

# 난지형 목초 기니아그라스의 효율적인 캘러스 유도 및 식물체 재분화

서미숙<sup>1,2</sup> · 다카하라 마나부<sup>2</sup> · 다카미조 타다시<sup>2</sup>

## Efficient Callus Induction and Plant Regeneration of Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.)

Mi-Suk Seo<sup>1,2</sup>, Manabu Takahara<sup>2</sup> and Tadashi Takamizo<sup>2</sup>

### ABSTRACT

Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) is an important warm-season forage grass as well as biomass crop. It has both sexual and asexual mode of reproduction (apomictic) depending on cultivar. We developed efficient plant regeneration system for an apomictic (cv. Natsukaze) and a non-apomictic (Noh-PL1) guineagrass by optimizing the level of L-proline in the callus induction and that of AgNO<sub>3</sub> in plant regeneration medium. Among the L-proline concentrations tested, the best callus induction was achieved by using 2g/L L-proline in both the genotypes. Immature embryos proved to be the best explant source for tissue culture of guineagrass. The highest frequency of shoot regeneration was obtained on MS plant regeneration medium supplemented with 2 mg/L AgNO<sub>3</sub>. These results provide a foundation for efficient tissue culture and genetic improvement of guineagrass.

(Key words : L-proline, AgNO<sub>3</sub>, Immature embryo, Guineagrass, Shoot regeneration)

### I. 서 론

기니아그라스 (*Panicum maximum* Jacq.)는 아프리카가 원산지인 다년생 화본과 목초로 아열대 지방의 사료 작물로 널리 재배되고 있으며, 지구 온난화 현상에 따라 전세계적으로 재배면적이 증가되어가고 있는 추세에 있다. 또한 초장이 높고 생육이 왕성하며 재배가 용이한 다수확 초종으로, 최근에는 바이오매스 작물로서도 각광받고 있다 (Vogel 등, 2002). 우리나라에는 1990년대 초반에 도입되어 C4형 여름용 사료작물로서 재배되기 시작하였다 (Nakajima and

Mochizuki, 1983).

기니아그라스의 생식양식에는 아포믹시스 (apomixis)라는 무성 생식에 의하여 고품형질이 고정되어 다음 세대에 그대로 전달되는 특성을 가지고 있는 계통이 대부분을 이루고 있다. 아포믹시스에 의한 종자 생산은 농가의 자가 채종에 의한 종자 활용이 가능하다는 이점을 가지고 있는 반면에 전통 육종법에 의한 품종 개량이 어렵다는 문제점을 가지고 있다. 따라서 기니아그라스의 유전적 개량을 위해서는 농업적으로 유용한 유전자를 발굴하여, 형질전환 기법 등의 생명공학적인 방법에 의하여 식물에

<sup>1</sup> 농촌진흥청 국립농업과학원 (National Academy of Agricultural Science, RDA)

<sup>2</sup> 일본축산초지연구소 (National Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

Corresponding author : Mi-Suk Seo, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon, 441-707, Korea.

