

자생 왕포아풀(*Poa pratensis* L.)의 배발생 캘러스 유도 및 식물체 재분화

이재신 · 심상렬¹ · 안병준*
단국대학교 생명자원과학부, ¹충주대학교 조경학과

Embryogenic Callus Induction and Plant Regeneration in Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) Native to Korea

LEE, Jae Sin · SHIM, Sang Ryul¹ · AHN, Byung Joon*

Division of Bioresources Science, Dankook University, Cheonan, 330-714, Korea

¹Department of Landscape Architecture, Chongju University, Chongju, 360-764, Korea

ABSTRACT Embryogenic callus induction and plant regeneration methods were developed for native Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) ecotypes. Mature caryopses and immature inflorescences (20 mm in length) of 4 native ecotypes and 5 foreign cultivars were plated on MS medium (30 g/L sucrose, 3 g/L Phytigel) supplemented with 1 mg/L 2,4-D, and cultured in the dark at 24°C. Most explants formed calli, but more embryogenic calli were induced from the explants of immature inflorescences than caryopses which produced mostly non-embryogenic rooty calli. In P77 ecotypes, immature inflorescence explants formed embryogenic calli with the rate of 62~95%, and those of field-grown plants were more efficient than greenhouse-grown ones in embryogenic callus induction. Plantlets were regenerated from the embryogenic calli when they were transferred to hormone-free MS medium, and grew to maturity without morphological variations in greenhouse.

Key words: Gramineae, monocot, tissue culture, turfgrass

잔디는 화본과의 다년생 초종으로서 재배 적온에 따라 한지형 잔디 (Cool season turfgrass)와 난지형 잔디 (Warm season turfgrass)로 구분된다. 왕포아풀은 대표적인 한지형 잔디의 하나로 Kentucky bluegrass로 널리 알려져 있다. 우리나라에는 왕포아풀 (*Poa pratensis* L.; Kentucky bluegrass), 새포아풀 (*Poa annua*; annual bluegrass), 큰새포아풀 (*Poa trivialis*; rough bluegrass), 좁포아풀 (*Poa compressa*; Canada bluegrass) 등 21종의 포아속 식물들이 전국적으로 분포하고 있으며 그 형태 및 생육에 있어 많은 변이를 나타내고 있다. 이 중에서도 왕포아풀 또는 왕꾸러미풀로 불리는 Kentucky bluegrass의 생태형이 광범위하게 분포하고 있다 (Do and Lim 1988 ; Lee 1979).

최근 들어 운동, 휴식 및 레크리에이션을 위한 공간들의 다양한 개발과 2002년 월드컵을 대비하여 녹색 상태로 생육기

간이 길며 우리나라 기후에 적응성이 뛰어난 왕포아풀에 대한 요구가 급속히 증대되고 있다. 현재 국내에서 이용되는 왕포아풀은 전량 외국에서 도입되고 있는데 우리나라의 기후 특성에 적응된 품종이 아니기 때문에 하절기의 고온다습 조건 하에서 생육이 급속하게 쇠퇴하거나 심한 병발생으로 고사할 수 있다. 이에 따른 농약의 과다살포가 환경문제를 초래할 수 있기 때문에 관리가 용이한 내병성 및 내환경성 품종의 육종과 함께 내병성 및 내환경성 유전자를 도입하는 형질 전환 연구가 요구되고 있다.

왕포아풀의 형질전환을 위한 조직배양 연구로서 종자의 성숙배, 경정, 원형질체, 미숙화서 등의 절편체로부터 callus를 유도하고 식물체를 재분화시킨 여러 연구결과가 보고된 바 있다 (McDonnell and Conger 1984; Wu and Jampates 1986 ; Valk와 Zaal 1988 ; Valk et al. 1989). 종실을 절편체로 이용하여도 재분화성 캘러스가 유도되지만 (McDonnell and Conger, 1984), Valk 등 (1989, 1995)은 종자보다 미숙화서를

*Corresponding author. Tel 041-550-3641 Fax 041-553-1618
E-mail bjahn@anseo.dankook.ac.kr

