

Research Article

잔디종자의 물리적 전처리가 캘러스 형성과 식물체 재분화에 미치는 효과

안나영^{1†} · 김용구^{1†} · 라하만 아티쿨¹ · 배은지² · 최수민² · 이광수² · 이병현^{1*}

¹경상대학교 응용생명과학부 (BK21 Plus), 농업생명과학연구원, ²국립산림과학원 남부산림자원연구소

Effect of Physical Pre-treatment of Mature Seed in Callus Formation and Plant Regeneration of Zoysiagrass

Na-Young Ahn^{1†}, Yong-Goo Kim^{1†}, Md. Atikur Rahman¹, Eun Ji Bae², Su Min Choi², Kwang Soo Lee² and Byung-Hyun Lee^{1*}

¹Division of Applied Life Science (BK21 Plus), IALS, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea.

²Southern Forest Resources Research Center, National Institute of Forest Science, Jinju, 600-300 Korea.

ABSTRACT

In order to improve the transformation efficiency of zoysiagrass by increasing the frequency of callus formation from mature seeds and plant regeneration, the effect of pre-treatment with sea sand was examined. Mature zoysiagrass seeds were given 10 min of swelling time before sea sand treatment using a sea sand and seed ratio of 1 : 1 and a vortex shaking speed of 6 (1,000 rpm) for 10 min. The seeds showed increased callus formation that was more than 2 times the rate in the control. In addition, plant regeneration efficiency was also increased when embryogenic callus induced from sea sand-treated mature seeds was cultured in regeneration medium. These results will be very helpful for improving the genetic transformation frequency of zoysiagrass, a recalcitrant monocot grass.

(Key words : Callus, Pre-treatment, Sea sand, Zoysiagrass)

I. 서 론

우리나라를 중심으로 아시아 지역의 중국, 일본 등지에서 자생하는 것으로 알려져 있는 한국잔디(zoysiagrass)는 난지형 다년생 잔디로 알려져 있다(심 et al., 1998). 한국잔디는 지하경과 포복경에 의해 생육밀도를 높게 형성하는 특성이 있는 잔디이며, 또한 우리나라를 포함해 일본, 중국 등의 아시아 국가에서는 잔디 우점 초지를 이용하여 가축에게 방목용 초지로 활용한 예가 보고되고 있다(Dhital et al., 2010). 한국잔디로 조성된 초지는 목초생산성이 높을 뿐만 아니라 단위면적당 많은 수의 가축을 방목하는 고밀도의 방목장에도 잘 견디는 특성이 있는 것으로 알려져 있다(Ito and Takatsuki, 2005). 잔디는 또한 다른 대부분의 C₃광합성 식물에 비해 광합성효율이 높은 C₄광합성 식물이며, 용수효율 또한 매우 높은 작물로 알려져 있다(Carmo-

Silva et al., 2009; Osborne and Freckleton, 2009). 또한 잔디는 추위에 견디는 힘과 더위에 견디는 힘이 좋아 다양한 기후조건에도 잘 적응하며, 유지 관리하기가 편리한 품종으로 알려져 미국을 비롯한 많은 국가에서 널리 재배되고 있는 잔디이다(Toyama et al., 2003).

지금까지 잔디에 있어서 녹색도, 엽질 개선, 피복도 등과 같은 다양한 경제형질의 개량을 위한 육종연구를 비롯해서, 병충해 저항성, 척박한 환경에서 견딜 수 있는 환경재해내성 등을 증대시키기 위해 교배와 선발을 통한 전통적인 육종방법이 많이 이용되어져 왔다(Sugihara et al., 1999). 그러나 이러한 관행적인 전통육종법에 의한新品种 개발은 넓은 재배포장과 같은 공간적 제약이 많이 동반되고 또 원하는 품종을 얻기까지 많은 시간이 걸리는 단점이 있는 것으로 알려져 있다. 최근 식물조직배양기술과 분자생물학적인 연구기법의 발달과 더불어 잔디의 육종기법 또한 생명

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

† N-Y Ahan and Y-G Kim are equally contributed.

