

# 억새(*Miscanthus sinensis*) 성숙 종자로부터의 캘러스 유도 및 식물체 재분화 체계 확립

조준형\*, 변지희

동국대학교 바이오환경과학과

## Establishment of Callus Induction and Plant Regeneration System from Mature Seeds of *Miscanthus sinensis*

Joon-Hyeong Cho\* and Ji-Hui Byeon

Department of Biological and Environmental Science, Dongguk University, Seoul 100-175, Korea

**Abstract** - This study was conducted to establish the tissue culture system for Korean domestic *Miscanthus sinensis*, which is used in various purposes such as forage, and bio-energy resources. With the mature seed of *Miscanthus*, optimum concentrations of plant growth regulators were identified for an efficient callus induction and regeneration. Among the treatments of 1~10 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D, IBA, or NAA, callus induction rate was highest (85.3%) on MS medium containing 5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D. Under the condition, the callus were efficiently induced and proliferated with comparably lower frequencies of callus browning. In shoot regeneration, the treatment of NAA combined with BAP seemed to contribute more efficient conditions to shoot regeneration than those of NAA with Kinetin or 2-iP. Especially, regeneration efficiency and number of regenerated plants were 83.7% and 5.5 in 3 mg·L<sup>-1</sup> NAA with 5 mg·L<sup>-1</sup> BAP, respectively, which were higher frequencies than those in NAA with Kinetin or 2-iP. In results, 5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D and 3 mg·L<sup>-1</sup> NAA combined with 5 mg·L<sup>-1</sup> BAP were efficient for embryogenic callus induction and regeneration of *Miscanthus*. This system would be useful for mass-propagation and developing new cultivars via tissue culture of *Miscanthus sinensis*.

**Key words** - Callus induction, Plant regeneration, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D),  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA), 6-benzylaminopurine (BAP)

### 서 언

억새(*Miscanthus sinensis*)는 분류학적으로 벼목(*Graminales*) 벼과(*Gramineae*) 억새속(*Miscanthus*)에 속하는 다년생 C4식물로 우리나라 전역의 산과 들 또는 물가에 흔히 자생하는 식물이다. 억새는 식물 종간의 형태적 유사성, 높은 자연교잡율과 그에 따른 배수성 및 다양한 형태적 변이로 인해 분류에 있어서 학자 간 이견이 많으나, 전 세계적으로 약 20여종이 분포하는 것으로 보고되고 있다(장, 2011). 국내 억새자원에 관하여는 Nakai가 6종을 처음 보고하였으며(Nakai, 1909), 최근 김(2008)은 “한국의 야생화와 자원식물” 도감에 억새, 물억새, 억새아재비 등

3개의 식물명에 11종을 기록하고 있다.

억새는 사료용뿐 만 아니라 이노작용과 해열에 효과가 있어 한방자원으로 이용되며, 뿌리가 강건하고 수분이용률이 높아 영양염류의 함량이 낮거나 중금속 함량이 높은 토양조건에서도 잘 자라서, 토양오염정화용, 침식방지용, 생태계 복원용, 도시녹화용 등 환경산업에도 이용된다. 또한 억새는 건물수량이 ha 당 20~40톤으로 척박한 토양조건에서 바이오매스의 생산량이 높아 최근 바이오에탄올 생산을 위한 원료로서도 활용 가치가 매우 높다(Clifton-Brown *et al.*, 2004).

바이오에탄올 생산을 위한 식물 원료로는 사탕수수나 옥수수 등과 같은 당질작물과 전분작물이 주로 이용되어 왔는데, 이들 작물의 산업적 이용은 식량자원의 전용이라는 점에서 식품원료 및 곡물가격의 상승을 초래하는 문제점이 제

\*교신저자(E-mail) : jhcho@dongguk.edu

기되어왔다. 그러나 사료 및 바이오에너지 원료로서의 억새 이용은 인류식량과 경쟁적이라는 점에서 윤리적 문제에서 자유로울 수 있으며, 축산 및 친환경 에너지산업분야가 농업에 미치는 영향을 최소화할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

식물바이오매스를 사료용 및 바이오에탄올원료용으로 이용하기 위해서는 낮은 리그닌 함량과 높은 셀룰로오스 함량을 요구하는데, 억새의 경우 리그닌 함량이 높아 가축의 소화효율을 저하시킬 뿐만 아니라 셀룰로오스의 당화에 의한 에탄올 생산효율을 감소시켜 실용화에 제약이 있다(Lewandowski *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2009). 따라서 비 식량자원식물 바이오매스의 실용화에 산업적 가치를 높이기 위해서는 리그닌 함량이 낮은 억새자원의 개발 및 대량 증식체계의 개발이 요구된다. 이미 일본과 유럽 여러 나라에서는 억새의 환경오염개선 및 바이오에너지 원료로서의 가치로 인해 억새 바이오매스의 안정적 공급을 위한 대량 생산 연구가 시작된 반면 우리나라의 경우 비교적 최근인 2009년부터 농촌진흥청 바이오에너지작물센터를 중심으로 억새 바이오에너지자원 확보에 착수 하였다(Lewandowski *et al.*, 2000; Clifton-Brown *et al.*, 2008; Moon *et al.*, 2010).

