

# 갈대 (*Phragmites communis* Trinius.)의 종자배양에 있어서 식물생장조절물질이 캘러스 유도과 식물체 재분화에 미치는 영향

김용구 · 김경희 · 이병현

## Effect of Plant Growth Regulators on Callus Induction and Plant Regeneration from Seed Culture of Reed

Yong-Goo Kim, Kyung-Hee Kim and Byung-Hyun Lee

### ABSTRACT

In order to develop an efficient, reliable and reproducible tissue culture system for reed (*Phragmites communis* Trinius), an efficient plant regeneration system via callus induction was established using mature seeds as explants. MS medium containing 1 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L BA was optimal for callus induction from mature seeds. The highest frequency (88.7%) of callus formation was obtained in 1.0 mg/L 2,4-D. The highest plant regeneration frequency (59.6%) was found when the embryogenic calli were subcultured on MS medium supplemented with 100 mg/L myo-inositol, whereas, adding of plant growth regulators was not so promising in this case. Our result would be useful for development of transgenic reed plants.

(**Key words** : Callus, Plant regeneration, Reed, Mature seed)

### I. 서 론

최근 전 세계적으로 화석 연료의 과다 사용에 따른 자원 고갈 및 환경오염에 대한 우려가 증가함에 따라 자연과 공존하며 안정적이고 지속적으로 에너지를 생산하는 신재생 대체에너지 개념이 화두가 되고 있다. 특히 선진국을 중심으로 환경오염 및 지구온난화 문제 해결을 위해 화석 연료의 사용에 대한 규제를 강화하고 환경 친화적 신재생 에너지의 보급을 확산하려는 정책이 입안되고 있다(한, 2007). 이러한 가운데 지구상에서 가장 풍부하고 고갈 없이 재생이 가능한 식물자원으로부터 바이오에

너지를 생산하는 것은 지구온난화 방지를 막는 매우 유용한 방법 중의 하나이며, 특히 식량 또는 사료와 경쟁적이지 않는 비식용 식물을 바이오에너지 작물로 이용하는 것은 매우 바람직한 접근 방법이라 할 수 있다. 그 중에서도 다년생 화분과 식물의 경우 biomass 수량이 많고 작물을 재배하는데 있어서 비료와 에너지 투입이 많이 요구되지 않음으로서 바이오에너지 작물로서 매우 효율적으로 활용될 수 있다.

갈대는 외떡잎식물 화분목 화분과의 여러해살이 풀이며 주로 습지나 갯가, 호수 주변 모래땅에서 서식하는 식물이다(Mckee와 Richards, 1996). 갈대의 분포지역으로는 북반구 온대에서

경상대학교 응용생명과학부 동물생명과학과 (Dept. of Animal Biosciences, IALS, PMBBRC, Division of Applied Life Sciences (BK21), Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea)

Corresponding author: Byung-Hyun Lee, IALS, PMBBRC, Division of Applied Life Science (BK21 program), Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea. Tel: 055-772-1882, E-mail: hyun@gnu.ac.kr

부터 아한대에 이르기까지 널리 분포되어 자라고, 우리나라에서도 전국적으로 자생하며, 높이는 1~5미터쯤 되며 군락을 이루어 자란다. 원줄기는 속이 비어 있고 마디에 털이 있는 것도 있으며 곧고 단단하여 각종 세공용이나 건축용 자재로도 활용되고 있다 (Anonymous, 1969). 또한 갈대는 증금속이나 카드뮴 등에 의해 오염된 수질을 정화시켜주는 작용이 강하여 phytoremediation 소재로도 많이 활용되고 있다 (Negri, 1996; Ye 등, 1998). 따라서 습지에서 주로 자생하는 갈대를 건조, 고염 등과 같은 환경스트레스에 대한 내성을 증가시켜 구릉지나 간척지 등에서 재배하여 수확량을 증대시키거나, 세포벽 구성성분인 셀룰로스의 함량을 증가시킨 품종을 육성하게 되면 고효율 바이오에너지 작물 신품종 개발이 가능할 것이다. 이러한 신품종 개발을 위해서는 형질전환기술을 이용한 분자유종기술이 필수적이며, 최적의 형질전환체계의 확립을 위해서는 우선 단기간 내에 높은 재분화율을 나타내는 고효율 조직배양 기술체계 확립이 필수적이라 할 수 있다 (Forster와 Spangenberg, 1999).