Tel: +82-31-299-1632, Fax: +82-31-299-1636, E-mail: msseo@korea.kr

도입할 필요성이 있다. 만약에 형질전환기법을 사용하여 유용 유전자가 기니아그라스의 아포믹시스 계통에 도입된다면, 유전자의 재조합이 없이 도입 유전자가 다음 세대에 그대로 전달되어 고정될 수 있기 때문에 유성생식에 의존하는 작물들과 비교하여 형질의 고정이 용이하여 신속한 품종 육성이 가능할 것이다. 기니아그라스는 아포믹시스를 통하여 종자를 생산하는 품종이 대부분이나, 유성생식에 의해 종자를 생산하는 계통이 존재하기 때문에 아포믹시스 연구에 있어서도 중요한 재료로 사용되고 있다. 유성생식에 의해 종자를 생산하는 Noh-PL1 품종의 경우는 일반적인 유성생식 과정을 거쳐 8핵(1 egg cell, 2 synergid cells, 3 antipodal cells, 2 polar nuclei)의 성숙배낭을 형성하는 반면, 아포믹시스 품종인 Natsukaze는 4개의 핵(1 egg cell, 2 synergid cells, 1 polar nucleus)을 가진 아포믹시스 특이적 배낭을 형성한 후, 수분·수정 과정을 거치지 않고 종자를 생산하여 번식한다(그림 1). 최근, 아포믹시스의 작용 기작을 규명하기 위하여 분자생물학적 방법을 이용하여 아포믹시스 관련유전자를 동정하려는 연구가 전세계적으로 활발히 진행되고 있다(Yamada-Akiyama 등, 2009). 따라서 아포믹시스 관련 후보 유전자를 통해 그 작용 기작을 규명하기 위해서는 후보 유전자들의 형질전환을 통한 기능 분석 연구가 수반되어야 할 것이다.

아그로박테리움법이나 유전자총 기법에 의한 식물의 유전적 형질전환은 조직배양에 의한 식물 세포의 재분화 능력에 의존한다. 그러나 현재까지 진행중인 난지형 화분과 목초의 경우 조직배양 효율이 매우 낮아 스위치그라스, 로즈그라스를 비롯한 소수의 작물에서만 형질전환을 성공한 바 있다(Gondo 등, 2009, Somleva 등, 2002). 식물의 조직배양 효율은 식물 성장 조절물질을 포함한 배양 배지의 구성물(Mithila 등, 2003, Lakshmanan 등, 2006) 및 사용된 절편체의 종류(Felfoldi and Purnhauser, 1992) 등

다양한 배양 조건에 의하여 영향을 받는다. 본 연구자는 기니아그라스를 포함한 *Panicum* 속 식물들의 조직배양 효율에 영향을 미치는 다양한 요인들에 대하여 이미 보고한 바 있다(Seo 등, 2008, 2010). 여기에 부가하여, 탄화본과식물의 조직배양에 사용되는 배지내의 다양한 첨가물의 효과를 검토하여 기니아그라스의 조직배양에 적용한다면, 고효율의 조직배양계의 확립이 가능할 것으로 사료된다. 특히 벼의 캘러스 유도 및 증식 그리고 재분화에 사용되는 L-proline과 casamino acid(Toki 등, 2006), 그리고 보리 및 옥수수에서 사용되는  $AgNO_3$ (Jha 등 2007, Vain 등 1989)의 효과를 검토할 필요성이 있다.

본 연구에서는 기니아그라스의 캘러스 유도 및 식물체 재분화 조건을 보다 더 최적화함으로써 형질전환을 통한 새로운 품종 육성 및 아포믹시스의 작용 기작을 규명하는데 적극 활용하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 식물 재료 및 배낭분석

본 실험을 위한 식물 재료는 일본 오키나와 현 축산연구센터(Okinawa Prefectural Livestock and Grassland Research Center)에서 육성된 유성생식 품종 Noh-PL1과 아포믹시스 품종인 Natsukaze를 사용되었다. 배낭 관찰을 위하여 개화 직전 혹은 개화기의 꽃봉오리를 채취한 후 Kojima와 Nagato(1992)의 방법을 이용하여 분석하였다. 채취된 꽃봉오리는 FPA50 고정액(formalin:propionic acid:50% ethanol = 5:5:90)으로 4°C에서 5~7일간 고정시킨 후, 핀셋을 이용하여 지방을 분리시킨 다음 Herr's benzylbenzate-four-and-a-half 유동액(Herr 1982)에서 2시간 이상 방치한 후 실체 현미경으로 배낭을 관찰하였다.

