

## 들잔디 종자로부터 캘러스 유도 및 식물체 재분화

임용우 · 김기용 · 최기준 · 임영철 · 성병렬

### Callus Induction and Plant Regeneration from seeds of *Zoysia japonica* Steud.

Yong-Woo Rim, Kee-Yong Kim, Gee-Jun Choi, Young-Chul Lim and Byung-Ryul Sung

#### Abstract

Conditions for callus induction and plant regeneration from seeds of lawngrass (*Zoysia japonica* Steud.) were confirmed in this study. MS (Murashige and Skoog) medium containing 2,4-D 3 or 5mg/l was used for callus induction, and MS medium with different volumes of BA, NAA and kinetin hormones was used to regenerate the plants from induced calli. MS basic medium containing agar with no hormones or kinetin 1.0mg/l and MS basic medium containing gelite and NAA 1.0mg/l were higher for green callus induction. MS medium containing agar and kinetin 1.0mg/l was highest degree of efficiency for plant regeneration.

(Key words : Callus induction, Plant regeneration, *Zoysia japonica*)

#### I. 서 론

잔디란 지면을 덮고 있는 수많은 초본류의 지피 식물(地皮植物, ground cover plant) 중에 짧은 예초에 견디는 능력이 높은 것과 질감이 좋은 초종을 일컫는다. 잔디는 서구라파의 사료작물 목초지에서 밟압(trampling) 및 방목조건하에서 지표면을 완전히 피복하는 특성이 강한 목초 초종이 잔디로 선발육종되어 이용되기 시작하였으며, 전체 화분과 작물 25과(Tribes), 600속(Genera), 7,500종(Species) 중에서 약 30~40여종만이 실제 잔디로 이용되고 있다.

잔디는 경관 미화 및 심리기능 강화, 토양 및 수자원보호, 공기정화, 기온조절, 소음제거, 신변보호 등 여러 가지 면에서 인간에게 혜택을 주고 있으며, 도로, 항만, 철도, 비행장의 토양침식 및 비사방지로부터 묘지, 주택, 공원, 정원, 스포츠 경기장, 골프장 등으로 이용범위가 급격히 넓어지고 있다. 외국은 최근 고품질 잔디는 물론 환경오염과 병충해에 강하고, 에너지 절약 및 낮은 관리비에 견디는 품종의 개발이 강하게 요청되고 있어

잔디에 대한 육종이 활발히 진행되고 있으나, 우리나라의 경우는 잔디의 체계적인 육종이 이루어지고 있지 않아 우수한 한국잔디 육종자원이 외국으로 유출된 실정이며, 국내 품종개발도 부족하여 특허권이 설정되어있는 외국 잔디 품종들의 국내 도입이 증가하고 있다.

들잔디(*Zoysia japonica* Steud.)는 한국을 포함한 동남아 지역에서 재배되고 있는 한국잔디 중의 하나로 열, 가뭄 및 염분에 대하여 내성이 뛰어나고, 일반적으로 병해와 충해에 강한 잔디이다. 그러나, 몇몇 병충해에 관하여 민감한 반응을 보이고 있어서 그에 관한 연구가 시급히 요구되어지고 있다 (Inokuma 등, 1996, 1998).

들잔디는 배에서 유도된 캘러스로부터 식물체가 재분화되는 것으로 보고되었지만(Asano, 1989), 잔디 재분화에 관한 조직배양 연구가 절대적으로 부족한 실정이다. 잔디 재분화에 관한 연구는 Al-Khayri 등 (1989)과 Asano(1991)가 잔디류의 배로부터 발생된 캘러스로부터의 식물체를 재분화하였다고 보고하였고, Tanpo 등 (1994) 및 Zhong 등 (1993)은 잔디류의 식물체 재분화에 관한 효율적인

체계와 이를 통한 형질전환 식물체 생산을 보고하였다.

본 실험은 들잔디에 대한 캘러스 유도 및 재분화 조건을 확립하여 효율적인 재분화가 가능하도록 하므로써 생명공학을 포함한 첨단기술을 이용한 새로운 품종 개발을 위한 기초자료로서 활용하고자 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 식물재료 및 종자소득

잔디 종자로부터 캘러스 유도조건 및 식물체 재분화 조건을 확립하기 위한 식물재료로서 들잔디 품종 *Zenith* 종자를 공시하였다. 이 품종의 종자를 70% 에탄올에서 1분, 0.1% SDS/HgCl<sub>2</sub> 용액에서 2시간, 1% NaOCl에서 1시간 소독한 다음, 멸균수로 3회 씻어내었다.