지금까지 다양한 화분과 식물에 대한 조직배양 및 형질전환에 대한 연구가 있어 왔으나 (Spangenberg 등, 1998), 갈대의 재분화에 관한 연구는 Poonawala 등 (1999)이 세 가지 종류의 갈대에 있어서 조직절편체로부터 micropropagation에 미치는 생장물질들의 영향에 관해 보고한 바 있고, 그 후 Denis 등 (2000)이 갈대의 체세포 배 분화에 대한 연구를 보고한 바 있다. 그러나 아직까지 우리나라에 자생하는 갈대에 대한 체계적인 식물체 재분화 조건 확립에 관한 보고는 없는 상태이다. 특히 대부분의 화분과 식물에 있어서 식물체 재분화는 유전적 요인이나 배양조건에 따라 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있으며, 그 중에서도 특히 식물생장조절물질의 종류와 농도 등의 조합에 의해 가장 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다 (George 등, 1987). 따라서 본 연구에서는 갈

대의 성숙종자로부터 캘러스를 유도하여 단기간 내에 완전한 식물체로 재분화시킬 수 있는 고효율 시스템을 확립하고자 각 배양단계에 있어서 영향을 미치는 주요 요인에 대한 영향을 조사하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 성숙종자 살균 및 식물재료

식물재료로는 갈대 (*Phragmites communis* Trinius.)의 성숙종자를 사용하였다. 캘러스 유도를 위한 종자의 살균은 이 등 (2003)의 방법에 준하여 실시하였다. 성숙종자의 종피를 제거한 다음 70% ethanol에서 1분간 표면살균하고 멸균수로 3회 세정한 후, 다시 30% (v/v) sodium hypochlorite 용액을 첨가하여 30분간 교반하면서 표면살균 하였다. 살균된 종자는 멸균수로 3회 이상 세정하고 멸균된 filter paper에서 수분을 완전히 제거하고, 캘러스 유도배지에 치상하였다.

### 2. 캘러스 유도 및 계대배양

성숙종자 배 유래 캘러스를 얻기 위하여 MS 기본배지 (Murashige와 Skoog, 1962)에 sucrose 30 g/L와 gelrite 3 g/L을 첨가하여 pH5.8로 조정된 MS 기본 고형배지를 사용하였으며, 이때 첨가되는 각 식물생장조절물질의 종류와 농도에 따른 배양효과를 규명하기 위하여 auxin류로는 2,4-D (2,4-dichloro phenoxy acetic acid), NAA ( $\alpha$ -naphthalene acetic acid) 및 Dicamba (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid)를, cytokinin류로는 BA와 kinetin을 다양한 농도와 조합으로 배지에 첨가한 후 캘러스 유도에 미치는 영향을 조사하였다. 유도된 캘러스는 각각 상기 조건의 생장호르몬 배지에서 2주 간격으로 계대배양하면서 체세포 배 발생 캘러스의 유도효율을 조사 하였다.

### 3. 종자유래 캘러스로부터 식물체 재분화

치상 후 6주령의 캘러스를 MS 기본배지 (Murashige와 Skoog, 1962)에 100 mg/L myo-inositol, 30 g/L sucrose 및 2 g/L Gelrite가 첨가된 배지를 기본으로 하여 다양한 식물생장조절물질 조합을 처리함으로써 성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체를 재분화 시키기 위한 최적 조건을 조사하였다.

캘러스로부터 식물체 재분화 배지에 첨가되는 식물생장조절물질의 종류와 농도에 따른 배양효과를 규명하기 위하여 auxin류로 2,4-D, dicamba 및 NAA, cytokinin류로 BA와 kinetin을 다양한 농도와 조합으로 혼용 첨가한 배지에 캘러스를 치상하여 24±2°C, 16 h light/8 h dark 조건에서 3주간 배양하고 동일성분의 새 배지에 계대한 후 3주간 더 배양하여 각각의 처리구에서 1 cm 이상으로 자란 싹을 재분화 개체로 조사하였다. 재분화된 싹은 식물생장조절물질이 포함되지 않은 1/2 MS 배지에 이식하여 뿌리발생을 유도하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 화분에 이식하여 온실에서 재배하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 성숙종자로부터 캘러스 유도에 있어서 식물생장조절물질의 첨가효과