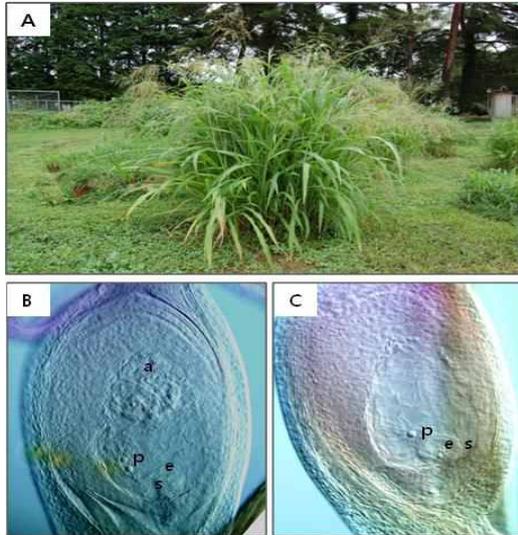


Fig. 1. Embryo sac development in sexual and apomictic guineagrass genotypes. (A) Apomictic guineagrass Natsukaze plant, (B) eight-nucleate sexual embryo sac formation in Noh-PL1, (C) 4-nucleate-stage apomictic embryo sac of Natsukaze. a: antipodal cells, e: egg cell, p: polar nuclei, s: synergid cells. Bar =50µm.

## 2. 캘러스 유도

캘러스 유도를 위하여 Natsukaze와 Noh-PL1 두 품종의 성숙종자와 미성숙배를 채취하여 사용하였다. 성숙종자는 종피를 제거한 뒤 70% 에탄올로 1분간 표면 살균하고 2% Sodium hypochlorite 용액으로 20분간 교반하면서 살균하였다. 살균된 종자는 멸균수로 3회 세정한 후 물기를 제거한 다음 캘러스 유도 배지에 치상하고, 25°C 암조건에서 4주간 배양하였다. 기본적인 캘러스 유도 배지는 Seo 등 (2008)에 준하여 30 g/L sucrose, 4 mg/L 2,4-D, 3 g/L gelrite를 함유한 MS 배지 (Murashige and Skoog, 1962)를 사용하였다.

미성숙배로부터 캘러스를 유도하기 위하여 온실에서 약 3개월령의 식물체를 교배시킨 다음 미성숙배를 채취하였다. 미성숙배는 종피를

제거한 후 성숙종자와 같은 방법으로 표면 살균하고 멸균수로 세정한 후 현미경으로 관찰한 다음 핀셋을 이용하여 미성숙종자로부터 분리되었다. 분리된 미성숙배는 상기와 동일한 캘러스 유도 배지에 치상하여 25°C에서 3개월 동안 암배양하였다. 각 절편체로부터 유도된 캘러스는 5주 간격으로 동일한 배지에 계대배양하였다.

또한 L-proline 첨가가 캘러스 유도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 L-proline을 각각 0.5, 1, 2, 4 g/L 첨가한 캘러스 유도 배지에 Natsukaze의 성숙종자를 파종하여 캘러스 유도율을 조사하였다. 배지에 치상한 종자는 25°C 암조건에서 4주간 배양하였다.

## 3. 식물체 재분화

성숙종자와 미성숙배 유래의 캘러스로부터 식물체를 재분화시키기 위한 배지로는 Seo 등 (2010)에 의해 검토된 방법에 준하여 30 g/L maltose, 1 mg/L TDZ (N-phenyl-N'-[(1,2,3-thiadiazol-5-yl) urea]), 4 g/L gelrite가 첨가된 MS 배지를 사용하였다. 미성숙배로부터 유도된 캘러스의 식물체 재분화 능력이 조사되었고, 높은 재분화를 보인 계통을 선발하여 캘러스를 계대배양하였다. 낮은 재분화율을 가진 계통은 AgNO<sub>3</sub>가 미성숙배 유래 캘러스로부터 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사용되었다. 2, 5, 10, 15 mg/L AgNO<sub>3</sub>가 각각 첨가된 재분화 배지에 캘러스를 이식하여 25°C에서 16 h light/8 h dark 조건으로 4주간 배양한 후 식물체 재분화율을 조사하였다. 재분화된 싹은 뿌리가 발생된 후, 완전한 식물체로 분화하면 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 식물 절편체의 부위 및 L-proline의 첨가에 따른 캘러스의 유도효율