공학적 기법을 응용하는 시대에 도달하게 됨으로써, 유전자 형질전환 등을 통해 지금까지 전통육종에서 불가능하다고 여겨졌던 동종 또는 이종간 유전자 도입을 통한 식물의 여러 가지 형질특성을 바꾸는 것이 가능하게 되었다 (Toyama et al., 2003; Sun et al., 2010).

잔디에 있어서 이와 같은 새로운 유전자의 도입을 통한 형질전환체를 개발하기 위해서는 효율적인 식물체 재분화 프로토콜 확립이 필수적으로 요구된다. 그러나 한국잔디 종자는 그 본래 특성 상 휴면성이 강하여 발아율이 낮아 잔디조성 시 종자파종을 통한 조성이 어려워 잔디조성 시 시간이 많이 걸리는 단점이 있다. 이러한 한국잔디의 종자 번식의 한계를 극복하기 위해 지금까지 다양한 종자처리법들이 개발되어져 왔으며 (Choi, 2012), Han et al. (2014)의 연구에서도 KOH와 PEG를 이용한 프라이밍 처리가 잔디 종자의 발아율을 향상시킬 수 있음으로 보고한 바 있다.

한편 이와 같은 잔디종자의 낮은 발아율 특성은 잔디종자로부터 캘러스 세포를 유도 배양하여 유전자를 도입하는 형질전환기법에 의한 분자육종 연구에도 제한요인으로 작용하여 결과적으로 신품종 개발 효율을 떨어뜨리게 된다. 지금까지 잔디를 포함하여 대부분의 화분과 작물에 있어서 조직배양을 위한 절편체로서 연중 구하기 쉽고 계절적 영향을 받지 않으며, 보존하기 쉬운 점 등의 이유로 완숙종자를 많이 이용해 왔다. 그러나 잔디 종자의 경우 종자 자체가 가지는 높은 휴면성 때문에 종자로부터 캘러스 형성율이 낮을 뿐만 아니라 식물체 재분화율도 낮아 전체적으로는 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 시 형질전환 효율도 낮아지는 결과를 초래하여 분자육종의 장애요인으로 작용하고 있다. 지금까지 종자로부터 캘러스 유도효율을 높이기 위해 배지에 첨가하는 식물호르몬 농도를 조절하는 선행연구가 보고된 바 있다 (Toyama et al., 2003; Choi, 2012). 그러나 아직까지 형질전환 효율을 월등히 개선시킬 정도의 조직배양 효율이 증가된 보고는 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 잔디 완숙종자의 종피를 물리적 처리를 실시한 후 캘러스가 형성되는 효율과 식물체 재분화에 미치는 영향에 대해 조사해보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물 재료 및 종자살균

캘러스 유도를 위한 재료로는 들잔디 성숙종자를 사용하였다. 종자로부터 캘러스 유도를 위해 잔디종자를 다음과 같이 살균을 실시하였다. 종자의 종피 제거를 위해 30분

동안 멸균수에 침지한 후, 고무패드를 이용하여 종피를 제거하였다. 종피가 제거된 잔디 종자는 70% (v/v) ethanol에서 1분간 표면살균 후, 멸균수로 3회 세정한 후, 30% (v/v) sodium hypochlorite 용액과 함께 0.01% (v/v) tween 20을 첨가하여 교반기를 이용하여 20분간 표면살균을 실시하였다. 살균된 종자는 멸균수를 이용하여 5회 이상 세정한 후, 멸균된 filter paper로 이동하여 20분 동안 물기를 제거한 다음 캘러스 유도배지에 치상하여 배양실에서 암상태로 배양하였다.

