, B), 재분화배지에 이식했을 때 배양 6주 후에는 약 50%의 높은 빈도로 신초가 재분화되었다 (Fig. 3C). 재분화된 신초는 1/2 MS로 구성된 rooting 배지에서 1주간 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 pot에 이식하여 재배할 수 있었다 (Fig. 3D, E).

IV. 요약

버뮤다그라스는 현재 난지형 목초자원으로 많이 이용되고 있을 뿐만 아니라, 잔디용으로도 많이 이용되고 있는 품종 중의 하나이다. 그러나 난지형 목초인 버뮤다그라스는 동절기의 동해를 받아 일부 고사하거나 생육이 불량하며, 여름철 병해충 등의 발생으로 유지 관리가 어려운 단점이 있다. 따라서 버뮤다그라스의 이러한 문제점을 개선하기 위해서는 동해와 같은 각종 환경 스트레스에 잘 견디는 신품종 개발이 시급한 실정이다. 본 연구에서는 버뮤다그라스의 성숙종자로부터 성장조절물질의 종류와 농도에 따른 캘러스 유도 및 식물체 재분화 효율을 조사하였다. 버뮤다그라스의 성숙종자배양에 있어서 캘러스 유도배지에 2 mg/L 2,4-D가 첨가된 처리구에서 39.2%로 가장 높게 나타났으며 식물체 재분화에는 0.5 mg/L 2,4-D와 2 mg/L BA가 첨가된 배지에서 배양함으로써 57.7% 이상의 높은 재분화율을 얻을 수 있었다. 캘러스유도와 식물체 재분화 배지에 필

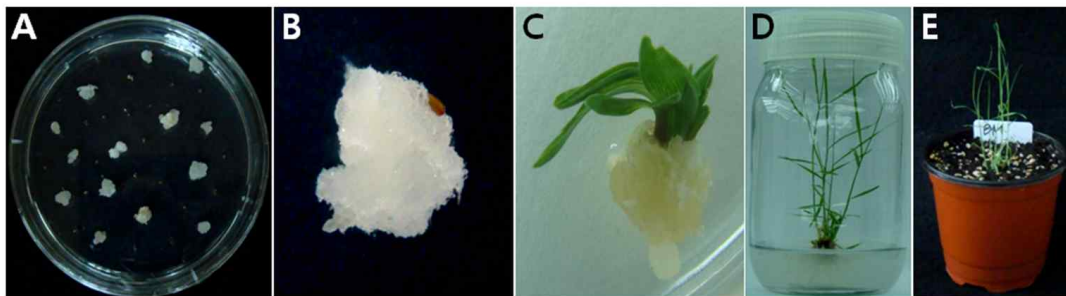


Fig. 3. Plant regeneration from mature seed-derived callus of bermudagrass (*Cynodon dactylon*). A-B, Calli induced from mature seeds cultured on the callus induction medium; C, Development of shoots cultured in the regeneration medium; D, Regenerated plants on the rooting medium; E, Whole plants grown in pots.

요한 배양 탄소원은 sucrose 첨가가 가장 효과적인 것으로 판명되었다. 본 연구를 통하여 확립된 성숙종자로부터 캘러스 유도 및 식물체 재분화 시스템은 향후 각종 환경 스트레스에 대해 내성을 부여하는 유용 유전자의 도입을 통한 신품종 개발에 유용하게 이용될 것으로 판단된다.

V. 사 사

본 연구는 2011년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후 연수과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

VI. 인 용 문 헌

1. Chaudhury, A. and Q. Rongda. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf type bermudagrass: effect of 6-benzyladenin in callus induction medium. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 60:113-120.
 2. Goldman, J.J., W.W. Hanna, G.H. Fleming and P. Ozias-Akins. 2004. Ploidy variation among herbicide-resistant bermudagrass plants of cv. TifEagle transformed with the bar gene. *Plant Cell Rep.* 22:553-560.
 3. Lee, K.-W., K.-Y. Kim, G.J. Choi, Y.C. Lim, W.H. Kim, M.W. Jung, S. Seo, B.-H. Lee and S.-H. Lee. 2008. Callus Induction and plant regeneration from mature seeds of timothy. *J. Kor. Grassl. Forage Sci.* 28:165-170.
 4. Lee, K.-W., J.K. Lee, K.-Y. Kim, H.C. Ji, H.S. Park, K.-H. Kim, B.-H. Lee and S.-H. Lee. 2009a. Plant regeneration capacity of calluses derived from mature seed of perennial ryegrass cultivars. *J. Kor. Grassl. Forage Sci.* 29:285-290.
 5. Lee, K.-W., G.J. Choi, K.-Y. Kim, H.C. Ji, H.S. Park, S.H. Yoon. and S.-H. Lee. 2009b. High frequency plant regeneration from mature seed derived callus of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) cultivars. *African Journal of Biotechnology.* 8(24):6828-6833.
 6. Lee, S.-H., D.-G. Lee, J.-S. Kim and B.-H. Lee. 2003. High-frequency plant regeneration from mature seed-derived callus culture of orchardgrass. *Kor J Plant Biotechnology.* 30:341-346.
 7. Li, L. and R. Qu. 2002. *In vitro* somatic embryogenesis in turf-type bermudagrass roles of ABA and GA, and occurrence of repetitive somatic embryogenesis. *Plant Breed.* 121:155-158.
 8. Li, L. and R. Qu. 2004. Development of highly regenerable callus lines and biolistic transformation of turf-type common bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.). Pers.]. *Plant Cell Rep.* 22:403-407.
 9. Lu, S., Z. Guo and Y. Chen. 2003. Preliminary study on tissue culture of bermudagrass and its dwarf somaclonal variant. *Acta Hort Sin.* 30: 482-484.
 10. Lu, S., Z. Wang, X. Peng, Z. Guo, G. Zhang and L. Han. 2006. An efficient callus suspension culture system for triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* · *C. dactylon*) and somaclonal variations. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 87:77-84.
 11. Lu, S., X. Peng, Z. Guo, G. Zhang, Z. Wang, C. Wang, C. Pang, Z. Fan and J. Wang. 2007. *In vitro* selection of salinity tolerant variants from triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* · *C. dactylon*) and their physiological responses to salt and drought stress. *Plant Cell Rep.* 26:1413-1420.
 12. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15:473-497.
 13. Taliaferro, C.M. 1995. Diversity and vulnerability of bermuda turfgrass species. *Crop Sci.* 35:327-332.
 14. Zhang, S., W. Hanna and P. Ozias-Akins. 2007. Comparison of callus induction and plant regeneration from different explants in triploid and tetraploid turf-type bermudagrasses. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 90:71-78.
- (접수일: 2011년 6월 30일, 수정일 1차: 2011년 7월 15일, 수정일 2차: 2011년 7월 30일, 게재확정일: 2011년 8월 8일)