식물에서 조직배양을 통해 형질전환과 같은 다양한 생명공학 기술을 적용하기 위해서는 캘러스의 유도 및 증식이 용이하고, 캘러스로부터 높은 효율로 식물체를 재분화시킬 수 있는 배양능력 혹은 배양 조건이 필수적이다. 본 실험에서는, 기니아그라스의 아포믹시스 계통과 유성생식 계통에 있어서 절편체의 부위에 따른 캘러스 유도 능력을 조사하기 위하여 성숙 종자와 미성숙배를 채취하여 캘러스 유도배지에 배양하였다 (Table 1). 성숙종자를 사용하였을 경우, 유성생식 계통인 Noh-PL1에서 0.3%로 매우 낮은 캘러스 유도효율을 나타내었고, 아포믹시스 계통인 Natsukaze에서도 22.2%의 낮은 캘러스 유도율이 관찰되었다. 반면에 미성숙배를 배양하였을 경우, 두 품종 모두에서 80% 이상의 높은 캘러스 유도율이 관찰되었다. 품종에 따른 캘러스 유도 능력은 유성생식 계통인 Noh-PL1은 Natsukaze와 비교하여 성숙종자와 미성숙배 모두에서 낮은 캘러스 유도 능력을 보였다. 또한 성숙종자와 미성숙배로부터 유도된 캘러스에서는 분명한 형태적 차이가 관찰되었다. 성숙종자 유래의 캘러스는 수분이 많아 무르고, 투명한 흰색을 띠는 반면, 미성숙배 유래 캘러스는 부스러지기 쉽고 노란색에 가까운 형태적 특징을 보였다 (Fig. 4A, 4B). 이러한 캘러스의 형태적 특징은 Noh-PL1과 Natsukaze에서 동일한 양상을 보였으나 Noh-PL1의 미성숙배 유래 캘러스의 경우 Natsukaze

의 미성숙배 유래 캘러스에 비해 캘러스의 밀집도가 높은 경향을 보였다.

Natsukaze의 성숙종자로부터 캘러스 유도에 영향을 미치는 L-proline의 효과를 조사한 결과는 그림 2와 같다. Casamino acid와 AgNO<sub>3</sub>는 guineagrass의 캘러스 유도에 별다른 영향을 미치지 않았다 (결과 미제시). L-proline은 벼 (Toki 등, 2006)와 옥수수 (Armstrong 등, 1985) 등의 화분과 식물에서 캘러스 유도 및 증식 그리고 식물체 재분화에 효과적으로 사용되어 왔다. L-proline은 아미노산의 일종으로 배지내의 삼투압 조절 및 질소원 공급을 촉진시켜 세포의 증식과 재분화를 촉진시키는 역할을 한다고 알려져 있다 (O'Neill 등, 1996). 본 실험의 결과에서도 L-proline을 캘러스 유도 배지에 첨가하였을 경우, 무첨가 처리구와 비교하여 효과적임을 확인할 수 있었으며 2 g/L L-proline은 48.8%의 가장 높은 캘러스 유도 효율을 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 L-proline을 첨가한 캘러스 유도 배지에 미성숙배를 치상하여 캘러스 유도효율을 관찰한 결과, 첨가하지 않은 배지와 비교하여 캘러스 유도율에서는 큰 차이를 보이지 않았으나, 캘러스의 증식 속도가 빨라지며, 노란색이 선명해지는 형태적 변화가 관찰되었다. 이후의 실험에서는 미성숙배 부위를 채취한 후 L-proline 2g/L가 첨가된 캘러스 유도 배지 및 증식 배지에서 배양하는 것이 가장 효과적이라고 판단된다.

