

갈대(*Phragmites communis* Trinius) 성숙종자를 이용한 기내 식물체 재분화와 재분화체의 유전적 다양성

류재혁^{1,2}, 김은환¹, 소현수^{1,3}, 정미영⁴, 송원섭⁵, 배창휴^{1*}

¹순천대학교 웰빙자원학과, ²한국원자력연구원 첨단방사선연구소, ³전남한방산업진흥원 약용작물보급센터

⁴순천대학교 농업교육과, ⁵순천대학교 원예학과

Plant Regeneration and Genetic Diversity of Regenerants from Seed-derived Callus of Reed (*Phragmites communis* Trinius)

Jaihyunk Ryu^{1,2}, En-Hwan Kim¹, Hyun-Su So^{1,3}, Mi-Young Chung⁴, Won-Seob Song⁵ and Chang-Hyu Bae¹

¹Department of Bioresources Science, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

²Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea

³Jeollanam-do Development Institute for Korean Traditional Medicine, Jangheung 529-851, Korea

⁴Department of Agricultural Education, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

⁵Department of Horticulture, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Abstract - This study was carried out to address an efficient *in vitro* regeneration system from seed-derived callus of *Phragmites communis*, and to evaluate genetic variations of the regenerants using ISSR markers. Shoot regeneration via calli was greatly influenced by N6 medium compared with MS medium, and plant regeneration frequency was 90% in N6 supplemented with BA 0.25 mg/L and BA 0.5 mg/L. According to ISSR analysis of the thirty regenerants, out of 94 loci detected overall, 16 were identified to be polymorphic with a rate (PR) of 17.0%. The mean gene diversity (*h*) of different *in vitro* condition was 0.03 and ranged from 0.008 for N6 with BA 5 mg/L, to 0.040 for MS with IAA 0.1 mg/L+kinetin 2 mg/L. The results indicate that the regenerants have a low genetic variation, and ISSR analysis is effective to detect genetic variation of regenerants.

Key words - ISSR, Genetic diversity, *Phragmites communis* Trinius, Regeneration

서 언

갈대(*Phragmites communis* Trinius)는 벼과(Gramineae)에 속하는 다년초로서 중국, 한국, 일본, 러시아, 쿠릴열도 등 북반구의 온대지방에서 아한대에 넓게 분포한다(Kohl et al., 1998; Lee, 1993). 우리나라에서도 전국적으로 자생하며, 카드뮴 등에 의해 오염된 수질을 정화시켜주는 phytoremediation 소재, 가축사료, 건축용자재 등에 널리 사용되고 있다(Koppitz et al., 1997; Ziedler et al., 1994). 특히 다년생 벼과 식물의 경우 바이오매스 수량이 많고, 재배시 비료와 에너지의 소요가 적어 바이오에너지 작물로서 매우 효율적이다

(Kim et al., 2011; Lee et al., 2008; Park et al., 2009).

식물의 기내배양을 통하여 동질성을 지닌 클론을 대량으로 얻을 수 있으며, 식물체 재분화는 식물체 고유의 유전적 특성 외에도 생장조절제의 종류와 농도의 조합에 의해 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Chu et al., 1975; Karp, 1991; Muhammad et al., 2008). 기내배양 과정 중 일어나는 유전적 변이는 종종 원치 않는 재분화식물체의 증식을 이 끌어낸다. 기내 조직배양에서 나타나는 유전적 변이인 체세포변이(somaclonal variation)는 표현형과 염색체의 수적 구조적 수준에서도 변이를 일으킨다(Goto et al., 1998; Martins et al., 2004; Peschke et al., 1987; Zheng et al., 1987). 이러한 변이는 배지에 첨가하는 생장조절물질(Goto et al., 1998; Larkin and Scowcroft, 1981; Zhou, 1995)이나 장기간

*교신저자(E-mail) : chbae@sunchon.ac.kr

계대배양(Goto *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2004; Modgil *et al.*, 2005) 등으로 인해 발생하는 것으로 알려져 있다. 지금까지 *Prunus dulcis*의 RAPD 및 ISSR 분석(Martins *et al.*, 2004), *Malus pumila*의 RAPD 분석(Modgil *et al.*, 2005), *Pinus thunbergii*의 RAPD 분석(Goto *et al.*, 1998), 장기간 기내 배양된 춘란(*Cymbidium goeringii*)과 한란(*C. kanran*)의 유전적 변이성(Ryu *et al.*, 2011) 등의 연구에서도 기내 장기간 배양과 첨가되는 성장조절물질의 종류에 따라 변이성에 차이가 있음을 보고하고 있다.