억새자원의 증식 및 신품종 육성을 위해서는 캘러스 유도 및 재분화 식물체의 효율적 생산을 위한 조직배양 기술이 확립되어야 한다. 식물조직배양기술은 유용식물자원의 증식은 물론 식물 품종개발을 위한 돌연변이 육종과 형질 전환기술을 이용한 신품종 육종의 기반기술로 활용될 수 있어, 지속적이고 안정적인 식물바이오매스의 대량생산 및 산업적 이용에 필요한 기술이다. 억새와 같은 단자엽 식물의 모델식물인 벼의 경우, 성숙종자를 이용한 배발생 캘러스의 유도 및 캘러스로부터의 재분화 식물체 생산이 일반적인데, 이는 다양한 유전자를 도입한 식물형질전환 품종 개발에 활용되고 있다.

억새와 같은 과에 속하는 수수(*Sorghum bicolor* L.), 옥수수(*Zea mays* L.), 들잔디(*Zoysia japonica*), 페레니얼 라이그래스(*Lolium perenne* L.) 등 다양한 벼과 식물의 경우 자원 증식 및 품종개발을 위한 조직배양연구가 이미 수행된 반면, 국내 억새자원에 대한 조직배양 연구는 미미한 실정이다(Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2010). 억새 조직배양연구의 경우 미성숙화서, 정단조직, 잎, 뿌리 조직을 이용한 재분화 연구가 보고된 바 있으나, Park *et al.*(2009)은 성숙된 억새종자로부터의 캘

러스 유도 및 재분화가 매우 효율적이었다고 보고하였다.

따라서 본 연구는 국내 억새자원의 대량증식, 조직배양 기술과 형질전환기술을 기반으로 한 품종개발을 목적으로 억새의 성숙종자로부터 캘러스 유도 및 식물체 재분화 체계 확립을 위한 식물생장조절제 이용 조건을 구명코자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 공시재료 및 멸균

본 연구의 공시재료로는 경기도 여주군 가남면에서 자생하는 억새의 성숙종자를 채취하여 사용하였다. 종피가 제거된 억새종자를 70% 에탄올에 4분간 침지한 후 50 µl Tween 20이 포함된 2%(w/v) 차아염소산나트륨 30 ml에 3분간 2회 성숙종자의 표면을 살균하였으며, 표면 살균된 종자는 멸균수로 3회 세정하였다. 위와 같은 종자의 살균 과정은 2회 반복하였다. 표면살균종자는 멸균된 여과지에 옮겨 수분을 제거 한 후, 캘러스 유도배지에 치상하였다.

### 캘러스의 유도

억새의 멸균된 성숙 종자로부터 배발생 캘러스를 유도하기 위한 기본배지로는 MS(Murashige and Skoog, 1962) 고체배지를 이용하였다. 배지의 조제를 위해 MS다량원소와 미량원소 및 비타민을 혼합한 후 탄소원으로 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose를 그리고 고형물질로는 2.5 g·L<sup>-1</sup> phytagel을 첨가하였으며, 배지용액의 pH를 5.8로 맞춘 후 121°C에서 20분간 고압 멸균하였다. 멸균배지는 직경 10 cm 1회용 배양접시에 분주하여 캘러스 유도를 위한 성숙 종자의 배양에 이용하였다. 억새 성숙종자로부터의 캘러스 유도 시 식물생장조절제의 종류 및 농도가 캘러스 유도 효율에 미치는 영향을 구명하기 위해 3종의 옥신류인 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid), IBA(Indole-3-butyric acid), NAA(α-naphthaleneacetic acid)를 각각 1, 3, 5, 10 mg·L<sup>-1</sup> 농도로 단용 처리하였다. 식물생장조절제가 포함된 각 고형배지에 멸균종자를 치상한 후 25 ± 2°C, 2500 Lux 광조건의 배양실에서 16시간 광주기로 명배양하였으며, 2주간격으로 계대배양 하여 총 4주간 배양하였다. 캘러스 유도율은 성장조절제 농도별 처리 당 3반복으로 하였으며, 치상 종자 수 대비 캘러스 유도 종자수를 백분율로 계산한 후 평균을 조사하여 비교하였다.