Table 1. Effect of explants on callus induction and plant regeneration in guineagrass

| Cultivars | Explant type    | Callus induction frequency (%) | Shoot regeneration frequency (%) |
|-----------|-----------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Natsukaze | Mature seed     | 22.2                           | 0.0                              |
|           | Immature embryo | 95.8                           | 53.4 ± 2.1                       |
| Noh-PL1   | Mature seed     | 0.3                            | 0.0                              |
|           | Immature embryo | 83.3                           | 34.0 ± 4.7                       |

Mature seed and immature embryo were cultured on MS medium containing 4mg/L 2,4-D, 30 g/L sucrose, and 0.3 % Gelrite for callus induction. Calli derived from mature seed and immature embryo were cultured on MS medium containing 1 mg/L TDZ, 30 g/L maltose, and 0.4% gelrite for 4 weeks for shoot regeneration. Data shown are the average ± standard error from three independent experiments.

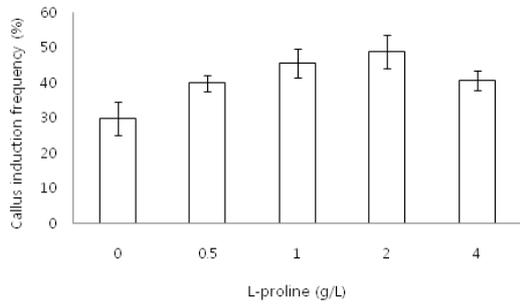


Fig. 2. Effect of L-proline on callus induction from mature seed of guineagrass cultivar Natsukaze. The seeds were cultured on MS medium containing 30 g/L of sucrose, 4 mg/L of 2,4-D, 0.3% gelrite and L-proline of different concentration for 4 weeks. Range bars represent the standard errors of three replications.

2. 절편체 부위에 따른 식물체 재분화 능력 및 AgNO<sub>3</sub>의 영향

기니아그라스의 성숙종자와 미성숙배 유래의 캘러스를 통해 식물체 재분화 능력을 조사한 결과, 성숙종자 유래 캘러스로부터는 어떠한 식물체도 분화되지 않은 반면에 미성숙배 유래 캘러스에서는 식물체의 재분화가 관찰되었다 (Table 1). 캘러스 유도 효율과 마찬가지로 Natsukaze가 Noh-PL1과 비교하였을 때 높은 재분화 효율을 보였다. 본 실험의 결과, 절편체의 부위는 기니아그라스의 조직배양에 가장 큰 영향을 미치는 요인이며, 품종에 따라 조직배양 능력에 차이가 있음이 확인되었다. 아포믹시스 품종인 Natsukaze는 유성생식 품종인 Noh-PL1 보다 높은 캘러스 유도 및 재분화 능력을 보였으나, 본 실험에서 생식양식과 조직배양 능력 간의 상관관계는 증명할 수 없었다.

또한 각각의 미성숙배가 가지고 있는 재분화 능력을 조사한 결과, Natsukaze의 경우 21.6-75.7%의 광범위한 식물체 재분화 효율이 관찰되었고, Noh-PL1의 경우도 두 계통간 재분화

효율의 차이가 관찰되었다 (Table 2). 캘러스의 재분화 능력은 많은 요인들에 의해 결정되며 특히 캘러스의 형태적 특징은 중요한 요소 중에 하나이다 (Toyama 등, 2005). 본 실험의 결과, 미성숙배 유래 캘러스는 성숙 종자 유래의 캘러스와 비교하여 수분 함량이 낮고 노란색을 띠는 형태적 특징이 관찰되었다. 따라서 캘러스의 형태적 특징은 기니아그라스의 효율적인 조직배양계를 위해 고려되어야 할 중요한 특징 중의 하나로 사료된다. 또한 Natsukaze의 미성숙배 계통들 중에 낮은 재분화율을 가진 3번 계통을 이용하여 재분화 효율에 영향을 미치는 AgNO<sub>3</sub>의 효과에 관하여 검토하였다 (Fig. 3). 그 결과 AgNO<sub>3</sub>를 첨가하였을 경우, 무첨가구와 비교하여 모든 처리구에서 재분화율은 증가함을 알 수 있었다. AgNO<sub>3</sub>를 2 mg/L의 저농도로 첨가하였을 경우와 15 mg/L의 고농도로 첨가하였을 경우의 재분화 효율에는 큰 차이를 보이지 않았으나 10 mg/L와 15 mg/L의 AgNO<sub>3</sub>를 첨가한 배지에서는 albino를 띄는 변이 식물체들이 재분화되는 경향을 관찰할 수 있었다. AgNO<sub>3</sub>는 여러 식물체의 신초 분화에 효과적으로 사용되어 왔다 (Jha 등 2007, Purnhauser