절편체로 이용하였을 때 식물체 재분화가 더 높은 효율로 일어난다고 하였다. Ke 와 Lee (1996)는 잎, 줄기보다는 종실과 엽초 절편체로부터 식물체 재분화율이 높은 기관형성형 캘러스가 유도되었다고 하였다. 왕포아풀의 캘러스 유도에는 2~3 mg/L의 2,4-D와 picloram이 효과적이지만 (McDonnell and Conger 1984, Ke and Lee, 1996), 기관분화를 통한 식물체 재분화가 일어난 캘러스는 0.2 mg/L picloram과 0.01 mg/L NAA 혼용처리에서 가장 효과적이라고 하였다. 국내에 서식하는 왕포아풀의 생태형들도 다양한 정도의 단위생식 정도를 보이기는 하지만 계통에 따라 종자 외에도 영양조직인 미숙화서를 이용하는 배발생 캘러스 배양 방법이 필요하나 아직 국내에서는 왕포아풀의 육종이나 조직배양 연구가 미흡하다.

본 연구는 국내에서 수집된 왕포아풀 자생종의 형질전환 육종에 적용할 수 있는 배발생 조직배양 방법을 개발하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

자생 왕포아풀 수집

1995년 4월 5일부터 약 20여 회에 걸쳐 전국에서 수집한 *Poa*속 식물 중 108개의 왕포아풀 생태형과 국내에 도입되는 대표적인 품종 5가지를 포함한 총 113계통을 충남 부여군 세도면 소재 세원식물연구소의 시험포장에서 현지 외 보존하며 관리하였다. 각 계통들을 1×1 m의 시험구에 식재하고 시비는 일반적인 관리 수준 (3~4회/년, 30~40 g/m²/회, 18-18-18 복비기준)으로 하였다. 관수는 자연 강우에 의존하였으며, 연 2~3회 예초를 실시하였다.

배발생 캘러스의 유도

수집된 자생 왕포아풀 생태형 중 잔디로서의 특성이 우수한 P38, P58, P77, P129계통과 도입 품종인 'Destiny', 'Glade', 'Nassau', 'Cheri', 'Midnight' 등 5품종을 실험식물로 사용하였다. 'Nassau', 'Cheri', 'Midnight'의 완숙종자와, 'Destiny', P129의 미숙화서를 절편체로 사용하였고 'Glade', P77은 완숙종자와 미숙화서를 사용하여 절편체에 따른 배발생 캘러스의 형성률을 조사하였다. 미숙화서는 2001년 2월 27일부터 4월 27일까지 4회에 걸쳐 온실과 시험포에서 재배하며 형성된 길이 20 mm 이하의 미숙화서를 채취하여 절편체로 사용하였으며, 계통 및 화퇴 채취시기별 배발생 캘러스의 형성률을 조사하였다.

성숙배를 이용한 캘러스 유도는 시험포에서 결실된 종자를 6월경 수확해 사용하였다. 70% ethyl alcohol에서 1분, 0.5% sodium hypochlorite 용액에서 15분간 진탕 처리한 후 3회 이상 멸균수로 세척하여 표면 멸균하였고, 미숙화서가 발달하

고 있는 줄기를 채취하여 70% ethyl alcohol에서 30초, 0.5% sodium hypochlorite 용액에서 10분간 표면 살균한 후 clean bench에서 미숙화서를 적출하여 배양에 이용하였다. 절편체들은 sucrose 30 g/L, Phytigel (Sigma, USA) 3 g/L와 2,4-D가 1 mg/L가 함유된 MS 배지를 50 ml 넣은 150×15 mm 페트리디쉬에 8개씩 절편체를 치상하였고 25°C 암상태의 항온실에서 배양하였다. 모든 배양실험은 3회 이상 반복하였다.