2. 잔디종자의 sea sand 전처리

잔디 성숙종자로부터 캘러스를 유도하기 위해 사용된 배지는 Park (2013)의 방법을 일부 변형하여 2 mg/L 2,4-D, 0.2 mg/L BA, 4 mg/L thiamin-HCl, 100 mg/L α -ketoglutaric acid, 30 g/L sucrose, 3 g/L gelrite 가 함유된 MS 배지 (Murashige and Skoog, 1962)를 사용하였다. 종자와 sea sand 처리는 FINE PCR사의 SH2000 shaker를 사용하였다. 전처리를 위해 사용된 sea sand는 JUNSEI사의 15-20 mesh sea sand를 사용하였다. Sea sand와 종자의 비율을 1:1에서 2:1의 범위 내에서 비교 실시하였다. Sea sand 처리 효과는 종자의 swelling 시간, shaking 속도 및 shaking 시간 등에 따른 차이를 비교하였다. Swelling 처리는 10분~1시간 사이를 처리하였다. Shaking 속도는 shaker의 표시 속도인 3 (500 rpm), 6 (1,000 rpm), 9 (1,500 rpm)으로 설정하여 처리하였으며, shaking 시간은 10분~30분간 처리하였다.

3. 캘러스 유도 및 식물체 재분화

각각의 처리를 실시한 종자는 캘러스 유도배지에 치상하여 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 생장실에서 암조건으로 5주간 배양하였다. 캘러스 유도효율은 50개의 종자 당 캘러스를 형성한 종자수의 평균으로 나타내었으며, 이는 모두 3반복으로 실시하였다. 캘러스로부터 식물체 재분화율은 최적의 조건으로 전처리를 실시한 잔디 성숙종자 유래의 캘러스를 재분화 배지에 치상하여 재분화 된 싹을 가지는 캘러스의 비율을 조사하였다. 재분화 배지는 Park (2013)의 방법을 일부 변형한 배지 (1 mg/L BA, 30 g/L maltose, 3 g/L gelrite가 함유된 MS배지)를 사용하였으며, 치상한 캘러스를 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 16 h light (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) / 8 h dark 조건에서 배양하여 싹형성을 유도한 후 대조구와 비교하여 싹 형성능을 조사하였다. 모든 실험은 3반복으로 실시하였으며 결과는 평균 \pm SE로 나타내었다.

III. 결과 및 고찰

형질전환 효율이 지극히 낮은 화분과 작물인 잔디에 있어서 재분화능과 형질전환 효율이 높은 캘러스의 확보는 성공적인 형질전환을 위해 매우 중요한 요소이다. 예비실험을 실시해 본 결과 본 연구에서 사용한 잔디 완숙종자는 전처리과정 없이 살균종자를 직접 캘러스 유도배지에 치상할 경우 캘러스 유도 비율이 15% 전후로 아주 낮았을 뿐만 아니라 캘러스의 크기도 작은 것을 관찰 할 수 있었다 (결과 미제시). 따라서 본 연구에서는 캘러스 유도율을 높이고 나아가 식물체 재분화율을 높임으로서 잔디 형질전환 효율을 증가시키기 위해 잔디종자에 다양한 물리적 처리를 실시하여 그 결과를 비교해 보았다.

1. Sea sand 전처리에 따른 캘러스 유도율

1) Swelling 처리 시간에 따른 캘러스 유도 효율

잔디 종자에 있어서 캘러스유도 효율을 증진시킬 목적으로 살균한 종자를 캘러스 유도배지에 치상하기 전에 sea sand와 혼합하여 vortexing 처리를 통해 종피에 물리적인 상처를 가함으로써 배지 중의 식물생장호르몬의 종자내로의 흡수를 용이하게 하는 실험을 실시해 보았다. 종자를 sea sand로 전처리하기 전 멸균수 용액내에서 불려지는 swelling 시간에 따른 효과를 조사하기 위하여 swelling 시간을 10분, 30분, 60분 조건으로 3반복으로 처리한 후 캘러스 유도배지에 종자를 치상하여 5주 후 형성되는 캘러스의 비율을 관찰해 보았다. 그 결과 10분간 swelling 처리구에서 40%의 캘러스 유도율이 관찰되어 sea sand 무처리구