종내의 다양한 유전적 변이 특성을 분석하기 위하여 다양한 분자마커가 적용되고 있다. 이 중 ISSR 마커는 단순한 반복 서열 분자 마커로 SSR 마커와는 달리 목표로 하는 사전 서열의 지식이 필요치 않아 사용하기에 매우 편리하다(Fang and Roose, 1997; Tsumura, 1996). 또한 AFLP (amplified fragment length polymorphism)보다 과정이 간단하고(Russel *et al.*, 1997), RAPD보다는 primer 당 다형성 밴드수가 더 많으며(Iruela *et al.*, 2002), primer들의 높은 결합 온도와 더 긴 서열 때문에 RAPD보다 정확하고 재현성이 우수한 밴드들이 생성되는 장점이 있다(Esselman *et al.*, 1999), 특히 ISSR이 목표로 하는 반복 서열은 진핵 계놈 전체에 걸쳐 풍부하고 빠르게 변화하여 유전자 지문의 검출에서 그 유용성이 입증되고 있다(Godwin *et al.*, 1997; Russel *et al.*, 1997).

지금까지 티모시(*Phleum pratense* L.), 억새(*Miscanthus sinensis* var. *purpurascens* RENDLE), 들잔디(*Zoysia japonica*) 등 다양한 벼과 식물의 기내배양에 의한 자원증식의 관련 연구가 수행되었으며(Bae *et al.*, 2001; Cho and Byeon, 2011; Lee *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009), 갈대는 성장조절제 처리에 따른 아종간 micropropagation 비교(Poonawala *et al.*, 1999), 체세포배분화(Lauzer *et al.*, 2000), 배양조건에 따른 재분화 기간(Straub *et al.*, 1988), 캘러스 유도 및 재분화(Kim *et al.*, 2011)에 대한 연구 등 다양하게 진행되었으며, 유전적 다양성에 관한 연구는 RAPD 마커를 사용하여 달뿌리풀(*Phragmites japonica*)과 유연관계 분석(Kim and Kim, 2009), 자생환경에 따른 변이(Guo *et al.*, 2003; Vladislav *et al.*, 2007)가 연구되었으나 기내배양 재분화체의 변이에 관한 연구는 없는 실정이다.

본 연구는 유용 부존자원의 하나인 갈대의 기내번식체계를 확립하고, 재분화 식물체의 유전적 다양성과 변이성을

분석하여 식물자원 소재 개발의 기초자료를 제공하고 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

성숙종자 순천만 재배 농가(보람농장)에서 구입하여 이용하였다. 구입종자 처리는 1 mm 체(키친크레프트, Korea)를 이용하여 종자를 채취한 후 1 L 비커의 물에 종자를 처리하여 가라앉는 종자를 수선하여 식물재료로 이용하였다. 이렇게 준비한 성숙종자를 70% ethanol에 15초간 표면살균한 뒤 멸균증류수로 3회 수세하고, 수세한 성숙종자를 2% NaOCl 용액에 15분간 표면살균 하였다. 성숙종자 표면에 남아있는 락스 용액을 제거하기 위해서 멸균증류수로 1분간격으로 3회 수세한 뒤 멸균된 여과지로 수분을 제거시켜 배양용 시료로 사용하였다.

캘러스 유도 및 계대배양

성숙종자에서 캘러스를 얻기 위하여 2,4-D(2,4-dichlorophenoxy acetic acid)와 BA를 혼용첨가(2,4-dichlorophenoxy acetic acid 1.0 mg/L+BA 0.1 mg/L와 2,4-D 0.5 mg/L+BA 0.1 mg/L)한 MS기본배지(Murashige and Skoog, 1962)에 종자를 치상하여 캘러스를 유도하였다. 종자치상은 처리구당 120개씩 5반복으로 총 600개였고, 24±2°C, 16 h light/8 h dark, 20 µmol/m²/sec 광조건으로 배양을 실시하였다. 유도된 캘러스는 상기 조건에서 2주 간격으로 계대배양 하였고, 배양 4주후 처리구당 120개체 3반복으로 캘러스 유도율을 산출하였다. 배지의 pH는 5.8로 멸균전 적정하였다.

캘러스로부터 식물체 재분화

성숙한 종자로부터 유도된 4주째의 캘러스를 MS배지에 BA, TDZ, kinetin 각각 2.0 mg/L에 IAA와 NAA 0.1 mg/L를 각각 첨가한 배지와 N6(Chu *et al.*, 1975) 배지에 BA 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 mg/L를 농도별로 처리한 배지에서 동일한 종자에서 증식된 캘러스를 각각 10개체 3반복으로 4주간 배양하여 1 cm 이상 자란 것을 재분화 개체로 간주하였다. 재분화된 개체는 MS배지에 계대배양하여 뿌리발생을 유도한 후 원예용 상토(흥농종묘)에 이식, 재배하여 DNA 추출에 이용하였다.

Genomic DNA의 분리 및 정제

기내배양에 의한 변이성을 분석하고자 동일한 종자에서 유래한 캘러스를 재분화 시킨 개체 중 신초 재분화율이 높았던 10개 조합(Table 5)에서 각각 순화된 3개체씩 총 30개체를 대상으로 CTAB 법(Fang *et al.*, 1992)으로 DNA를 추출하였다. DNA 농도 측정은 UV/VIS Spectrophotometer (Ultraspec[®] 2000, Pharmacia Biotech, UK)를 이용하였으며, 최종농도는 20 ng/μl로 희석하였다.