### 식물체의 재분화

역세의 성숙종자로부터 가장 효과적인 조건하에서 유도된 캘러스를 식물체 재분화를 위한 재료로 사용하였다. 역세 캘러스의 식물체 재분화를 위한 배지로는 캘러스 유도배지와 동일한 30 g·L<sup>-1</sup>의 sucrose와 2.5 g·L<sup>-1</sup>의 phytagel이 포함된 MS 고체배지(pH 5.8)를 기본배지로 이용하였다. 식물생장조절제의 종류 및 농도가 역세 성숙종자 유래 캘러스의 재분화 효율에 미치는 영향을 구명하기 위해 2,4-D 5 mg·L<sup>-1</sup>가 포함된 MS배지에서 4주간 명배양된 캘러스를 옥신인 NAA와 사이토키닌류인 BAP(6-benzylaminopurine), 2-iP(2-isopentyladenine), Kinetin(6-furfurylaminopurine) 등이 혼용된 배지에 치상하였다. NAA와 BAP, 2-iP, Kinetin을 각각 1, 3, 5 mg·L<sup>-1</sup> 농도로 혼용한 배지에 역세 성숙종자 유래 캘러스를 치상하여 25 ± 2°C, 2500 Lux 광조건의 배양실에서 16시간 광주기로 5주간 명배양하였다. 캘러스의 재분화 효율은 식물체 치상캘러스 수에 대한 재분화 캘러스 수를 백분율로 나타내었으며, 3반복으로 조사하여 재분화 효율을 비교하였다. 재분화된 2~3 cm 크기의 식물체는 식물생장조절제가 포함되지 않은 MS배지에 이식 한 후 동일 조건 하에서 뿌리를 유도하였다. 최소 5 cm 이상 생장한 식물체는 25 ± 2°C, 2500 Lux 조건의 배양실에서 0.2% Hyponex(N-6:P-10:K-5)용액을 이용하여 1주일간 순화한 후 포트에 이식하였다.

### 결과 및 고찰

#### 식물생장조절제의 종류와 농도에 따른 캘러스 유도효율

식물생장조절제 종류 및 농도가 역세 성숙종자로부터의 캘러스 유도효율에 미치는 영향을 구명하기 위해 1, 3, 5, 10 mg·L<sup>-1</sup> 농도의 2,4-D, NAA, IBA를 단용 처리한 MS 배지에 멸균된 역세 성숙종자를 치상하였다. 역세 종자 발아율은 모든 처리구에서 94.8%~99.0%의 발아율을 보여 조직배양에 이용한 역세 성숙종자의 발아력은 안정적인 것으로 보이며(Fig. 2A), 식물생장조절제의 종류 및 농도에 따른 종자발아율 간의 유의성은 없었다. 그러나 캘러스 유도율에 있어서는 식물생장조절제의 종류 및 농도에 따라 큰 차이를 보였다(Table 1). 식물생장조절제의 종류에 따른 처리에서는 NAA와 IBA의 경우 각각 10.0%~50.1%와 9.3%~19.3%의 캘러스 유도율을 보인 반면, 2,4-D의 농도별 처리의 경우 69.0%~85.3%의 통계적으로 유의성 있

는 높은 캘러스 유도율을 보여 NAA와 IBA 보다 캘러스 유도에 가장 효과적이었다(Fig. 2B).

IBA 처리의 경우 1 mg·L<sup>-1</sup>와 3 mg·L<sup>-1</sup>의 농도처리에서는 캘러스가 유도되지 않았으며, 5 mg·L<sup>-1</sup>와 10 mg·L<sup>-1</sup> 농도 처리구에서 각각 9.3%와 19.3%의 비교적 낮은 캘러스 유도율을 보였을 뿐만 아니라 싹과 뿌리가 동시에 유도되는 경향을 보였다. Cho *et al.*(2003)은 단자엽 식물인 벼의 경우 호르몬 처리에 의한 캘러스 유도 시 뿌리가 형성되는 경우 배발생 캘러스의 형성이 어렵다고 하였다. 조직배양의 진행에 따른 캘러스 갈변화는 IBA가 2,4-D 또는 NAA 처리구보다 높았으며, 모든 종류의 식물생장조절제 처리에서 처리농도가 증가 할수록 캘러스의 갈변율도 증가하는 경향을 보였다.

NAA처리에서는 농도의 증가에 따라 캘러스 유도율이 증가하는 경향을 보이는데, 10 mg·L<sup>-1</sup> 농도에서 50.1%로 높은 캘러스 유도율을 보였으나, 2,4-D의 효율에 미치지 못하였다. 또한 NAA의 처리는 IBA 처리에 비해 높은 캘러스 유도율을 보이지만, 농도의 증가에 따른 캘러스 갈변화율 역시 증가하는 경향이였다(Table 1).

2,4-D 처리구의 캘러스 유도율은 69.0%~85.3%로 IBA와 NAA처리구보다 높았으며, 유도된 캘러스의 생장역시 가장 원활하였다(Fig. 2B, Table 1). 2,4-D 농도별 처리에 따른 캘러스 유도율을 비교한 결과, 처리농도가 증가할수록 캘러스 유도율이 증가하는 경향을 보여 5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 농도처리에서 85.4%로 가장 효과적인 캘러스 유도율을 나타내었다. 또한 5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 처리에서 배양 4주 후 종자 당 캘러스 생체중이 51.0 mg으로 조사되어 1 mg·L<sup>-1</sup>과 3 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 처리구의 34 mg과 47 mg보다 높은 캘러스 생체중을 보여 캘러스의 증식이 원활하였다(Fig. 1). 그러나, 10 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 처리구에서는 5 mg·L<sup>-1</sup>의 처리구에 비해 캘러스 유도율 및 캘러스 생체중이 다소 감소하는 것으로 나타났으며, 캘러스 유도율과 종자 당 캘러스생체중은 각각 69.0%와 41 mg으로 조사되었다. 조직배양기간 중 캘러스의 갈변율은 다른 식물생장조절제의 처리와 마찬가지로 2,4-D의 농도가 높아질수록 증가하는 경향을 보였지만 IBA, NAA 처리구에 비해서는 각각 평균 8.9%와 13.9% 정도 낮은 수준으로 조직배양기간동안 캘러스 생장이 가장 양호하였다(Table 1).