의 16.7%에 비해 월등히 높은 캘러스 유도율을 보였으며, 30분 처리구와 60분 처리구에서는 이보다 낮은 유도율을 확인 할 수 있었다 (Table 1). 이러한 결과는 sea sand 처리 전단계에서 실시한 swelling 처리가 종자의 종피를 연화시킴으로서 sea sand 처리 시 물리적 상처 형성 정도가 증가됨으로서 배지물질의 이행을 용이하게 했던 결과로 추측되는 결과이다.

2) Shaking speed에 따른 캘러스 유도 효율

Sea sand와 종자를 함께 shaking하여 전처리하였을 때 shaking speed에 따른 캘러스 유도효율을 보기위해 vortex shaker의 속도를 3 (~500 rpm), 6 (~1,000 rpm) 및 9 (~1,500 rpm)로 설정하여 전처리를 실시하였다. 그 결과 shaking speed 6에서 41.3%로 다소 높은 캘러스 유도율을 나타내었으며 speed 3과 9에서는 이보다 다소 낮은 캘러스 유도율이 관찰되었으나 처리 간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. Shaking speed 3의 경우 육안으로 보아도 속도가 느려 sea sand와 종자간의 마찰이 약한 결과로 추측되며, 반대로 speed 9의 경우 지나치게 빠른 속도로 인해 잔디종자가 오히려 부서짐으로서 종자자체가 발아력을 상실하여 결과적으로 캘러스 유도율이 다소 낮아진 것으로 추측되었다.

3) Shaking time에 따른 캘러스 유도 효율

Sea sand와 종자를 동시에 shaking을 실시하였을 때 shaking 처리 시간에 따른 캘러스 유도효율의 변화여부를 조사하기 위해 처리 시간을 각각 10분, 20분 및 30분 조건으로 하여 실시한 후 캘러스 유도배지에 계대배양하여 캘러스 형성 종자의 비율을 조사하였다. 그 결과, 10분 처리구에서 가장

Table 1. Effect of swelling time before sea sand treatment on callus induction form mature seed of zoysiagrass

Swelling (min)	No. of callus (%)			Average (%)	SE
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3		
0	18	16	16	16.7	0.67
10	44	46	30	40.0	5.03
30	38	34	44	38.7	2.91
60	40	30	40	36.7	3.33

Table 2. Effect of shaking speed during sea sand treatment on callus induction form mature seed of zoysiagrass

Shaking speed	No. of callus (%)			Average (%)	SE
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3		
3 (500 rpm)	28	50	34	37.3	6.57
6 (1000 rpm)	36	34	54	41.3	6.36
9 (1500 rpm)	38	30	30	32.7	2.67

높은 47.3%의 캘러스 유도율을 보여 무처리구 (Table 1)에 비해 거의 3배 정도의 유도율을 보였고, 20분 처리구와 30분 처리구에서는 이보다 다소 낮은 유도율을 나타내었다 (Table 3). Kang et al. (2005)는 한국잔디의 경우 파종 전에 적절한 종자처리를 하지 않으면 발아가 저조해진다고 하였다. 이를 보완하기 위해 지금까지 물리적, 화학적 처리 또는 프라이밍과 같은 생물적 처리를 통해 종피를 연화시켜 잔디종자의 휴면성을 타파하여 발아율을 높이고 있다 (Han et al., 2014). 본 실험에서 사용한 sea sand 처리는 잔디 완숙종자의 종피에 미세상처를 발생시키거나 연화시킴으로써 배지 중의 첨가물질의 침투성이 개선되어 세포의 활력이 증가됨으로써 세포분열이 왕성해져 캘러스 유도율이 증가된 것으로 추측된다.