ISSR 분석

20개의 ISSR 프라이머(UBC primer Set No. 9, University of British Columbia, Canada)로 예비실험을 실시한 후의 밴드가 명확한 12개의 프라이머를 선택하여 ISSR 분석에 이용하였다(Table 3). PCR 반응액의 조성은 총 50 μl로 주형 DNA 20 ng/μl, *Taq* polymerase 1 unit, 10×PCR reaction buffer(10 mM Tris-HCl pH 8.3; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂), 0.2 mM dNTP, 10 pmol 프라이머를 혼합하여 사용하였다. PCR 반응은 Gene Amp[®] 2700(Applied Biosystem, UK)을 사용하여 94°C에서 5분간 초기 변성시킨 후 94°C에서 45초간 denaturation, 48°C에서 45분간 annealing, 72°C에서 1분 30초간 extension을 40회 수행한 후 최종적으로 72°C에서 7분간 반응시킨 후 종료하였다. PCR이 완료된 후의 증폭산물을 Lapchip GX electrophoresis system (Caliper life science, USA)을 사용하여 밴드를 확인하였다.

데이터 분석

ISSR에서 분석된 DNA 밴드 양상은 이진수를 이용하여 밴드 유·무에 따라 1과 0으로 data를 표시하고 다형성 비율(PR), 유전좌당 평균 대립유전자수(*na*)와 유효대립유전자수(*ne*), 유전자 다양도(*h*), 처리집단간 유전적 거리를 POPGENE Ver. 1.32를 이용하여 분석하였다(Kimura and Crow 1964; Nei, 1973; Nei, 1978).

결과 및 고찰

성숙종자로부터 식물체 재분화

갈대 종자로부터 캘러스를 유도하고자 MS배지에 2,4-D 0.5, 1.0 mg/L와 BA를 0.1 mg/L 농도로 각각 혼합첨가한 배지에서 배양한 후 캘러스 유도율을 조사한 결과(Table 1, Fig. 1-A), 2,4-D 1.0 mg/L+BA 0.1 mg/L 처리에서 65%, 2,4-D

0.5 mg/L+BA 0.1 mg/L 처리에서 45%로 45~65%의 캘러스가 유도되었다. 이는 Kim *et al.*(2011)이 갈대의 성숙 종자에서 캘러스 유도시 2,4-D와 BA 혼용처리 조합에서 80% 이상의 캘러스가 유도된 결과 및 국내 역세의 성숙한 종자에 2,4-D를 처리한 결과인 69~85%(Cho and Byeon, 2011)

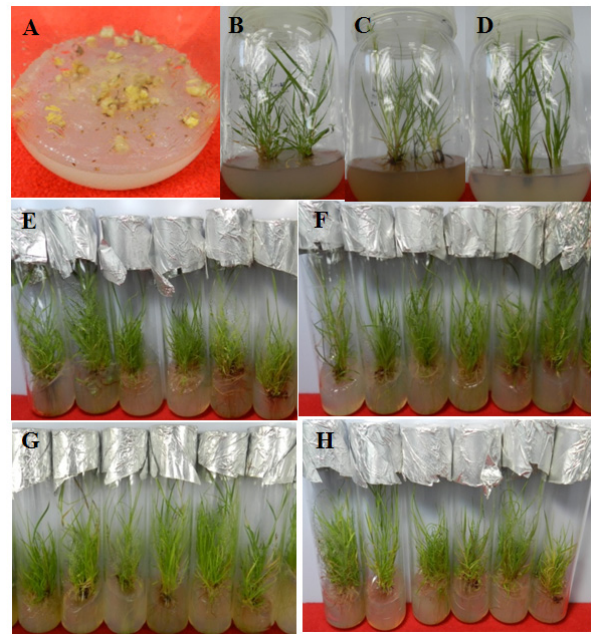


Fig. 1. Plant regeneration from seed-driven callus of *P. australis*. A: Callus induction from mature seeds of reed in MS with 2,4-D 1.0+BA 0.1 mg/L after 4 weeks, B: Shoot induction in MS with 2.0 mg/L of kinetin after 4 weeks, C: Shoot induction in MS with kinetin 2.0+NAA 0.1 mg/L after 4 weeks, D: Shoot induction in MS with kinetin 2.0+IAA 0.1 mg/L after 4 weeks, E: Shoot induction in N6 after 4 weeks, F: Shoot induction in N6 with 0.5 mg/L of BA after 4 weeks, G: Shoot induction in N6+BA 1.0 mg/L after 4 weeks, H: Shoot induction in N6 with 5.0 mg/L of BA after 4 weeks.

Table 1. Effect of plant growth regulators (PGRs) on callus induction from mature seeds of *Phragmites australis*

Plant growth regulators (mg/L)	No. of seeds cultured	Callus induction(%)
MS ^z + 2,4-D 1.0 + BA 0.1	360	65 ± 3.9 ^y
MS + 2,4-D 0.5 + BA 0.1	360	45 ± 4.6

^zMurashige and Skoog's medium (1962)

^yAll values are mean ± SD (n=3).