### 2. 캘러스 유도 및 증식

소독한 종자로부터 캘러스를 유도함에 있어 agar 배지에 종자를 직접 치상하여 28℃, 광조건에서 배양하여 shooting을 유도한 후 기본 배지인 MS (Murashige 및 Skoog, 1962) 배지에 2,4-D(2,4-dichlorophenoxy acetic acid) 3mg/l를 첨가한 MS3 또는 5mg/l를 첨가한 MS5배지에 옮겨서 캘러스를 유도하였다. 모든 배지는 pH 5.8, agar 농도는 0.8%로 조절하였다.

유도된 캘러스는 식물체의 재분화에 이용하기 위해 유도배지에서 20일 간격으로 3회 계대배양한 후 사용되었다.

### 3. 캘러스로부터 식물체의 재분화

유도된 캘러스로부터 식물체 재분화를 위한 최적조건을 찾기 위해 기본배지는 MS배지를 사용하였고. BA(Benzyle adenin) 농도를 0, 0.1, 1.0mg/l와, NAA(1-naphtalene acetic acid) 농도를 0, 0.1, 1.0mg/l로 혼용처리하였고, kinetin농도는 0, 0.1, 1.0mg/l로 단용처리하였다. 첨가된 호르몬을 다시 지지물인 agar(8g/l) 처리구와 gelite(2.4g/l) 처리구로 다시 나누어 각각 조합된 처리조건에서 식물체 재분화 정도를 조사하였다. 재분화 배지로 옮겨준 캘러스의 크기는 직경 5mm로 했으며, 16시간의

광조건(2,500Lux)에서 26℃로 조절되는 생장실에서 배양하였고, 캘러스를 재분화 배지로 옮겨진 60일째에 형성된 shoot 및 root의 비율을 재분화율로 하였다.

## III. 결과 및 고찰

캘러스 유도 및 증식을 위해 agar만 첨가된 배지에서 종자를 직접 치상하여 shooting을 유도한 후 MS3 또는 MS5배지(MS기본배지에 2,4-D 3.0 또는 5.0mg/l 첨가)에 옮겨서 캘러스를 유도하였는데, 종자 치상 후 한달이내에 대부분의 종자들이 캘러스를 형성하였다. 캘러스 유도의 경우 MS기본배지에 2,4-D의 첨가가 필수적이라고 하겠는데 일반적으로 1.0 ~ 5mg/l 정도를 첨가하는 것이 효과적이라는 보고들이 있다(Inokuma 등, 1996; Masahiko Tamaki 등, 1997). 식물체 재분화를 유도하기 위해 사용된 캘러스는 캘러스 형성 후 3회 계대배양한 후 증식하여 사용하였으며, MS기본배지에 agar와 gelite를 각각 첨가하여 오옥신류의 NAA와 사이토키닌류인 BA의 서로 다른 농도(0~1.0mg/l)를 혼용처리하였고, kinetin(0~1.0mg/l)를 단용처리하여 재분화 정도를 조사하였다.

각각의 호르몬 처리에 배양한지 60일 후에 조사한 결과, 캘러스는 시간이 지남에 따라 녹색을 띤 green callus와 yellow callus로 구분되었다. BA와 NAA의 혼용처리구에서는 control로 호르몬이 무처리된 agar사용배지에서 green callus의 형성율이 94%, gelite사용 배지에서는 64%로 왕성하였으나, yellow callus의 형성비율은 agar 및 gelite 사용배지에서 모두 낮았다. BA 0mg/l 및 NAA 0.1mg/l의 혼용처리구에서는 green callus의 형성율이 agar배지에서는 45%, gelite배지에서 60%이었으며, yellow callus는 agar배지에서 55%, gelite배지에서 40%로 양호한 생장을 나타내었다. 그리고 BA 1.0mg/l 및 NAA 0mg/l 처리구에서는 모든 캘러스가 고사하여 (Table 1), BA의 농도가 1mg/l까지 높아질 때 green callus의 형성율은 낮았고 대부분 고사하는 경향이 있었다.