본 연구결과 역세 완숙종자의 캘러스 유도에는 5 mg·L<sup>-1</sup> 농도의 2,4-D처리가 가장 효과적이었으며, 그 다음이

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

Auxins (mg·L <sup>-1</sup> )	No. of seedstransferred	Seeds germination (%)	Callus induction (%) <sup>Y</sup>	Browning (%)	
2,4-D	1	150	99.0 <sup>az</sup>	78.2 ± 4.9 <sup>a</sup>	5.2 <sup>d</sup>
	3	150	97.9 <sup>a</sup>	80.1 ± 4.1 <sup>a</sup>	10.2 <sup>cd</sup>
	5	150	99.0 <sup>a</sup>	85.3 ± 7.5 <sup>a</sup>	10.4 <sup>cd</sup>
	10	150	96.9 <sup>a</sup>	69.0 ± 9.5 <sup>a</sup>	16.6 <sup>abc</sup>
NAA	1	150	96.9 <sup>a</sup>	10.0 ± 6.0 <sup>c</sup>	12.5 <sup>bcd</sup>
	3	150	96.9 <sup>a</sup>	28.5 ± 2.4 <sup>cd</sup>	13.5 <sup>bc</sup>
	5	150	95.8 <sup>a</sup>	44.8 ± 3.4 <sup>bc</sup>	19.8 <sup>ab</sup>
	10	150	94.8 <sup>a</sup>	50.1 ± 8.8 <sup>b</sup>	21.9 <sup>a</sup>
IBA	1	150	92.7 <sup>a</sup>	-	18.8 <sup>ab</sup>
	3	150	97.9 <sup>a</sup>	-	21.9 <sup>a</sup>
	5	150	96.9 <sup>a</sup>	9.3 ± 3.9 <sup>c</sup>	22.9 <sup>a</sup>
	10	150	95.8 <sup>a</sup>	19.3 ± 1.6 <sup>dc</sup>	24.0 <sup>a</sup>

<sup>Y</sup>Values represent the mean ± standard errors (SE) of three independent experiments.

<sup>Z</sup>Mean Separation in columns by Duncan's multiple range test, *p*=0.05.

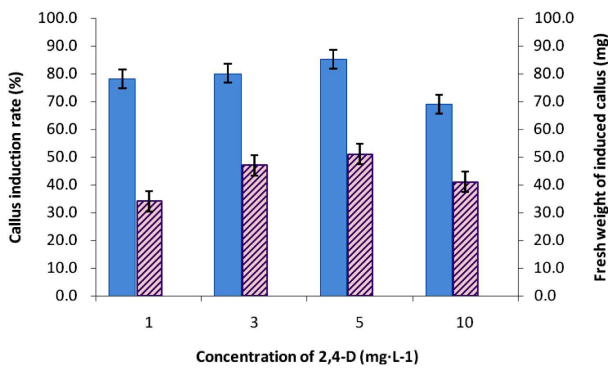


Fig. 1. Frequency of callus induction and fresh weight of embryogenic calli from mature seeds of *Miscanthus sinensis*.

Average of Callus induction rate (%), Fresh weight of induced embryogenic callus (mg)

NAA와 IBA 순이었다. 또한 농도별 처리에 있어서는 처리된 3종의 식물생장조절제 모두 농도가 증가할수록 캘러스 유도율이 증가하는 경향을 보이지만, 배양기간의 진행에 따른 캘러스의 갈변화율 역시 증가하는 경향을 보였고, IBA의 경우 1 mg·L<sup>-1</sup>과 3 mg·L<sup>-1</sup>의 저농도 처리에서는 캘러스가 유도되지 않았다.

식물조직배양은 종자, 잎, 뿌리, 줄기, 액아, 화퇴 등의 다양한 조직체 절편으로부터 직접 싹을 유도하는 기관분화법(organogenesis)과 분화전능성을 갖는 배발생 캘러스를 유도하는 배발생법(embryogenesis)이 있다. 단자엽 식물의 모델인 벼의 경우 완숙종자로부터 배발생 캘러스를 유도하여 재분화를 위한 재료로 사용하는 것이 일반적인

데, 캘러스의 유도는 배양 식물의 종류, 처리된 성장조절제의 종류 및 농도에 따라 양상이 다양하지만 벼의 경우 2 mg·L<sup>-1</sup>의 2,4-D가 배발생 캘러스의 유도에 일반적으로 이용된다(Cho *et al.*, 2003). Holme and Peterson(1996)과 Park *et al.*(2009)은 억새의 캘러스 유도 시 2,4-D가 효과적이었다고 보고하여 본 연구결과와 일치하였으나, Lee *et al.* (2007)은 동과 식물인 페레니얼 라이그래스의 캘러스 배양에 2,4-D보다 NAA 처리에서 높은 캘러스 유도율을 보인다고 보고하여 배양식물의 종류 및 식물생장조절제의 종류에 따라 캘러스 유도양상이 다른 것으로 사료된다.