Table 2. Effects of PGRs on shoot regeneration from callus of *P. australis* in MS media with different combinations of plant growth regulators

Basal medium	PGRs (mg/L)	TDZ	Kinetin	BA
		2.0	2.0	2.0
	NAA 0.1	36.6 ± 11% ^z	80.0 ± 10% ^z	36.6 ± 11% ^z
MS ^y	IAA 0.1	50.0 ± 10%	83.3 ± 11%	50.0 ± 26%
	-	40.0 ± 10%	86.6 ± 5%	36.6 ± 5%

^yMurashige and Skoog's medium (1962)^zAll values are mean±SD (n=3).Table 3. Effect of BA concentrations on shooting from mature seed-derived callus of *P. australis* in N6 media

Basal media	Growth regulator(mg/L)	Shoot induction rate(%)	Shoot length (cm)
	-	86.6 ± 12 ^z	5.5 ± 1.2 ^z
	BA 0.1 ^z	83.3 ± 15	8.6 ± 2.0
	BA 0.25	90.0 ± 5	11.3 ± 2.0
N6 ^y	BA 0.5	90.0 ± 5	14.6 ± 1.5
	BA 1.0	86.6 ± 23	10.0 ± 2.0
	BA 2.5	86.6 ± 12	8.3 ± 2.5
	BA 5.0	70.0 ± 10	7.0 ± 2.0

^yN6 medium (Chu *et al.*, 1975),^zAll values are mean±SD (n=3).

캘러스 유도율과는 차이를 나타낸 반면, 벼과 식물은 높은 농도의 2,4-D 처리가 캘러스 유도에 효과적이라는 연구 (Sopory and munshi, 1997)와 티모시와 억새 종자에서 캘러스 유도시 2,4-D 1.0 mg/L을 포함한 MS 배지에서 60% 내외의 캘러스가 유도된 결과와 유사하였다(Lee *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009).

유도된 캘러스로부터 식물체 재분화를 관찰하기 위해 BA, TDZ, kinetin 각각 2.0 mg/L와 NAA, IAA 0.1 mg/L를 포함한 MS 고체배지에 캘러스를 배양한 결과(Table 2, Fig. 1-B~D), 전체 9개 처리구에서 신초로 재분화가 일어났다. 싸이토키닌인 kinetin 처리구에서 옥신의 종류와 상관없이 모두 83.3%의 높은 재분화율을 나타내었고, IAA를 혼용하였을때 NAA를 혼용할 때보다 다소 높은 재분화율을 나타내었다. 이는 Kim *et al.*(2011)이 MS 고체배지에 kinetin과 BA를 1.0~3.0 mg/L 농도로 혼용 처리하여 8~43%, 그리고 MS 단독배지에서

Table 4. List of ISSR primers, sequence of the primers, number of total bands and number of polymorphic bands generated by ISSR markers in regenerants obtained from various conditions of media^y

ISSR Primer	Sequence ^w	TB ^x	PB ^y	PR ^z
UBC 808	(AG)8C	8	1	12.5
UBC 809	(AG)8G	8	0	0
UBC 811	(GA)8C	4	1	25.0
UBC 812	(GA)8A	3	0	0
UBC 813	(CT)8T	6	0	0
UBC 821	(GT)8T	10	3	30.0
UBC 827	(AC)8G	5	2	40.0
UBC 835	(AG)8YC	11	3	27.2
UBC 840	(GA)8TT	8	2	25.0
UBC 841	(GA)8YC	8	1	12.5
UBC 842	(CT)8RA	12	3	25.0
UBC 847	(CA)8RC	11	0	0
Total		83	16	17.0

^yMedia conditions with various kinds of plant growth regulators were included in Table 5. A total of 30 samples (3 samples per medium) were used for ISSR.^wB: C/G/T, D: A/G/T, R: A/G, Y: C/G. ^xTB: No. of total bands.^yPB: No. of polymorphism bands. ^zPR: polymorphism rate (%).

56%의 재분화율을 보인 것에 비하여 NAA, IAA와 TDZ 및 BA 혼용처리에서는 유사한 수준이며, NAA, IAA와 kinetin 단독처리에서는 20% 이상 높은 수준이다.