4) Sea sand와 종자의 비율에 따른 캘러스 유도 효율

Sea sand와 종자의 비율 변화에 따른 캘러스 유도 효율을 관찰하기 위해 sea sand와 잔디종자의 비율을 각각 1:1, 1.5:1, 2:1로 하여 shaking 처리를 실시하였다. 그 결과 sea sand와 종자의 비율이 1:1과 1.5:1 처리구의 경우에서 높은 캘러스 유도율을 나타내었으며 이 보다 더 높은 비율의 2:1 처리구의 경우 오히려 유도율이 다소 저하되는 것이 관찰되었다 (Table 4). 이러한 결과는 아마도 지나치게 많은 양의 sea sand로 인해 잔디 종자의 종피가 과도하게 처리되어 종자의 viability가 오히려 감소한 때문으로 추측된다.

2. 전처리를 통해 유도된 캘러스로부터 식물체 재분화

캘러스로부터 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사하기

위하여 일반적인 캘러스 유도방법이 아닌 sea sand 전처리한 종자유래 캘러스를 이용하였다. 잔디 살균 종자에 swelling 10분 처리 후, sea sand와 종자의 비율을 1:1로 하여 shaking speed 6에서 10분을 조건으로 전처리를 실시하였다. 전처리한 잔디종자를 캘러스 유도배지에 치상하여 약 5주 동안 배양하여 유도된 캘러스를 재분화 배지 (Park, 2013)에 치상하여 2주 후에 신초를 형성하는 캘러스의 비율을 관찰 하였다. 그 결과, 대조구에 비해 sea sand 전처리구에서 유도된 캘러스로부터 신초가 형성되는 비율이 약 20% 정도 더 증가되는 것을 확인할 수 있었으며 육안으로도 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 이러한 결과는 sea sand를 처리를 통해 유도된 캘러스가 훨씬 더 높은 재분화능을 가짐으로 인한 결과로 추측되며, 이러한 재분화율의 증가는 추후 형질전환효율을 증가시켜 외래유전자 도입을 통한 잔디 분자육종에 있어서 큰 도움이 될 것으로 기대된다.

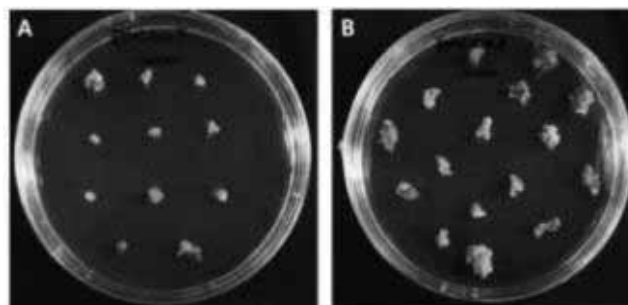


Fig. 1. Shoot regeneration from embryogenic callus induced from sea sand pre-treated mature seed. (A) Control (without sea sand treatment); (B) shoot regeneration from sea sand-treated callus.

Table 3. Effect of shaking time during sea sand on callus induction form mature seed of zoysiagrass

Shaking time (min)	No. of callus (%)			Average (%)	SE
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3		
10	54	44	44	47.3	3.33
20	34	48	40	40.7	4.06
30	40	46	42	42.7	1.76

Table 4. Effect of ratio of sea sand to seed during pre-treatment on callus induction form mature seed of zoysiagrass

Sea sand/Seed (v/v)	No. of callus (%)			Average (%)	SE
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3		
1	44	28	40	37.3	4.81
1.5	48	34	28	36.7	5.93
2	26	20	26	24.0	2.00