식물체 재분화 및 증식

치상 1주일 후부터 캘러스의 형성 여부를 조사하기 시작하였다. 유도된 캘러스는 3주 간격으로 동일한 배지에 계대배양하였다. 유도된 배발생 캘러스 중 일부를 액체 캘러스 증식배지가 50 ml 첨가된 250 ml flask에서 100 rpm 속도로 회전진탕배양하였으며 계대배양은 일주일 간격으로 실시하였다. 캘러스의 재분화능은 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지에 이식하여 확인하였다. 재분화된 식물은 발효과 모래를 1:1로 섞은 상토를 넣은 화분에 이식하여 20~35°C로 유지되는 온실에서 자연조건의 일장으로 재배하였다.

결과 및 고찰

왕포아풀 미숙화서 및 미숙배 절편체들을 2,4-D가 1 mg/L 함유된 MS 배지에 치상하여 1주일 정도면 캘러스가 형성되기 시작하였다. 배양 2개월 후에는 대부분의 미숙화서 절편체에서 캘러스가 형성된 반면 종실의 캘러스 유도율은 낮았다 (Figure 1A). 이들 중에서 세포피 사이에 갈색 물질의 축적이 두드러진 배발생 캘러스들의 유도가 확인되었다. 배발생 캘러스들은 구상의 작은 세포들로 구성되어 희고 단단하며 흑과 같은 형태를 보였으며, 비배발생 캘러스와 함께 유도되었다 (Figure 1B). 배발생 캘러스의 작은 흑상의 조직들은 연결되어 있지 않아 쉽게 분리되는데 반면에 비배발생 캘러스 조직은 모상근으로 둘러싸인 뿌리의 발달이 심하게 일어나며, 캘러스 표면이 거칠고 조직이 부드럽게 젖어 있는 형태를 보여 주었다 (Figure 1C).

유전형과 절편체에 따른 배발생 캘러스 형성 정도를 알아보기 위한 실험에서 완숙종자를 절편체로 사용했을 때 주로 배 부위에서 캘러스가 형성되었으며, 대부분 비배발생 캘러스의 발달이 많았다. 배발생 캘러스는 'Nassau'와 'Midnight'에서 0.8~3.1%의 낮은 유도율을 보였다. 미숙화서를 절편체로 사용했을 때는 11~30%의 높은 효율로 배발생 캘러스가 유도되었으며, 수집종인 P77에서 배발생 캘러스 형성률이 가장 높았다. 다음으로 'Glade', 'Destiny' 순으로 높은 배발생 캘러스 유도율을 보여 미숙화서가 왕포아풀의 배발생 배양에 효과적인 절편체임이 확인되었다 (Figure 2). 미숙화서만을 절편체로 이용하여 유전형별 배발생 캘러스 유도율을 조사한