N6(Chu *et al.*, 1975) 배지에 BA를 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 mg/L의 농도로 단독처리하여 캘러스로부터 신초의 재분화를 관찰한 결과(Table 3, Fig. 1-E~G), BA를 첨가하지 않는 배지에서도 86.6%의 빈도로 신초가 유도되었으며, 2.5 mg/L BA의 처리시 90.0%의 빈도로 신초가 유도된 반면, BA 5 mg/L 처리에서는 70.0%로 오히려 감소하였다. 신초의 길이는 BA 0~0.5 mg/L까지는 증가하여 BA 0.5 mg/L에서 14.6 cm로 가장 길게 나타났으며, BA 1.0 mg/L 이상의 농도에서는 BA 농도가 증가함에 따라서 감소하는 경향이 있었다. 이 결과는 본 연구에서 MS배지에 NAA, IAA와 kinetin을 조합하여 나타난 신초 재분화율 보다 높게 나타난 것이며, 벼에서 MS배지와 N6 배지를 비교한 결과 캘러스 유도와 신초분화에 N6배지가 효과적이라는 연구결과 (Muhammad *et al.*, 2008)와 유사한 것을 볼 때 화본과 식물

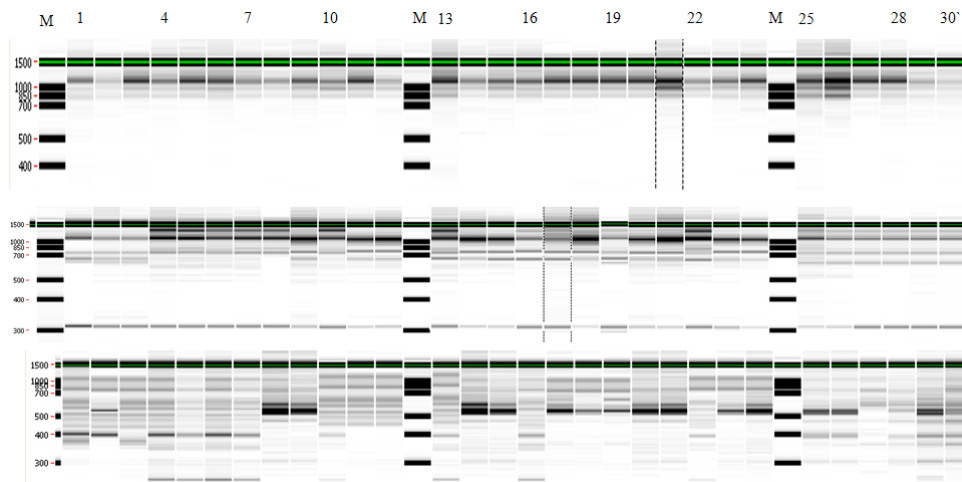


Fig. 2. Diagram of ISSR electrophoresis photograph for 30 *in vitro* regenerated plants of *P. australis*. M: ladder maker (Lapchip GX 1500 bp, USA) Lanes 1 to 3; MS with kinetin 2.0 mg/L, Lanes 4 to 6; MS with kinetin 2.0+NAA 0.1 mg/L, Lanes 7 to 9; MS with kinetin 2.0+IAA 0.1 mg/L, Lanes 10 to 12; N6, Lanes 13 to 15; N6 with BA 0.1 mg/L, Lanes 16 to 18; N6 with BA 0.25 mg/L, Lanes 19 to 21; N6 with BA 0.5 mg/L, Lanes 22 to 24; N6 with BA 1.0 mg/L, Lanes 25 to 27; N6 with BA 2.5 mg/L, Lanes 28 to 30; N6 with BA 5.0 mg/L, respectively.

Table 5. Measurements of genetic variation of *P. australis* cultured in media supplemented with different plant growth regulators (PGRs)

No.	Media supplemented with PGRs (mg/L)	na^w	ne^x	h^y	$PR(\%)^z$
1	MS + kinetin 2.0	1.08	1.06	0.035	8.06
2	MS+NAA 0.1+kinetin 2.0	1.06	1.05	0.027	6.45
3	MS + IAA 0.1 + kinetin 2.0	1.10	1.06	0.040	10.75
4	N6	1.06	1.04	0.025	6.45
5	N6+BA 0.1	1.07	1.06	0.034	7.53
6	N6+BA 0.25	1.09	1.05	0.035	9.68
7	N6+BA 0.5	1.04	1.02	0.014	4.30
8	N6+BA 1.0	1.04	1.02	0.014	4.30
9	N6+BA 2.5	1.07	1.06	0.032	7.53
10	N6+BA 5.0	0.02	1.01	0.008	2.15
	Mean	1.07	1.05	0.03	7.23

^w na ; Observed number of alleles, ^x ne ; Effective number of alleles, ^y h ; Nei's (1973) gene diversity, ^z PR ; polymorphism rate (%).

의 특성으로 보인다. 또한 Kim *et al.*(2011)이 MS배지를 기본배지로 한 생장조절제 첨가배지에서 재분화시킨 것보다 약 25% 정도 높은 결과를 보여주고 있다.