갈대의 종자배양에 있어서 캘러스 유도배지에 첨가되는 식물생장조절물질의 종류와 농도에 따른 효과를 규명하고자 2,4-D와 dicamba, NAA를 각각 0~5 mg/L의 농도로 단용 처리한 후 캘러스 유도효율을 조사해 본 결과는 Table 1과 같다. 종자로부터의 캘러스 유도효율은 2,4-D와 dicamba 처리구가 NAA 처리구 보다 높게 나타났다. 대부분의 화분과 식물의 경우에는 낮은 농도 (0~1 mg/L) 보다는 오히려 높은 농도 (1 mg/L 이상)의 2,4-D가 캘러스 형성에

효과적이라고 보고된 바 있으나 (Sopory and Munshi, 1997) 본 실험의 경우 2,4-D를 1 mg/L 농도로 첨가해 주었을 때 86.4%의 가장 높은 캘러스 유도효율을 나타내었으며 2,4-D 첨가농도가 높아질수록 캘러스 유도 효율이 감소하는 경향을 보였다. Dicamba 처리구의 경우는 0.5 mg/L 농도로 첨가해 주었을 때 60.7%로 캘러스 유도효율을 나타내었다. NAA 처리구는 전체적으로 캘러스 유도효율이 매우 저조하게 나타났다.

Table 1. Effect of auxin (2,4-D, dicamba, NAA) on callus formation from mature seed of reed

Growth regulators (mg/L)	No. of seeds cultured	Callus induction (%)
2,4-D	0	0
	0.5	70.7
	1	86.7
	3	60.7
	5	51.3
Dicamba	0	0
	0.5	60.7
	1	55.3
	3	48.7
	5	42.0
NAA	0	0
	0.5	5.3
	1	3.3
	3	2.7
	5	1.3

또한 auxin 단용 처리구에서 가장 높은 효율을 보였던 1.0 mg/L 2,4-D 처리구와 두 번째로 높은 효율을 보였던 0.5 mg/L dicamba 처리구에 각각 0.3~0.5 mg/L의 BA와 kinetin을 혼용 처리했을 때의 캘러스 유도효율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 1 mg/L 2,4-D와 cytokinin류를 혼용처리했을 때의 캘러스 유도 효율은 0.5 mg/L BA를 혼용처리 하였을 때 88.7%로

Table 2. Effect of combined treatment of auxins with cytokinins in callus induction from mature seeds of reed

Growth regulators (mg/L)	No. of seeds cultured	Callus induction (%)	
2,4-D 1	BA		
	0	150	84.7
	0.3	150	85.3
	0.5	150	88.7
	1	150	80.0
	Kinetin		
	0	150	82.0
	0.3	150	81.3
	0.5	150	82.0
	1	150	75.3
Dicamba 0.5	BA		
	0	150	60.7
	0.3	150	62.0
	0.5	150	66.0
	1	150	65.3
	Kinetin		
	0	150	62.0
	0.3	150	60.7
	0.5	150	61.3
	1	150	58.0

가장 높았으며 0.5 mg/L dicamba와 cytokinin류 혼용처리구의 경우도 0.5 mg/L BA와 혼용처리하였을 때 66%로 높게 나타났다.

이상의 Table 1과 2의 결과를 종합해보면, 전체적으로 auxin로는 2,4-D와 dicamba가 NAA에 비해 높은 캘러스 유도효율을 나타내었으며, auxin류의 단용처리보다 1.0 mg/L의 2,4-D와 cytokinin류인 BA의 혼용처리가 캘러스 유도에 가장 효율적인 것으로 판단되었다. 따라서 갈대 성숙종자로부터 캘러스를 유도함에 있어 캘러스 유도배지에는 1.0 mg/L의 2,4-D와 0.5 mg/L BA의 혼용 처리하여 사용하였다.

## 2. 캘러스로부터 식물체 재분화

갈대의 성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체 재분화를 위한 적정 식물생장 조절물질의 종류와 농도를 조사하기 위하여 1.0 mg/L의