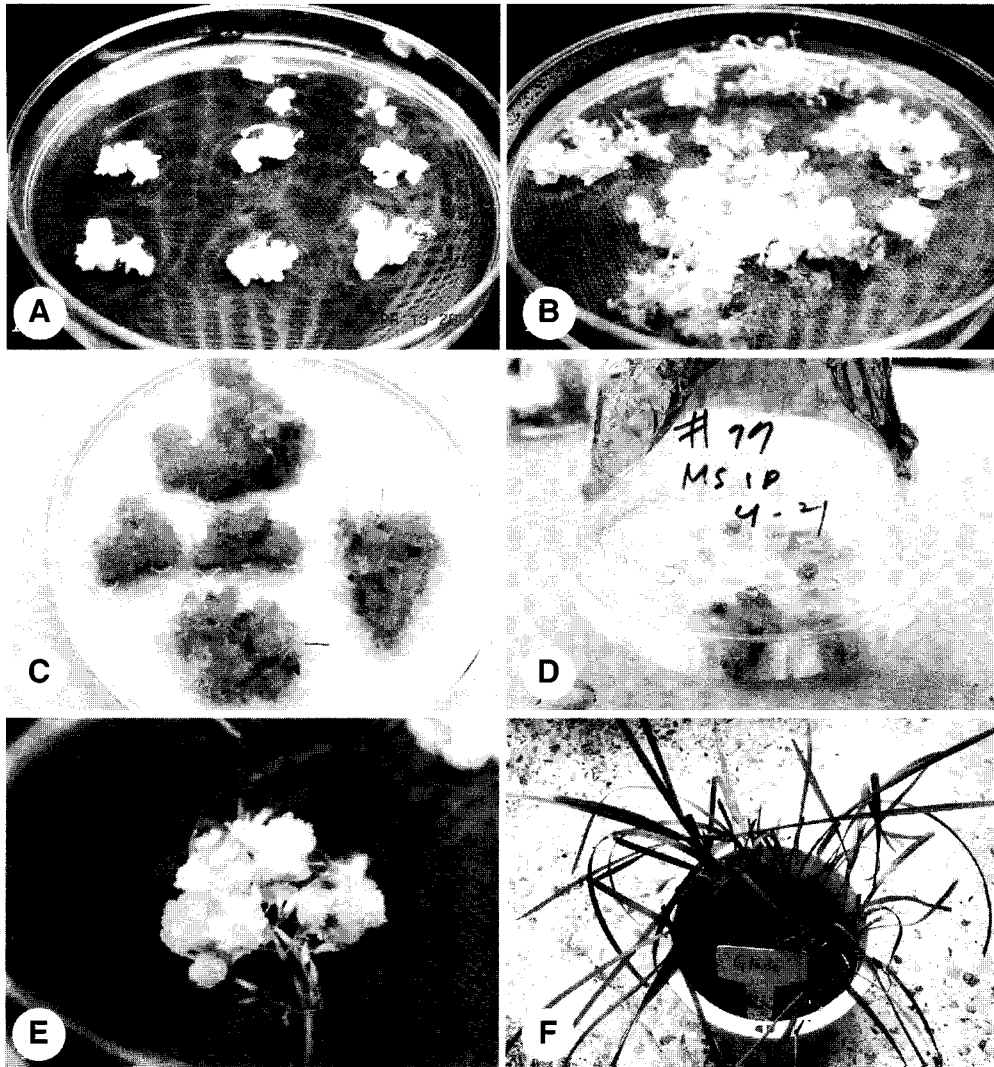


Figure 1. Embryogenic callus induction and plant regeneration in *Poa pratensis* L. ; (A) Calli induced from immature inflorescences after three weeks in culture, (B) Embryogenic calli with high embryogenic competence, (C) Rooty calli mostly formed from the explants of mature caryopses, (D) Liquid culture of the embryogenic calli, (E) Plantlet regeneration through somatic embryogenesis, (F) Regenerated plants growing in a green house.

결과 전체적으로 68~98%의 높은 효율을 보였으며, 유전형 간의 차이는 두드러지지 않았다 (Table 1).

치상시기별 모본식물의 상태 및 배발생 캘러스의 유도율을 비교한 실험에서 배발생 캘러스의 형성률은 62~95%로 전체적으로 높았다. 시험포에서 재배되어 자연 유도된 미숙화서를 이용하여 4월 24일에 치상하였을 때 95%로 가장 높은 형성률을 보였다. 온실에서 화분재배되어 유도된 미숙화서는 2월 27일에 치상하였을 때 배발생 캘러스의 형성률이 62%로 비교적 낮았다. 따라서 동절기 온실 재배한 식물보다는 포장에서 채취한 미숙화서가 배발생 캘러스 유도에 더 효과적임을 확인할 수 있었다. 그러나 그 차이는 크지 않았고 온실에서는 동절기 중 쉽게 화서 발달을 촉진할 수 있는 장점이 있었다 (Table 2).

배발생 캘러스는 계대배양을 통해 6개월 이상 배발생능을 유지하며 증식할 수 있었다. 캘러스 증식배지에서도 캘러스 증식과 함께 자발적인 식물체 재분화가 일어나는 반면에 액