ISSR marker를 이용한 유전적 다양성 분석

ISSR 마커를 이용하여 표 5에 제시한 배지 종류별로 캘러스에서 식물체를 재분화시켜 순화시킨 개체를 대상으로 유전적 다형성을 분석하였다(Table 4). 12개 프라이머를 사용하여 공시한 10조합 30개체를 분석한 결과, 프라이머 당 밴드수는 최저 3개(UBC 812)에서 최고 12개(UBC 842)로 한 프라이머 조합당 평균 7.83개였으며, 4개 프라이머(UBC 809, UBC 812, UBC 813, UBC 847)에서는 모두 동일한 밴드패턴을 보였다. 다형성 밴드의 수는 최소 1개(UBC 808, UBC 811, UBC 841)에서 최대 3개(UBC 821, UBC 835, UBC 842) 사이로 평균 다형성 밴드는 1.33개가 검출되었다(Fig. 2). 캘러스에서 재분화된 개체들에서 증폭된 총 94개의 밴드 중 16개의 다형성 밴드가 나타나 17.0%의 다형성 비율을 나타내었다. 이는 MS배지에 다양한 생장조절물질을 첨가하여 얻은 *Jatropha curcas*의 캘러스를 RAPD 분석하여 얻은 91.12%(Jikku *et al.*, 2012), 장기간(8년) 기내 배양된 춘란과 한란을 각각 RAPD 분석(Ryu *et al.*, 2011)하여 도출된 26.4%와 36.1%, 그리고 4개의 지역에서 수집한 갈대 집단을 ISSR 분석하여 나타난 51%의 다형성 비율(Guo *et al.*, 2007) 보다 낮은 수준으로 기내 배양된 개체들은 유전적으로 안정한 편이었다.

생장조절제와 농도를 달리한 배지의 조성별 유전적 다양

Table 6. Matrix of Nei's (1978) genetic identity (above diagonal) and genetic distances (below diagonal) among the DNA samples of *P. australis* from MS and N6 media with different PGRs²

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	* * *	0.9638	0.9429	0.9527	0.9494	0.9804	0.9511	0.9366	0.9758	0.9707
2	0.0369	* * *	0.9828	0.9791	0.9738	0.9709	0.9444	0.9365	0.9700	0.9620
3	0.0588	0.0174	* * *	0.9648	0.9808	0.9557	0.9514	0.9566	0.9577	0.9413
4	0.0484	0.0212	0.0359	* * *	0.9730	0.9580	0.9311	0.9193	0.9538	0.9626
5	0.0519	0.0266	0.0194	0.0274	* * *	0.9616	0.9556	0.9607	0.9616	0.9666
6	0.0198	0.0295	0.0453	0.0429	0.0392	* * *	0.9796	0.9619	0.9853	0.9787
7	0.0502	0.0572	0.0498	0.0714	0.0454	0.0207	* * *	0.9768	0.9574	0.9373
8	0.0655	0.0656	0.0444	0.0842	0.0401	0.0388	0.0235	* * *	0.9666	0.9341
9	0.0245	0.0305	0.0433	0.0473	0.0391	0.0148	0.0436	0.0340	* * *	0.9786
10	0.0297	0.0387	0.0605	0.0381	0.0340	0.0215	0.0648	0.0682	0.0217	* * *

²Medium conditions with various kinds of plant growth regulators were listed in Table 5.

성 비율을 분석한 결과(Table 5), 유전적 다형성은 3번 (MS+IAA 0.1+kinetin 2 mg/L) 10.75%, 6번(N6+BA 0.25 mg/L) 9.68%, 1번(MS+kinetin 2 mg/L) 8.06%, 5번(N6+BA 0.1 mg/L)과 9번(N6+BA 2.5 mg/L) 7.53%, 2번(MS+NAA 0.1+kinetin 2.0 mg/L)과 4번(N6) 6.45%, 7번(N6+BA 0.5 mg/L)과 8번(N6+BA 1.0 mg/L) 4.3%, 10번(N6+BA 5.0 mg/L) 2.15% 순으로 평균 6.72%의 유전적 다형성을 나타내어 성장조절제에 따른 일정한 경향은 찾을 수 없었다. 각 처리별 평균 대립유전자수(n_a)는 최소 0.02(10번)에서 최대 1.10(3번) 사이로 평균 0.96개였다. 유효대립유전자수(n_e)는 최소 1.01(10번)~최대 1.06(1, 3, 5, 9번)개로 평균 1.04개였다. Nei (1973)의 유전자 다양도(h)는 최소 0.008(10번)에서 최대 0.040(3번) 사이로 평균 0.03이었다. 각 처리간 유전적 유사도는 최소 0.9193(4번과 8번)에서 0.9853(6번과 9번) 사이로 10개 처리 개체간 평균 0.960의 유전적 유사도를 나타내었다(Table 6). 이는 Jikku *et al.*(2012)이 다양한 성장조절제 처리로 유도한 *Jatropha curcas*의 캘러스를 RAPD 분석하여 나타난 처리간 유전적 유사도(0.3659에서 0.8293 사이), Ryu *et al.*(2012)이 동일근경 유래의 춘란과 한란 배양체를 8년간 계대 배양한 30 개체에서 얻은 유전적 유사도 지수 0.868~0.931(평균 0.931)과 0.812~1.00(평균 0.913)에 비해 높은 수준으로 비교적 유전적으로 동질성이 높은 것으로 판단되었다. Nei's (1978)의 비유사도 지수에서도 처리간 최소 0.0198(1번과 6번)에서 최대 0.0682(8번과 10번) 사이로 매우 낮은 비유사도를 나타내었다. 이는 갈대의 국내