2,4-D와 0.5 mg/L BA 혼용처리하여 얻은 캘러스를 cytokinin류인 BA와 kinetin이 다양한 농도로 첨가된 MS 재분화 배지에 옮겨 배양한 후, 식물체 재분화율을 조사하였다 (Table 3). 캘러스로부터 식물체 재분화에는 cytokinin류가 첨가되지 않은 배지에서 캘러스 재분화율이 56~59.6%로 높게 나타났다. 또한 kinetin 보다는 BA에서 재분화율이 조금 더 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 두 종류의 cytokinin의 농도가 증가할수록 재분화율은 감소하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과는 캘러스로부터 재분화를 통한 신초형성에는 cytokinin류의 첨가 배지가 더 효율적이라는 다른 화분과 작물의 결과와 상반되는 결과이다 (이 등, 2003; 2005a; 2005b; 2007). 따라서 갈대의 효율적인 재분화를 위한 적정 식물생장조절물질의 처리는 캘러스 유도시에는 1.0 mg/L의 2,4-D와 0.5 mg/L BA의 혼용으로 첨가해주어 재분화효율이 우수한 캘러스를 형성시키고, 이 캘러스를 BA와 kinetin이 첨가되지 않은 MS 배지에서 배양함으로써 59% 이상의 높은 재분화율을 얻을 수 있을 것으로 판단된다. 이와 같은 높은 재분화율은 효율적인 형질전환시스템 확립에 매우 유용하게 이용 될 수 있을 것이다.

본 실험을 통하여 갈대에 있어서 식물생장조절물질의 종류가 캘러스 유도와 캘러스로부터 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사하였다.

Table 3. Effect of cytokinin (kinetin, BA) on callus regeneration from mature seed-derived callus of reed

Growth regulators (mg/L)	No. of calli cultured	Plant regeneration (%)
Kinetin	0	56.0
	1	38.0
	3	8.0
BA	0	59.3
	1	43.3
	3	11.3

갈대의 성숙종자를 1.0 mg/L의 2,4-D와 0.5 mg/L BA의 혼용으로 첨가된 캘러스 유도배지에 배양했을 때, 배양 7일째부터 캘러스가 형성되기 시작하여 5주 후에는 80% 이상이 형성되었으며 (Fig. 1a), 이들 캘러스 (Fig. 1b)를 BA와 kinetin이 첨가되지 않은 식물체 재분화 배지에 이식했을 때 배양 5주 후에는 59% 이상의 캘러스에서 신초가 재분화 되었다 (Fig. 1c). 재분화된 신초는 1/2 MS 배지로 구성된 rooting 배지에서 2주간 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 화분에 이식하여 온실에서 재배할 수 있었다 (Fig. d). 본 연구를 통하여 갈대의 성숙종자로부터 캘러스를 유도하고, 이들로부터 식물체를 재분화시킬 수 있는 고효율 재분화 체계를 확립하였다. 이와 같은 고효율 재분화 시스템은 갈대로의 유전자 도입에 필요한 형질전환시스템 확립에 있어서 매우 유용한 자료로 활용될 수 있을 것이며, 다른 비식용 화분과 작물의 형질전환을 위한 자료로도 활용될 수 있을 것이다. 나아가 유용유전자의 형질전환을 통한 국내 자생 갈대의 분자육종은

장차 새로운 신품종 바이오 에너지 갈대자원의 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

#### IV. 요약

갈대의 성숙종자로부터 최적 조직배양조건을 확립하기 위하여 종자로부터 캘러스 유도 및 식물체 재분화 체계를 확립하였다. 종자로부터 캘러스 유도시 첨가되는 auxin으로는 2,4-D가 가장 효율적이었으며, 1.0 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L BA가 첨가된 MS 배지에서 가장 높은 빈도로 캘러스가 유도되었다. 캘러스로부터 식물체 재분화는 cytokinin류인 BA와 kinetin이 첨가되지 않은 MS 배지에서 59.6%로 높은 재분화 효율을 나타내었다. 본 연구를 통하여 확립된 성숙종자로부터의 고효율 재분화 시스템은 유전자 형질전환기술을 이용한 신품종 갈대 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

#### V. 사 사

본 연구는 KRIBB 기관 고유사업의 연구비 지원 (과제번호: KGM0531113) 및 농촌진흥청 농업 현장대응사업의 연구비지원 (과제번호: 2009010 FT12 3475088) 및 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업 (과제번호: PJ008139)의 지원에 의해 수행되었습니다. 김용구와 김경희는 경상대학교 BK21 장학금 지원을 받아 연구를 수행하였습니다.