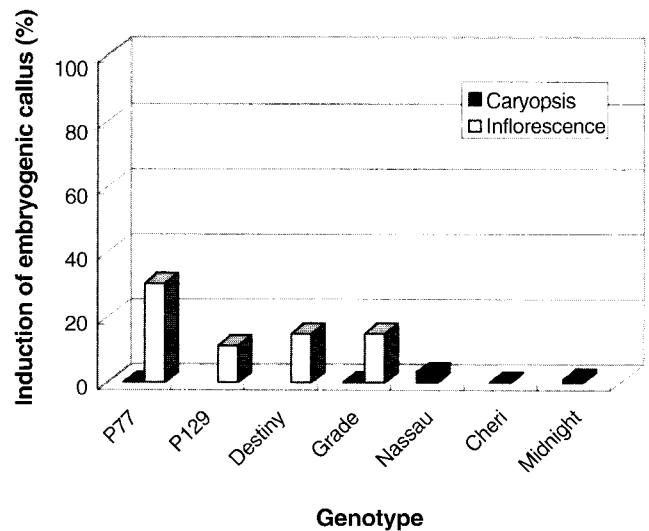


Figure 2. Rates of embryogenic callus induction from the caryopses or immature inflorescences of *Poa pratensis* on MS medium supplemented with 1 mg/L of 2,4-D.

Table 1. Embryogenic callus induction from immature inflorescences of various genotypes of *Poa pratensis* L.^a

Genotype	Total No. of cultured explants	Ave. No. of explants forming callus/petridish	Callus induction (%)	Ave. No. of embryogenic callus/petridish	Embryogenic callus induction (%)
Glade	43 (8) ^b	5.4±2.1 ^c	100	5.3±2.0	98
Cheri	20 (4)	5.0±0.0	100	4.3±0.4	85
P38	22 (5)	4.4±0.9	100	3.0±0.4	68
P58	113 (19)	5.4±0.9	91	4.3±0.6	72
P77	198 (36)	5.3±1.2	96	4.7±1.3	85

^aMS medium was supplemented with 1 mg/L 2,4-D.^bNo. of petridishes.^cStandard error.**Table 2.** Embryogenic callus induction from immature inflorescences of P77 *Poa pratensis* L.^a

Plating Date	Total No. of cultured explants	Ave. No. of explants forming callus/petridish	Callus induction (%)	Ave. No. of embryogenic callus /petridish	Embryogenic callus induction (%)
Feb. 27	68 (11) ^b	5.6±1.0 ^c	90	3.8±0.6	62
Apr. 3	58 (10)	5.7±0.8	98	4.3±0.8	74
Apr. 11	66 (14)	4.3±1.3	91	3.3±0.9	70
Apr. 24	204 (36)	5.4±1.2	98	5.1±1.3	95

^aMS medium was supplemented with 1 mg/L 2,4-D.^bNo. of petridishes.^cStandard error.

체 진탕배양을 하면 재분화를 억제하며 배발생 캘러스를 급속히 증식시킬 수 있었다 (Figure 1D, 1E). 이들을 생장조절제가 함유되지 않은 MS 재분화배지에 이식하면 다수의 식물체로 재분화되었으며, 순화과정을 거쳐 상토를 채운 화분에 옮겨 심으면 온실에서 정상적으로 생육하였다 (Figure 1F).

이상의 결과는 절편체로 종자보다 미숙화서가 배발생 캘러스 유도에 효과적이라고 한 Valk 등 (1989)의 결과와 유사하였다 (Ke and Lee 1996; Valk et al. 1989). Griffin과 Dibble (1995)은 유전형간에 배발생 캘러스 유도율에 차이가 있다고 하였으나 본 연구에서는 미숙화서를 이용하면 도입종은 물론 국내에서 수집한 생태종들도 배발생 캘러스를 쉽게 유도시켜 식물체로 재분화할 수 있었다. Ke와 Lee (1996)는 왕포아풀의 캘러스 유도에 2~3 mg/L의 2,4-D나 picloram이 효과적이지만 0.2 mg/L picloram과 0.01 mg/L NAA 혼용처리에서 가장 높은 식물체 재분화율을 보였다고 하였다. 하지만 이 경우 형성된 캘러스는 배발생보다는 기관형성을 통하여 일어났기 때문에 체세포 배발생을 통하여 식물체가 재분화하는 본 연구와는 상이한 결과라고 생각된다. 잔디류의 배발생 캘러스는 절편체만 적절히 사용한다면 많은 경우 1~2 mg/L의 2,4-D에 의해 효과적으로 유도되기 때문에 왕포아풀의 배발생 캘러스 배양도 모본식물의 상태나 절편체로 쓰일 조직의 부위 선정이 중요하다고 판단된다 (Ahn et al. 1987, Noh et al. 1995). 본 조직배양 방법은 도입종 및 국내 수집 생태형 등 여러 유전형의 왕포아풀의 배양에 효과적이기 때문에 기내 돌연변이 등 왕포아풀의 기내육종이나 형질전환 연구에 적합

하리라 판단되었다.