7개 집단의 종내 비유사도 지수 0.033~0.095(Kim and Kim, 2009)와 *Jatropha curcas*의 기내 배양한 캘러스를 분석한 결과인 0.187~1.00(Jikku *et al.* 2012)에 비하여 낮은 수준이다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 종자에서 각각 재분화되었음에도 불구하고 재분화된 식물 개체간의 유전적 구조가 매우 단순하고 동질성이 높은 구조임을 시사한다. 또한 유전적 변이는 처리한 성장조절제의 종류와 농도에 관계없이 무작위로 발생하였다. *Jatropha curcas*의 기내 배양한 캘러스(Jikku *et al.* 2012) 및 *Prunus dulcis*의 RAPD 및 ISSR 분석(Martins *et al.*, 2004)에서 처리농도와 호르몬의 종류에 관계없이 무작위로 발생한 결과와 일치하였다.

본 연구 결과를 종합하면 성숙한 종자에서 유도된 캘러스를 N6배지에 BA 0.5 mg/L를 처리한 배지에서 신초분화 후 MS 배지에서 발근을 유도하면 단기간 내에 대량으로 증식이 가능하며, 순화된 개체들은 비교적 유전적 구조가 안정한 것으로 나타났다. ISSR 마커로 유전적 다양성을 평가한 결과, 전체 개체간에는 17.0%의 다형성을 나타내었고, 동일한 처리구내 개체간에는 평균 6.72%의 다형성을 나타내었다. 유전자 다양도(h), 유전적 유사도지수는 평균은 각각 0.03과 0.960으로 안정한 것으로 나타났다.

적 요

활용가치가 높은 부존식물자원인 갈대의 기내 번식을 통한 배양체계를 확립하고 재분화 식물체들의 유전적 다양성

을 검토한 결과, 성숙종자 유래의 캘러스를 통한 기내 식물체 재분화는 N6배지에서 MS배지보다 양호하였고, 0.25~0.5 mg/L의 BA를 포함한 N6배지에서 가장 높았다. ISSR 마커를 이용하여 재분화 식물체의 유전적 안정성을 분석한 결과, 검출된 총 94 유전좌중 유전적 다형성은 17%였고, 평균 유전자다양도 값(h)은 0.03, BA 5 mg/L를 포함한 N6배지에서 0.008, NAA 0.1 mg/L와 kinetin 2 mg/L를 포함한 MS 배지에서 0.040으로 나타났다. 이것은 재분화된 갈대식물체 개체간에 유전적으로 구조가 매우 단순하고 균일하며, 유전적 다양성 진단에 ISSR 마커가 효과적임을 시사한다.

사 사

이 논문은 2011년도(2011. 8~2013. 8) 농림수산식품기술기획평가원(iPET) 학술연구비 공모과제 ‘순천지역 농림자원 식물소재의 대량생산(과제번호:2012-0628)’의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Bae, C.H., K. Tohyama, S.C. Lee, Y.P. Lim, H.I Kim, P.S. Song and H.Y. Lee. 2001. Efficient plant regeneration using mature seed-derived callus in Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) Korean J. Plant Tiss. Cult. 28:61-67.
- Cho, J.H. and J.H. Byeon. 2011. Establishment of callus induction and plant regeneration system from mature seeds of *Miscanthus sinensis*. Korean J. Plant Res. 24:628-635.
- Chu, C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hsu, K.C. Yin and C.Y. Chu. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture in rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci. Sinca 18:659-668.
- Esselman, E., J.L. Jiangquiang, D.J. Crawford, J.L. Winduss and A.D. Wolfe. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and their simple sequence repeat (ISSR) markers. Molecul. Ecology 8:443-451.
- Fang, G., S. Hammar and R. Grumet. 1992. A quick inexpensive method of removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biotechniques 13:52-55.
- Fang, D.Q. and M.L. Roose 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence markers. Theor. Appl. Genet. 95:408-417.
- Goto, S.R., C. Thakur and K. Ishii. 1998. Determination of genetic stability in long term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* part using RAPD markers. Plant Cell Rep. 18:193-197.
- Godwin, I.D., E.A.B. Aiken and L.W. Smith. 1997. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. Electrophoresis 18:1524-1528.
- Guo, W., R. Wang, S. Zhou, S. Zhang and Z. Zhang. 2003. Genetic diversity and clonal structure of *Phragmites australis* in the Yellow River delta of China. Biochem. Syst. Ecol. 31:1093-1109.
- Iruela, M., J. Rubio, J.L. Cubero, J. Gil and T. Mill. 2002. Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. Theor. Appl. Genet. 104:643-651.
- Jikku, J., K. Nimisha, M.A. Anu and P. Nambisan. 2012. Evaluation of somaclonal variation in callus cultures of *Jatropha curcas* maintained on different hormonal combinations using RAPD markers. Agricultural Sci. 8:616-623.
- Karp, A. 1991. On the current understanding of somaclonal variation. In Mifflin R. (ed.), Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, Vol. 7, Oxford University Press, New York, USA. pp. 1-58.
- Kimura, M. and J.F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. Genetics 49:725-738.
- Kim, Y.G. and J.H. Kim. 2009. Genetic variations and relationships of *Phragmites japonica* and *P. communis* according to water environment change. Korean J. Plant Res. 22:152-158 (in Korean).
- Kim, Y.G., K.H. Kim and B.H. Lee. 2011. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration from seed culture of reed. Korean J. Grassl. Forage Sci. 31:229-234 (in Korean).
- Kohl, J.G., P. Voitke, H. Kuhl, M. Dewender and G. Konig. 1998. Seasonal changes in dissolved amino acids and sugars in basal culm internodes as physiological indicators of the C/N-balance of *Phragmites australis* at littoral sites of different trophic status. Aquat. Bot. 60:221-240.
- Koppitz, H., H.H. Ku, K. Hesse and J.G. Kohl. 1997. Some aspects of the importance of genetic diversity in *Phragmites australis* (Cav) Trin. ex Steudel for the development of reed stands. Bot. Acta 110:217-223.
- Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant

- improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197-214.
- Lauzer, D., D. Sylvain and G. Vicent. 2000. In vitro propagation of reed grass by somatic embryogenesis. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 60:229-234.
- Lee, C.B. 1993. *Illustrated Flora of Korea*. Hyangmoonsa Press, Seoul, Korea. pp. 783-784.
- 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. *Korean J. Grassl. Forage Sci.* 28:165-170 (in Korean).
- Martins, M., D. Sarmento and M.M. Oliveira. 2004. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Rep.* 23:492-496.
- Modgil, M., K. Mahajan, S.K. Chakrabarti, D.R. Sharma and R.C. Sobti. 2005. Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106. *Sci. Hort.* 104: 151-160.
- Muhammad, T., A. Gowher, H. Fazal, A. Shakeel, A. Nasir and A.S. Aftab. 2008. Callus induction and *in vitro* plant regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) under various conditions. *Biological Sci.* 11:255-259.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15:473-479.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proc. Natl Acad Sci.* 70:3321-3323.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Park, C.H., Y.G. Kim, K.H. Kim, I. Alam, H.J. Lee, S.A. Sharmin, 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*. *Korean J. Grassl. Forage Sci.* 29:291-298 (in Korean).
- Poonawala, I.S., M.M. Jana and R.S. Nadgouda. 1999. Factors influencing bud break and rooting and mass-scale micropropagation of three *Phragmites* species: *P. karka*, *P. communis* and *P. australis*. *Plant Cell Rep.* 18:696-700.
- Peschke, V.M., R.L. Phillips and B.G. Genenbach. 1987. Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture derived maize plants. *Science* 238:804-807.
- Russel, T.R., J.D. Fuller, M. Macaulay, B.G. Hatz, A. Jahoor, W.P. Powell and R. Waugh. 1997. Direct comparison of level of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* 95:714-722.
- Ryu, J.H., H.Y. Lee and C.H. Bae. 2011. Variation analysis of long-term *in vitro* cultured *Cymbidium goeringii* Lindley and *Cymbidium kanran* Makino. *Korean J. Plant Res.* 24: 139-149 (in Korean).
- Sopory, S.K and M. Munshi. 1997. Anther culture. In Jain S.M., S.K. Sopory and R.E. Veilleux (eds.), *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands. pp. 145-176.
- Straub, P.F., D.M. Decker and J.L. Gallagher. (1988) Tissue culture and long-term regeneration of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 15:73-80.
- Tsumura, Y., K. Ohba and S.H. Strauss. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor. Appl. Genet.* 92:40-45.
- Vladislav, C., K. Barбора, V. Petra, K.S Olga and C. Hana. 2007. Phenotypic and genotypic variation of *Phragmites australis*: Comparison of populations in two human-made lakes of different age and history. *Aquatic Bot.* 86:321-330.
- Zheng, K.L., S. Castiglione, M.G. Biasini, C. Morandi and F. Sala. 1987. Nuclear DNA amplification and genetic mapping. *Nucl. Acids Res.* 19:303-306.
- Zhou, T.S. 1995. *In vitro* culture of *Doritaenopsis*: comparison between formation of the hyperhydric protocorm-like body (PLB) and the normal PLB. *Plant Cell Rep.* 15:181-185.
- Ziedler, A., S. Schneider, C. Jung, A.E. Melchinger and P. Dittrich, P. 1994. The use of DNA fingerprinting in ecological studies of *Phragmites australis* (Cav) Trin. ex Steudel. *Bot. Acta.* 107:237-242.

(Received 25 March 2013 ; Revised 23 April 2013 ; Accepted 25 April 2013)