또한 Park *et al.*(2009)은 2,4-D를 이용한 억새 완숙종자의 캘러스 유도 시 3 mg·L<sup>-1</sup> 농도가 가장 효율적이었다고 보고하였으며, Holme and Peterson(1996)은 억새 중 *Miscanthus x ogiformis*의 캘러스배양 결과 3 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D의 사용이 캘러스 유도에 효율적일 뿐만 아니라 배양기간 중 갈변율이 낮다고 보고하였다. 그러나 본 연구결과 *Miscanthus sinensis*의 경우 3 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D보다 5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 조건에서 캘러스 유도에 효율적이고 생체중이 높은 경향을 나타냈다. 따라서 *Miscanthus sinensis* 성숙종자의 캘러스 유도에 효율적인 식물생장조절제의 종류는 2,4-D가 적합하며 농도는 5 mg·L<sup>-1</sup>가 가장 효과적일 것으로 판단된다. 따라서 이 후 캘러스를 이용한 재분화 실험은 5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D를 단용 처리하여 4주 간 배양한 캘러스를 사용하였다.

**캘러스로부터 식물체 재분화 효율**

식물생장조절제의 종류 및 농도가 캘러스의 재분화에 미치는 영향을 구명하기위해 5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D를 단용 처리하여 4주 간 배양한 성숙종자 유래 캘러스를 옥신인 NAA와 Kinetin, BAP 및 2-iP 등의 사이토키닌을 각각 1, 3, 5 mg·L<sup>-1</sup> 농도로 혼용 처리한 MS 배지에 치상하였다(Fig. 2C).

NAA, Kinetin, 2-iP 그리고 BAP를 혼용처리한 배지에서 각각 19.0%~59.0%, 23.0%~67.3%, 14.7%~83.7%의 재분화율을 보여 NAA와 BAP의 혼용처리구가 NAA와

Kinetin 또는 2-iP와 혼용 처리한 결과보다 역새 성숙종자 유래 캘러스의 식물체 재분화에 효과적이었다(Table 2, Table 3, Table 4).

NAA와 Kinetin을 혼용 처리한 MS 배지 상에서 캘러스로부터의 재분화 효율은 19.0%~59.0% 수준이었으며, 3 mg·L<sup>-1</sup> NAA와 5 mg·L<sup>-1</sup> Kinetin을 혼용한 배지에서 59.0%의 캘러스로부터 신초가 출현하여 동일 식물생장조절제의 농도별 혼용처리 간에 가장 높은 재분화율을 나타내었다(Table 2). NAA의 농도 1 mg·L<sup>-1</sup> 또는 3 mg·L<sup>-1</sup>과 Kinetin

Table 2. Effect of NAA in combination with kinetin on plants regeneration of the calli induced from mature seeds of *Miscanthus sinensis*.

Growth regulators (mg·L <sup>-1</sup> )		No. of calli transferred	Plant regeneration (%) <sup>Y</sup>	No. of average of regenerated plants
NAA	kinetin			
1	1	96	19.0 ± 11.0 <sup>z</sup>	2.3 <sup>a</sup>
	3	96	37.7 ± 6.2 <sup>abc</sup>	1.0 <sup>ab</sup>
	5	96	52.3 ± 8.3 <sup>ab</sup>	2.2 <sup>a</sup>
3	1	96	9.0 ± 4.0 <sup>c</sup>	1.0 <sup>ab</sup>
	3	96	34.0 ± 15.0 <sup>abc</sup>	2.4 <sup>a</sup>
	5	96	59.0 ± 9.3 <sup>a</sup>	2.0 <sup>a</sup>
5	1	96	39.7 ± 12.4 <sup>abc</sup>	2.0 <sup>a</sup>
	3	96	39.7 ± 2.2 <sup>abc</sup>	1.0 <sup>ab</sup>
	5	96	21.3 ± 11.2 <sup>bc</sup>	2.0 <sup>a</sup>

<sup>Y</sup>Values represent the mean ± standard errors (SE) of three independent experiments.

<sup>Z</sup>Mean Separation in columns by Duncan's multiple range test, *p*=0.05.

Table 3. Effect of NAA in combination with 2-iP on plants regeneration of the calli induced from mature seeds of *Miscanthus sinensis*.