적 요

자생 왕포아풀 (*Poa pratensis* L.)의 배발생 캘러스 유도 및 식물체 재분화 조건을 규명하였다. 도입된 다섯 품종과 국내에서 수집한 네 가지 생태형의 미숙숙 화서와 완숙종자를 sucrose 30 g/L, Phytigel 3 g/L와 2,4-D 1 mg/L가 함유된 MS 배지에 치상하여 24°C로 조절된 항온실에서 배양하면서 캘러스를 유도하였다. 대부분의 배양에서 캘러스가 형성되었으나 배발생 캘러스는 완숙종자를 절편체로 썼을 때보다 미숙화서에서, 온실에서 재배되어 형성된 화서보다는 자연 재배 조건에서 형성된 화서에서 배발생 캘러스의 유도율이 높았다. 배발생 캘러스는 85~98%의 효율로 높게 유도되었으며 계대 배양 및 액체 진탕배양을 통해 6개월 이상 장기 증식되었으며, 생장조절제가 함유되지 않은 MS 재분화 배지에 이식하면 다수의 식물체로 재분화되었다. 재분화 식물들은 온실재배에서도 정상적으로 생장을 하였다.

사사 - 본 연구는 21세기 프론티어 연구개발 사업인 자생식물 이용기술 개발사업단의 연구비 지원 (PFOO1201-04)에 의해 수행되었습니다.

연용문헌

- Ahn BJ, Huang FH, King JW** (1987) Regeneration of bermudagrass cultivars and evidence of somatic embryogenesis. *Crop Science* **27**: 594-597
- Do BS, Lim RJ** (1988) Flora of Korea (North Korea). Pyongyang
- Griffin JD, Dibble MS** (1995) High-frequency plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). *Plant Cell Rep* **14**:721-724
- Ke S, Lee CW** (1996) Plant regeneration in Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) via coleoptile tissue cultures. *Plant Cell Rep* **15**:882-887
- Lee CB** (1979) Illustrated Flora of Korea, pp99-103 Hyangmunsa, Seoul
- McDonnell RE, Conger BV** (1984) Callus induction and plantlet formation from mature embryo explants of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). *Crop Sci* **24**:573-578
- Nielsen KA Knudsen** (1993) Regeneration of green plants from embryogenic suspension cultures of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). *J. Plant Physiol* **141**:589-595
- Noh HY, Choi JS, Ahn BJ** (1995) Plant regeneration of zoysiagrasses (*Zoysia* spp.) through somatic embryogenesis. *Kor J Hort Sci* **36**:588-593
- Valk P van der, Zaal MACM** (1988) Regeneration of plantlets from protoplasts of *Poa pratensis* L. (Kentucky bluegrass). *Current plant science and biotechnology in agriculture* **7**:59-60
- Valk P van der, Ruis F, Tettelaar-Schrier AM, Velde CM van de** (1995) Optimizing plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass. *Plant Cell Tiss and Org Cul* **40**:101-103
- Valk P van der, Zaal MACM, Creemers-Molenaar J** (1989) Somatic embryogenesis and plant regeneration in inflorescence and seed derived callus cultures of *Poa pratensis* L. (Kentucky bluegrass). *Plant Cell Rep* **7**:644-647
- Wu L, Jampates R** (1986) Chromosome number and isoenzyme variation in Kentucky bluegrass cultivars and plants regenerated from tissue culture. *Cytologia* **51**:125-132

(접수일자 2001년 8월 18일)