IV. 요약

잔디에 있어서 낮은 형질전환 효율의 직접적인 원인 중 하나인 낮은 캘러스 유도율과 식물체 재분화율을 개선시키기 위하여 잔디 완숙종자의 전처리의 효과를 비교해 보았다. 살균한 잔디종자에 swelling 처리를 10분간 실시한 후, sea sand를 이용 하여 sea sand와 종자의 비율을 1:1로 한 다음, shaking 처리는 vortex speed 6 (1,000 rpm)에서 처리시간은 10분간 전처리를 실시하였을 때 무처리구에 비해 2배 이상의 배양 효율을 나타내었다. 또한 sea sand로 전처리한 잔디종자로부터 형성된 캘러스를 식물체 재분화 유도 배지에 치상했을 그 효율이 훨씬 더 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 연중 아무 때나 이용할 수 있는 장점을 지닌 잔디 완숙종자로부터 유도시킨 캘러스 세포를 이용하여 *Agrobacterium*으로 형질전환하는데 있어서 그 효율을 향상 시키는데 큰 기여를 할 것으로 추측된다.

V. 사사

본 연구는 국립산림과학원 (남부산림연구소) 연구과제 지원에 의해 이루어진 것임.

VI. REFERENCES

- Carmo-Silva, A.E., Keys, A.J., Beale, M.H., Ward, J.L., Baker, J.M., Hawkins, N.D., Arrabaça, M.C. and Parry, M.A.J. 2009. Drought stress increases the production of 5-hydroxynorvaline in two C4 grasses. *Phytochemistry* 70:664-671.
- Choi, C.H. 2012. Effect of temperature and various pre-treatments on germination of *Hippophae rhamnoides* seeds. *Korean Journal of Plant Research* 25:132-141.
- Dhital, D., Yashiro, Y., Ohtsuka, T., Noda, H., Shizu, Y. and Koizumi, H. 2010. Carbon dynamics and budget in a *Zoysia japonica* grassland, central Japan. *Journal of Plant Research* 123:519-530.
- Han, J.J., Lee, G.S., Park, Y.B., Yang, K.M. and Bae, E.J. 2014. Comparison of germination characteristics and various pre-treatment methods for enhancing germination on zoysiagrass. *Weed & Turfgrass* 3(3): 232-239.
- Ito, T.Y. and Takatsuki, S. 2005. Relationship between a high density of sika deer and productivity of the short-grass (*Zoysia japonica*) community: a case study on Kinkazan Island, northern Japan. *Ecology Research* 20:573-579.
- Kang, K.S., Ahn, C.K., Lee, J.W., Choi, Y.W., Son, B.G., et al. 2005. Effects of seed coat scarification on improved germination in Korean lawngrass. *Korean Journal of Horticulture Science and Technology* 21:75 (Abstract). (In Korean)
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Osborne, C. P. and Freckleton, R. P. 2009. Ecological selection pressures for C4 photosynthesis in the grasses. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276:1753-1760.
- Park, M. Y. 2013. Improvement of transformation protocol for *Zoysia japonica* Steud. and production of transgenic zoysiagrass introducing abiotic stress-related genes. Ph.D. thesis, Jeju, Korea.
- Sugihara, S., Kobayashi, M., Ebina, M., Tsurumi, Y., Ooya, I. and Nashiki, M. 1999. Review of researches concerning *Zoysia* in Japan. *Grassland Science* 45:105-112.
- Sun, H.J., Song, I.J., Bae, T.W. and Lee, H.Y.. 2010. Recent developments in biotechnological improvement of *Zoysia japonica* Steud. *Journal of Plant Biotechnology* 37:400-407.
- Toyama, K., Bae, C.H., Kang, J.G., Lim, Y.P., Adachi, T., Riu, K.Z., Song, P.S. and Lee, H.Y. 2003. Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecules and Cells* 16:19-27.
- Sim, K.Y., Kim, H.J., Ham, S.K., Choi, J.S. and Sim, S.R. 1998. Construction and management of turfgrass ground. In *Research Report of Korea Institute of Sport Science*. Seoul. pp.95-97.
- (Received November 17, 2015 / Revised November 27, 2015 / Accepted December 1, 2015)