BA 및 NAA의 혼용처리구에서 식물체 지지물을 agar와 gelite 2가지로 나누어 실험하였는데, green callus는 agar배지보다 gelite를 사용한 배지에서 더욱 많이 발생하였다. Kinetin의 단용처리구에서 green callus는 kinetin 1.0mg/l의 agar배지에서 99%로 가장 왕성하였고, 농도가 같을 때 gelite 사용배

지보다 agar 사용배지에서 생육이 더욱 왕성하였다 (Table 1).

재분화 후의 잎 형성율을 보면, kinetin 0.1mg/l 일 때 agar배지에서 10%, gelite배지는 5%로 가장 양호하였고, kinetin 및 BA 호르몬의 농도가 증가할수록 잎 형성율이 증가하는 경향을 나타내었는데, 이 결과는 Masahiko Tamaki 등(1997)이 줄기 끝세포로부터 캘러스를 유도하여 유도된 캘러스를 90일간 배양한 BA 및 NAA의 혼용처리구 중에서 BA농도가 1.0mg/l 그리고 NAA농도가 0.1mg/l이었을 때 잎의 재분화율이 좋았다는 보고와 비슷한 경향을 나타낸 것이다. 뿌리 형성율 또한 agar배지에서 6%, gelite배지에서 4%로 잎 및 뿌리 형성율

모두 agar배지가 gelite배지보다 높았다(Table 2). 잎 및 뿌리 형성율이 전체처리구 중 agar배지의 kinetin 0.1mg/l 처리구가 가장 양호한 것으로 나타났다(Table 2). 호르몬의 농도가 높아질수록 재분화 캘러스의 고사율은 증가하는 경향을 나타내었다.

Fig. 1은 캘러스 유도부터 재분화까지의 과정을 사진으로 나타낸 것이다. Fig. 1A는 발아된 종자를 캘러스 유도배지에 치상 후 캘러스가 형성되는 것을 보여주고 있으며, Fig. 1B는 형성된 캘러스를 증식배지에 옮겨 증식하여 재분화를 유도하는 사진이며, Fig. 1C는 재분화가 완성된 식물체 사진이다.

Table 1. Callus induction frequencies by different combinations of hormones and media

Hormones(mg/l)			Agar medium		Gelite medium	
Kinetin	BA	NAA	Green callus	Yellow callus	Green callus	Yellow callus
			..... % .....		..... % .....	
0.0	0.0	0.0	94	6	64	36
0.0	0.0	0.1	45	55	60	40
0.0	0.0	1.0	23	25	68	32
0.0	0.1	0.0	0	0	0	15
0.0	0.1	0.1	36	64	70	30
0.0	0.1	1.0	6	15	0	27
0.0	1.0	0.0	0	0	0	0
0.0	1.0	0.1	0	61	6	15
0.0	1.0	1.0	17	40	33	17
0.1	0.0	0.0	43	57	6	2
1.0	0.0	0.0	99	1	6	17

Table 2. Percentages of shooting and rooting by different combinations of hormones and media

Media	Hormones(mg/l)			Percentage(%) of shooting	Percentage(%) of rooting
	Kinetin	BA	NAA		
Agar	0.0	0.1	1.0	4	2
	0.0	1.0	0.1	8	0
	0.1	0.0	0.0	10	6
Gelite	0.0	0.0	1.0	4	0
	0.1	0.0	0.0	5	4

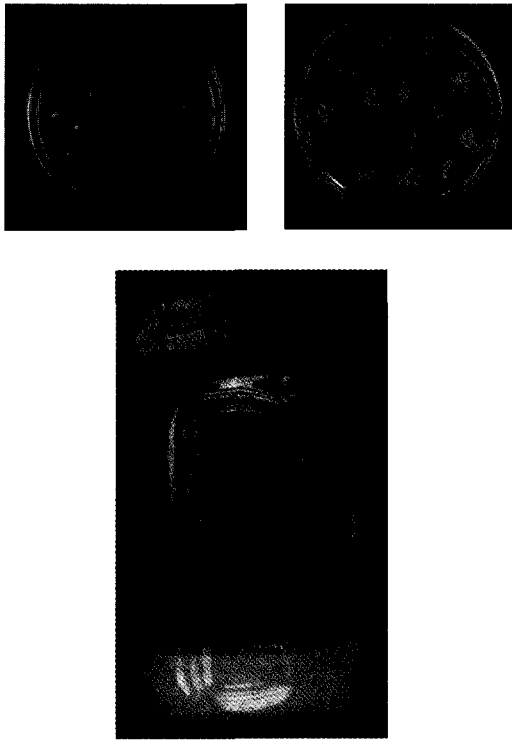


Fig. 1. Plant regeneration from seed-derived calli of *Zoysia japonica*. [A] callus formation from seed cultured on medium. [B] callus duplication and regeneration and [C] regenerated plantlet from seed-derived calli.