Table 2. Shoot regeneration ability of different immature embryo-derived callus of guineagrass

| Cultivar (strain) |   | Shoot regeneration frequency (%) | No. of shoot per callus |
|-------------------|---|----------------------------------|-------------------------|
| Natsukaze         | 1 | 75.68                            | 7.05 ± 0.96             |
|                   | 2 | 53.85                            | 5.44 ± 0.87             |
|                   | 3 | 21.62                            | 3.00 ± 0.58             |
|                   | 4 | 45.83                            | 6.11 ± 1.21             |
|                   | 5 | 72.00                            | 6.35 ± 1.92             |
| Noh-PL1           | 1 | 41.66                            | 4.19 ± 0.19             |
|                   | 2 | 28.57                            | 4.11 ± 0.74             |

Immature embryo-derived calli were cultured on MS medium containing 1 mg/L TDZ, 30 g/L maltose and 0.4% gelrite for 4 weeks.

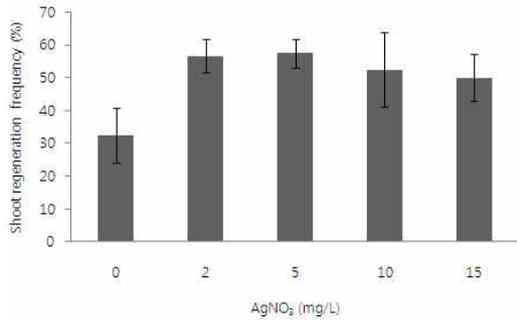


Fig. 3. Effect of AgNO<sub>3</sub> on shoot regeneration from callus derived from immature embryo of guineagrass. The calli were cultured on MS medium containing 30 g/L of maltose, 1 mg/L of TDZ, 0.4% gelrite and AgNO<sub>3</sub> of different concentration for 8 weeks. Range bars represent the standard errors of three replications.

등 1987, Vain 등 1989). AgNO<sub>3</sub>는 식물의 성장과 발달에 관여하는 호르몬인 ethylene의 생합성을 억제함으로써 신초의 분화를 촉진하는 효과를 가지고 있으며, 본 실험을 통해 기니아그라스의 식물체 재분화에도 효과적임이 증명되었다. 그러나 고농도의 AgNO<sub>3</sub>가 첨가된 조건에서는 비정상적인 albino 신초가 관찰되었으며, 이것은 아마도 ethylene의 과다한 억제가 배양 세포의 비정상적인 분화를 일으켰을 가능성이 있으리라 추측된다. 따라서 재분화 배지에 첨가되는 AgNO<sub>3</sub>의 농도는 2 mg/L의 저농도