Growth regulators (mg·L <sup>-1</sup> )		No. of calli transferred	Plant regeneration (%) <sup>Y</sup>	No. of average of regenerated plants
NAA	2-iP			
1	1	96	23.0 ± 7.2 <sup>bz</sup>	1.0 <sup>c</sup>
	3	96	41.3 ± 14.7 <sup>ab</sup>	3.8 <sup>ab</sup>
	5	96	33.3 ± 5.6 <sup>ab</sup>	4.0 <sup>a</sup>
3	1	96	42.0 ± 7.8 <sup>ab</sup>	2.8 <sup>bc</sup>
	3	96	46.0 ± 18.0 <sup>ab</sup>	2.9 <sup>bc</sup>
	5	96	44.0 ± 25.4 <sup>ab</sup>	2.1 <sup>bc</sup>
5	1	96	50.3 ± 6.2 <sup>ab</sup>	1.0 <sup>c</sup>
	3	96	60.7 ± 5.6 <sup>ab</sup>	3.8 <sup>ab</sup>
	5	96	67.3 ± 4.3 <sup>a</sup>	5.8 <sup>a</sup>

<sup>Y</sup>Values represent the mean ± standard errors (SE) of three independent experiments.

<sup>Z</sup>Mean Separation in columns by Duncan's multiple range test, *p*=0.05.

Table 4. Effect of NAA in combination with BAP on plants regeneration of the calli induced from mature seeds of *Miscanthus sinensis*.

Growth regulators (mg·L <sup>-1</sup> )		No. of calli transferred	Plant regeneration (%) <sup>Y</sup>	No. of average of regenerated plants
NAA	BAP			
1	1	96	52.7 ± 13.4 <sup>az</sup>	3.0 <sup>bc</sup>
	3	96	69.0 ± 16.4 <sup>a</sup>	5.1 <sup>ab</sup>
	5	96	62.3 ± 3.8 <sup>a</sup>	7.0 <sup>a</sup>
3	1	96	65.0 ± 2.0 <sup>a</sup>	3.1 <sup>bc</sup>
	3	96	73.0 ± 2.0 <sup>a</sup>	2.7 <sup>c</sup>
	5	96	83.7 ± 5.5 <sup>a</sup>	5.5 <sup>ab</sup>
5	1	96	54.3 ± 11.8 <sup>a</sup>	3.0 <sup>bc</sup>
	3	96	56.3 ± 7.2 <sup>a</sup>	5.5 <sup>ab</sup>
	5	96	14.7 ± 8.7 <sup>b</sup>	7.8 <sup>a</sup>

<sup>Y</sup>Values represent the mean ± standard errors (SE) of three independent experiments.

<sup>Z</sup>Mean Separation in columns by Duncan's multiple range test, *p*=0.05.

농도가 1 mg·L<sup>-1</sup>로 낮게 혼용 처리된 배지에서의 재분화율이 19.0%로 가장 낮았으나, Kinetin 농도의 증가에 따라 재분화율이 증가하는 경향을 보였다. 하지만 NAA와 BAP, 2-iP 혼용 처리구에 비해 낮은 식물체 재분화율을 나타내었으며, 하나의 캘러스로부터 최대 2.4개의 식물체를 얻을 수 있었다.

캘러스를 NAA와 2-iP로 혼용 처리한 배지에 치상한 경우, 23.0%~67.3%의 재분화 효율을 보여 NAA와 Kinetin 혼용처리에 비해 높은 재분화율을 보였다. NAA와 2-iP를 각각 1 mg·L<sup>-1</sup>의 낮은 농도로 혼용한 경우 재분화율이 23.0%로 가장 낮았으며, NAA 농도가 일정할 때 2-iP 농도가 증가할수록 재분화율이 다소 높아지는 경향을 보였다. 특히 5 mg·L<sup>-1</sup> NAA와 5 mg·L<sup>-1</sup> 2-iP 처리구의 경우 67.3%로 가장 높은 식물체 재분화율을 보였으며, 배양기간의 진행에 따라 캘러스 당 평균 신초의 출현 수도 5.8개로 가장 높았다(Table 3). 그러나 NAA의 농도가 1 mg·L<sup>-1</sup> 또는 3 mg·L<sup>-1</sup>인 경우 5 mg·L<sup>-1</sup> 2-iP 농도는 식물체 재분화율을 다소 감소시키는 경향을 보였다. NAA와 2-iP 혼용 처리에서는 특징적으로 모든 처리에서 신초와 뿌리가 동시에 발생되었으며, 이러한 양상은 신초출현 이후 기내에서의 식물체 성장과 뿌리의 유도 및 재분화 식물체의 순화 시이점으로 작용할 것으로 사료된다(Fig. 2D, Table 3).

캘러스를 NAA와 BAP가 혼용 처리한 배지에 치상한 경우, 5 mg·L<sup>-1</sup> NAA와 5 mg·L<sup>-1</sup> BAP 처리구를 제외한 모

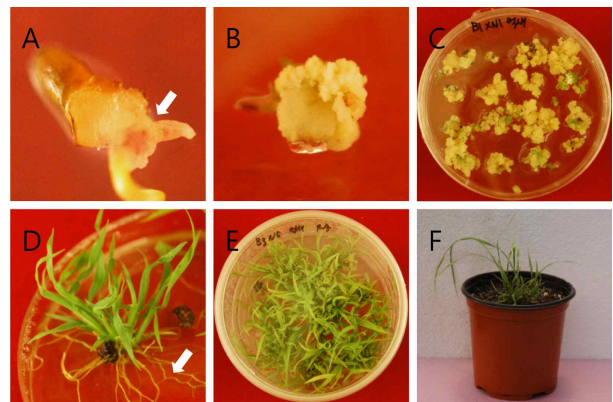


Fig. 2. Process for callus induction and plant regeneration of *Miscanthus sinensis*.