#### IV. 적 요

들잔디(*Zoysia japonica*) 종자로부터 형성된 캘러스로부터 식물체 재분화 조건을 확립하기 위하여 본 실험이 수행되었다. 식물체 재분화를 유도하기 위해 사용된 캘러스는 형성 후 3회 계대배양한 후 사용하였으며, 본 실험에서는 MS기본배지에 옥신류의 NAA 0, 0.1, 1.0mg/l과 사이토키닌류인 BA 0, 0.1, 1.0mg/l를 혼용처리하였고, kinetin을 0, 0.1, 1.0mg/l을 단용처리하여 재분화정도를 조사하였다.

각자의 호르몬 처리에 배양한지 60일 후에 조사한 결과, BA와 NAA의 혼용처리구에서는 control로 호르몬이 무처리된 agar사용배지에서 green callus가 94%, gelite사용 배지에서는 64%로 왕성하였고, BA 0mg/l 및 NAA 0.1mg/l의 혼용처리에서 green callus가 agar배지에서는 45%, gelite배지에서는 60%이었으며, yellow callus는 agar배지에서 55%, gelite배

지에서 40%로 양호한 성장을 나타내었다. 그리고 BA 1.0mg/l 및 NAA 0mg/l 처리구에서는 모든 캘러스가 고사하였다.

BA와 NAA의 혼용처리구에서 식물체 지지물을 agar와 gelite 2가지로 나누어 실험하였는데 green callus는 agar배지보다 gelite를 사용한 배지에서 더욱 많이 발생하였다. Kinetin의 단용처리에서 green callus는 kinetin 1.0mg/l의 agar배지에서 99%로 가장 왕성하였고, 농도가 같을 때 gelite 사용배지보다 agar 사용배지에서 생육이 더욱 왕성하였다.

재분화 후의 잎 형성율을 보면, kinetin 0.1mg/l일 때 agar배지에서 10%, gelite배지에서 5%로 가장 양호하고, 뿌리 형성율 또한 agar배지에서 6%, gelite배지에서 4%로, 잎 및 뿌리 형성율 모두 전체처리구 중 agar배지 kinetin 0.1mg/l가 가장 양호한 것으로 나타났다.

#### V. 인 용 문 헌

1. Asno. Y. 1989. Plant Cell Report. 8:141-143.
2. Asno. Y. 1991. Biotechnology applications in turfgrass breeding. J. Agri. Sci. 46:543-547.
3. Al-Khayri J.M., F.H. Muang, L.F. Thompson and J.W. King, 1989. Plant regeneration of *Zoysia*-grass from embryo derived callus. Crop Sci. 29: 1324-1325.
4. Inokuma, C., Kiyoyuki Sugiura, Chol Cho, Ryoji Okawara and Seiji Kaneko, 1996. Plant regeneration from protoplasts of Japanese lawngrass. Plant Cell Report. 15:737-741.
5. Inokuma, C., K. Sugiura, N. Imaizummi and C. Cho. 1998. Transgenic Japanese lawngrass(*Zoysia japonica*) plants regenerated from protoplasts. Plant Cell Reports. 17:334-338.
6. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant. 15:473-497.
7. Masahiko Tamaki, Huibao Lou and Shunji kako. 1997. Callus induction and plant regeneration from shoot Tip of *Zoysiagrass*. J. Japan Soc. Turfgrass Sci. 25:154-156.
8. Tanpo, Ho, H. Toyoda, T. Nonomura and S. Ouchi. 1994. Callus induction and plant regeneration in *Zoysiagrass*(*Zoysia japonica* steud). J. Japon. Soc. Turfgrass Sci. 23:27-30.
9. Zhong, H., M.G. Bolyard, C. Sriuivasan and M.B. Sticklen. 1993. Transgenic plants of turfgrass (*Agrostis palustris* Huds) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Report. 13:1-6.