로 첨가하는 것이 정상적인 식물체를 고효율로 재분화시키기 위한 가장 효과적인 조건이라고 할 수 있겠다. 이러한 실험 결과를 활용하여 AgNO<sub>3</sub>를 첨가한 배지에 다른 미성숙배 계통의 캘러스를 치상하여 식물체 재분화 효율을 관찰한 결과, 계통 1과 5의 경우는 무처리구와 재분화 효율에 유의한 차이가 관찰되지 않았으며, 계통 2와 4의 경우는 약 10% 정도 재분화 효율이 증가하였다. 또한 우리는 ascorbic acid, casamino acid 및 L-proline 첨가에 따른 영향을 조사하였으나, 무처리구와 비교하여 재분화율에 있어서 별다른 차이는 관찰되지 않았다(결과 미제시). 미성숙배 유래 캘러스의 경우, 모든 계통에서 1년 이상 계대배양함으로써 유지·증식이 가능하였을 뿐만 아니라, 높은 식물체 재분화 능력 또한 지속적으로 유지되었다. 본 실험에서 확인한 결과를 바탕으로 금후 높은 재분화율을 가진 미성숙배 계통을 선발, 증식한 후에 유용 유전자의 형질전환 연구의 재료로 사용할 예정이다. 본 실험의 결과 나타난 미성숙배의 계통별 재분화율의 차이는 미성숙배의 발달 시기에 원인이 있을지도 모른다. 이후의 실험에서는 채취한 미성숙배의 발달 시기에 따른 재분화율을 검토하기 위해서 미성숙배의 크기별 식물체 재분화 효율을 조사할 필요성이 있을 것이라고 사료된다.

이상의 결과를 종합한 결과, 미성숙배에서

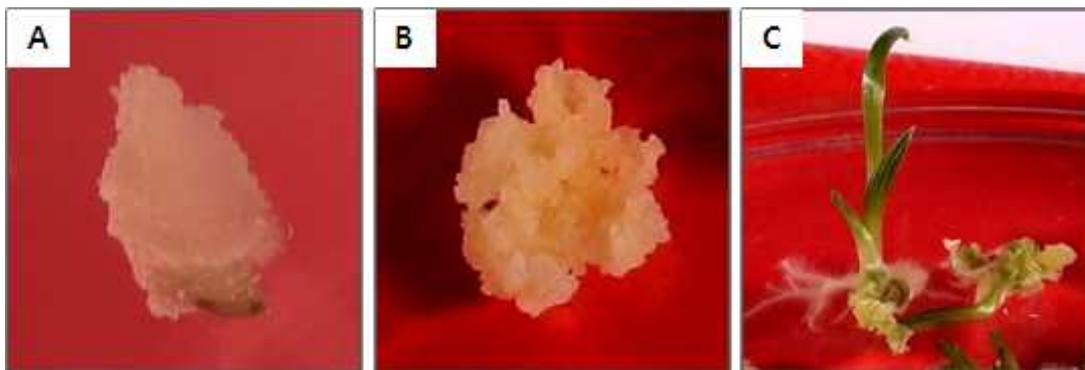


Fig. 4. Callus formation and Plant regeneration in guineagrass cv. Natsukaze. (A) Callus derived from mature seed, (B) Callus derived from immature embryo, (C) Plant regeneration of callus derived from immature embryo after 6 weeks.

유래된 캘러스를 사용하여 2mg/L AgNO<sub>3</sub>가 첨가된 재분화 배지에 배양하였을 경우, 기니아그라스에서 고효율의 식물체 재분화를 유도할 수 있음을 확인하였다. 또한 높은 재분화 능력을 가진 계통을 선발하여 유지·증식시킴으로써 금후의 형질전환 실험에 이용할 수 있으리라 사료된다.