A: Primary stage of callus induction from mature seeds of *Miscanthus sinensis*, B: The induced callus from 5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D after 3 weeks., C: Callus proliferation and plants regeneration stage from induced calli., D: Plant regeneration and roots induction on the treatment of 5 mg·L<sup>-1</sup> NAA+5 mg·L<sup>-1</sup> 2-iP., E: Regenerated multiple shoots on the treatment of 3 mg·L<sup>-1</sup> NAA+5 mg·L<sup>-1</sup> BAP., F: Acclimatization stage of regenerated plants.

든 처리에서 52.7%~83.7%의 재분화 효율을 보여 Kinetin 또는 2-iP 혼용 처리구보다 재분화율이 높게 조사되었다. 특히 3 mg·L<sup>-1</sup> NAA와 5 mg·L<sup>-1</sup> BAP 혼용 처리된 배지에서 재분화율이 83.7%로 가장 높게 나타난 반면, 5 mg·L<sup>-1</sup> NAA와 5 mg·L<sup>-1</sup> BAP 혼용 처리구에서는 캘러스로부터의

식물체 재분화율은 급격히 감소하였다. 또한 재분화를 위해 치상된 캘러스 당 출현된 싹의 수도 NAA와 BAP 혼용 처리구에서 2.7~7.8개로 조사되어 NAA와 2-iP 혼용 처리구에서의 1.0~5.8개 그리고 NAA와 Kinetin 혼용 처리구에서의 1.0~2.4개보다 많은 식물체가 재분화 되었다 (Fig. 2E, Table 4).

따라서 본 연구결과 NAA 3 mg·L<sup>-1</sup>과 BAP, 2-iP 및 Kinetin 5 mg·L<sup>-1</sup> 혼용처리간의 재분화율을 비교하였을 때, 동일한 농도 조건에서 BAP가 2-iP 및 Kinetin에 비해 각각 39.7%와 24.7% 이상의 높은 재분화율을 보여 가장 효과적이었다.

조직배양에 의한 단자엽 식물의 재분화 양상은 배양식물의 종류, 기본배지의 종류, 식물생장조절제의 종류 및 농도, 탄소원의 종류 등에 따라 다른데, Cho *et al.*(2003)은 단자엽 식물 벼 완숙종자 유래 캘러스의 재분화 시 Kinetin과 BAP가 동일한 효과를 보인다고 하였으며, Lee *et al.*(2007)은 동과 식물인 페레니얼 라이그래스의 경우 NAA와 Kinetin을 혼용 처리 시 31.7%의 싹 재분화율을 보여, 다른 식물생장조절제 처리보다 재분화에 효과적이었다고 보고하였다. 또한 Song *et al.*(2010)은 들잔디(*Zoysia japonica*) 종자유래 캘러스의 재분화 실험에서 2-iP 처리가 BAP에 비해 약 20% 이상의 높은 재분화율을 보임은 물론 캘러스로부터의 다싹 유도에 효과적이었다고 보고하여 본 연구 결과와는 다른 양상이었다.

2,4-D에서 유도된 엽새 성숙종자유래 캘러스를 1, 3, 5 mg·L<sup>-1</sup> NAA와 BAP, 2-iP, Kinetin을 혼용한 재분화 배지에 치상하였을 때 4주 후 각기 다른 재분화 양상을 보이는데 NAA와 Kinetin 혼용 처리는 다른 처리에 비해 낮은 재분화 효율을 보였으며, NAA와 2-iP 혼용 처리 두 처리와는 다르게 캘러스에서 싹과 뿌리의 발생을 동시에 관찰 할 수 있었다. 또한 NAA와 BAP 혼용 처리 시 다른 처리에 비해 많은 다싹초가 관찰 되었으며, 캘러스로부터 가장 많은 식물체를 얻어 대량증식에 가장 적합하다고 판단 되었다. 캘러스에서 재분화된 엽새 재분화 식물체는 식물생장조절제가 포함되지 않은 MS기본 배지에 옮겨 약 3주간 뿌리를 유도한 후, 16시간 광주기 조건의 광배양실에서 0.2% hyponex 용액을 이용하여 약 7일~10일간 생육시켰으며, 발근이 우수하고 생육이 양호한 식물체는 포트에 옮겨 온실에서 재배하였다(Fig. 2F).

본 연구에서 엽새의 성숙종자로부터 캘러스를 유도하고 식물체를 재분화 시킬 수 있는 체계는 미래에 대량증식 기술 체계와 신제품 엽새 개발을 위한 효율적인 시스템 확립에 있어서 유용한 자료로 활용될 수 있을 것이며, 나아가 환경 개선용 소재 및 기능성 엽새 개발에 이용 가치가 높을 것으로 판단된다.