#### VI. 인용 문헌

1. 이상훈, 이동기, 김진수, 이병현. 2003. 오차드그래스 성숙종자로부터 캘러스 유도 및 고효율 식물체 재분화. 한국식물생명공학회지 30(4):341-346.
2. 이기원, 이상훈, 이동기, 우현숙, 김도현, 최명석, 김기용, 이효신, 이병현. 2005a. 오차드그래스의 종자배양에 있어서 식물생장조절물질과 항산화제가 캘러스 유도와 식물체 재분화에 미치는 영

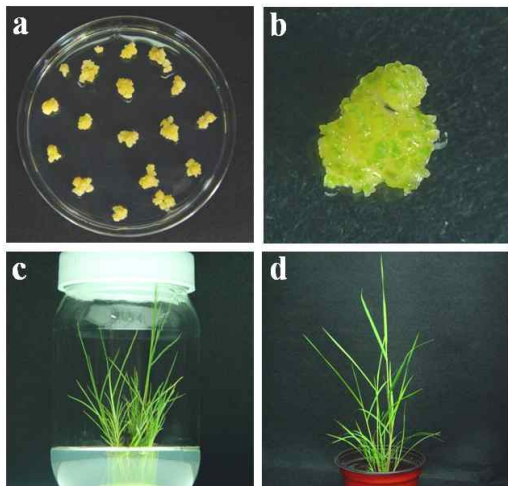


Fig. 1. Plant regeneration from seed-derived callus of reed. a: Callus induction from mature seed of reed. b: Representative embryogenic callus. c: Rooting of regenerated plantlets. d: Regenerated plants grown in pot.

- 향. 한국초지학회지. 25:191-198.
3. 이기원, 이상훈, 이동기, 우현숙, 김도현, 최명석, 원성혜, 서 성, 이병현. 2005b. 켈터기 블루그래스에 있어서 켈러스 배양 및 식물체 재분화에 미치는 요인의 영향. 한국동물자원과학회지 47 (6):1067-1074.
  4. 이기원, 이동기, Nagib Ahsan, 원성혜, 이상훈, 김기용, 이병현. 2007. 식물생장조절물질이 페레니얼 라이그래스 (*Lolium perenne* L.)의 켈러스 유도 및 식물체 재분화에 미치는 영향. 한국초지학회지. 27:235-240.
  5. 한성욱. 2007. Biochemistry and Molecular biology News. 9월호. pp. 8-9.
  6. Anonymous. 1969. Wealth of indica-raw materials, Vol 8, Council of scientific and industrial research, New Delhi, India. pp 32-34.
  7. Denis L., Sylvain D. and G. Vincent. 2000. *In vitro* propagation of reed grass by somatic embryogenesis. 60:229-234.
  8. Forster, J.W. and G. Spangenberg. 1999. Forage and turf grass biotechnology: principles, methods and prospects In: Setlow, J.K. (Eds.), Genetic engineering: principles and methods. Kluwer Academic Publishers, New York, pp. 21:191.
  9. George, E.F., Puttock, D.J.M. and H.J. George. 1987. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant growing *in vitro*. Plant Cell Tissue Org. Cult. 30(4):171-179.
  10. Poonamala, I.S., Jana, M.M. and R.S. Nadgauda. 1999. Factors influencing bud break and rooting and mass-scale micropropagation of three *Phragmites* species: *P. karka*, *P. communis* and *P. australis*. Plant cell reports 18:696-700.
  11. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 15:473-497.
  12. Mckee, J, and A.J. Richards. 1996. Variation in reed production and germinability in common reed (*Phragmites australis*) in Britain and France with respect to climate. New Phytol. 133:233-243.
  13. Negri, M.C. 1996. Plants that remove contaminants from the environment. Lab. Med. 27: 36-39.
  14. Sopory S.K and M. Munshi. 1997. Anther culture. In: Jain S.M., Sopory S.K., Veilleux R. E. (eds) *In Vitro* haploid production in higher plants. Kluwer academic publishers, Netherlands. pp. 145-176.
  15. Spangenberg, G., Wang, Z.Y. and Potrykus. 1998. Biotechnology in forage and turf grass improvement. Frankel, R. and E. Galunl. Monographs on theoretical and applied genetics. Springer Verlag, Heidelberg. 23:192-221.
  16. Ye, Z.H., Wong, M.H., Baker, J.M. and A.J. illis. 1998. Comparison of biomass and metal uptake between two populations of *Phragmites australis* grown in flooded and dry conditions. Ann. Bot. 82:83-87.
- (접수일: 2011년 7월 6일, 수정일 1차: 2011년 7월 15일, 수정일 2차: 2011년 7월 29일, 게재확정일: 2011년 8월 8일)