## 사 사

본 연구는 2011년도 농업유전자원관리사업(20110301-055-024-001-00-00) 연구비 지원에 의해 수행하였음.

## 적 요

본 연구는 최근 한방자원, 사료자원, 바이오에너지 자원 등 다양하게 이용되는 국내 자생 엽새(*Miscanthus sinensis*)의 대량생산 및 신제품 개발을 위한 조직배양체계 확립을 위해 수행되었다. 이를 위해 엽새 완숙종자로부터의 캘러스 유도과 재분화를 위한 식물생장조절제의 적정농도를 규명하였다. 엽새의 성숙종자유래 배발생 캘러스 유도를 위해 2,4-D, IBA, NAA를 1~10 mg·L<sup>-1</sup>의 농도로 단용 처리한 결과, 5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D 처리에서 가장 높은 85.3%의 캘러스 유도율과 캘러스의 증식을 보였으며 조직배양 과정에서 갈변화율도 가장 낮았다. 또한, 캘러스의 재분화를 위해 옥신인 NAA와 Kinetin, 2-iP, 또는 BAP 등의 사이토키닌을 혼용 처리한 결과, 각각 19.0%~59.0%, 23.0%~67.3%, 14.7%~83.7%의 재분화율을 보여 NAA와 BAP의 혼용 처리구가 NAA와 Kinetin 또는 2-iP와 혼용 처리구보다 식물체 재분화에 효과적이었다. 특히 3 mg·L<sup>-1</sup> NAA와 5 mg·L<sup>-1</sup> BAP 혼용 처리된 배지에서의 재분화율이 83.7%로 가장 높게 나타났으며, 캘러스 당 재분화 식물체 개수도 5.5개로 동일농도의 2-iP 또는 Kinetin 혼용 처리 시 2.1 및 2.0개보다 많았다. 본 연구결과 엽새 성숙 종자로부터의 배발생 캘러스 유도에는 5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D가 그리고 캘러스의 재분화에는 3 mg·L<sup>-1</sup> NAA와 5 mg·L<sup>-1</sup> BAP 혼용 처리가 가장 효율적이었다. 본 연구를 통해 확립된 조직배양 체계는 엽새의 대량생산 및 신제품 개발에 유용할 것으로 판단된다.

인용문헌

- Cho, J.H., H.S. Hur and J.Y. Lee. 2003. Screening of Korean rice cultivars for their shoot regeneration ability *in vitro* and the effect of maltose on shoot regeneration. *Korean J. Breed.* 35(4):229-236.
- Clifton-Brown, J.C., P.F. Stampel 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* 10:509-518.
- Clifton-Brown, J.C., Y.C. Chiang and T.R. Hodgkinson. 2008. *Miscanthus*: Genetic resources and breeding potential to enhance bioenergy production. In Vermerris, W. (ed.). *Genetic Improvement of Bioenergy Crops*. Springer Science + Business Media, LLC, New York, USA. pp. 273-294.
- 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.
- Lee, K.W., D.G. Lee, A. Nagib, S.H. Won, S.H. Lee, K.Y. Kim, G.J. Choi, S. Seo and B.H. Lee. 2007. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *J. Korean Grassl. Forage Sci.* 27(4):235-240 (in Korean).
- Lee, S.H., B.S. Kim, S.H. Won, J.K. Jo, K.Y. Kim, G.J. Park, B.R. Sung, H.S. Lee and B.H. Lee. 2004. Factors affecting callus induction and plant regeneration from mature seed of zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.). *J. Korean Grassl. Forage Sci.* 24(1):29-36 (in Korean).
- 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* 19:209-227.
- Moon, Y.H., B.C. Koo, Y.H. Choi, S.H. Ahn, S.T. Bark, Y.L. Cha, G.H. Ahn, J.G. Kim and S.J. Shu. 2010. “*Miscanthus*” the promising bioenergy crop. *Korean J. Weed Sci.* 30(4): 330-339 (in Korean).
- Nakai, T. 1909. *Flora Koreana*. J. Col. Sci. Imp. Univ. Tokyo. 26:1-304.
- Park, C.H., Y.G. Kim, K.H. Kim, A. Iftexhar, H.J. Lee, A. S. Shamima, K.W. Lee and B.H. Lee. 2009. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration from mature seed culture of *Miscanthus sinensis*. *J. Korean Grassl. Forage Sci.* 29(4):291-298 (in Korean).
- Song, I.J., M. Ganesan, E.J. Kang, H.J. Sun, T.W. Bae, O.P. Lim, P.S. Song and H.Y. Lee. 2010. A simple and reproducible regeneration protocol for *Zoysia japonica* based on callus cultures. *Hort. Environ. Biotechnol.* 51(3): 222-225.
- 김태정. 2008. 한국의 야생화와 자원식물5. 서울대학교출판부. pp. 216-219.
- 장진환. 2011. 한국산 억새속(*Miscanthus*)의 분류학적 연구. 강원대학교 대학원 석사학위논문, 춘천.
- (접수일 2011.8.29; 수정일 2011.9.15; 채택일 2011.9.29)