#### IV. 요약

기니아그라스의 유성생식 계통과 아포믹시스 계통을 이용하여 최적의 조직배양 조건을 검토하기 위하여 절편체 부위의 조직배양 능력 및 배양배지의 조건을 검토하였다. 그 결과 미성숙배를 분리한 후 L-proline 2 g/L가 첨가된 캘러스 유도 배지에 치상하였을 때 높은 캘러스 유도율 및 활발한 증식을 관찰할 수 있었다. 또한 유도된 캘러스를 대상으로 재분화 효율을 조사한 결과, 성숙종자 유래의 캘러스는 재분화 능력을 가지고 있지 않은 반면에, 미성숙배 유래 캘러스로부터는 높은 재분화 효율이 관찰되었다. 따라서 기니아그라스의 조직배양에 있어서 사용되는 절편체의 부위는 매우 중요하며, 미성숙배는 캘러스 유도 및 식물체 재분화에 있어서 매우 효과적인 부위임이 증명되었다. 또한 미성숙배의 계통별 재분화 능력에는 차이가 있었으며, 가장 낮은 재분화율을 보인 계통을 이용하여 식물체 재분화에 영향을 미치는 AgNO<sub>3</sub>의 효과를 조사하였다. 고농도의 AgNO<sub>3</sub>는 albino 신초의 발생을 유발하는 반면, 2 mg/L의 저농도로 AgNO<sub>3</sub>를 재분화 배지에 첨가하였을 때 정상적인 신초의 높은 재분화 효율이 관찰되었다. 본 연구에서 확인된 캘러스 유도 및 식물체 재분화 조건은 형질전환을 통한 기니아그라스의 신품종 개발 및 식물의 생식 양식의 메커니즘을 규명하는데 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

#### V. 사 사

본 연구에서 사용된 기니아그라스는 일본의 오키나와현 축산연구센터(Okinawa Prefectural Livestock and Grassland Research Center)의 마쓰미 에비나(Masumi Ebina), 마사히토 이나후쿠(Masahito Inafuku)씨의 제공에 의한 것이며, 이에 감사드립니다.

#### VI. 인용 문헌

1. Armstrong C.L., C.E. Green. 1985. Establishment and maintenance of friable, embryogenic callus nad the involvement of L-proline. *Planta*. 164: 207-214.
2. Felfoldi, K., L. Purnhauser. 1992. Induction of regenerating callus cultures from immature embryos of 44 wheat and 3 triticale cultivars. *Cereal Res Commun*. 20:273-277.
3. Gondo, T., J. Matsumoto, S. Tsuruta, M. Yoshida, A. Kawakami, F. Terami, M. Ebina, T. Yamada, R. Akashi. 2009. Particle inflow gun-mediated transformation of multiple-shoot clumps in rhodes grass (*Chloris gayana*). *J Plant Physiol*. 166:435-441.
4. Jha, A.K., L.S. Dahleen, J.C. Suttle. 2007. Ethylene influences green plant regeneration from barley callus. *Plant Cell Rep*. 26:285-290.
5. Herr, J. M. Jr. 1982. An analysis of methods for permanently mounting ovules cleared in four-and-a-half type clearing fluids. *Stain. Technol*. 57:161-169.
6. Kojima, A. and Y. Nagato. 1992. Diplosporous embryo-sac formation and the degree of diplospory in *Allium tuberosum*. *Sex. Plant Reprod*. 5:72-78.
7. Lakshmanan, P., J. Geijskes, L. Wang, A. Elliott, C. Grof, N. Berding, G. smith. 2006. Developmental and hormonal regulation of direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids) leaf culture. *Plant Cell Rep*. 25:1007-1015.
8. Mithila, J., J. Hall, J. Victor, P. Saxena. 2003. Thidiazuron induces shoot organogenesis at low

- concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.). *Plant Cell Rep* 21:408-414.
9. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revise medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15:473-497.
  10. Nakajima, K. and N. Mochizuki. 1983. Degrees of sexuality in sexual plants of guineagrass by the simplified embryo sac analysis. *Japan. J. Breed.* 33:45-54.
  11. O'Neill C.M., A.E. Aurther, R.J. Mathias. 1996. The effect of proline, thioproline and methylglyoxal-bis-(guanylhdyrazone) on shoot regeneration frequencies from stem explants of *B. napus*. *Plant Cell Rep.* 15:695-698.
  12. Purnhauser, L., P. Medgyesy, M. Czako, P.H. Dix, L. Marton. 1987. Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO<sub>3</sub>. *Plant Cell Rep.* 6:1-4.
  13. Seo, M.S., M. Takahara, M. Ebina, T. Takamizo. 2008. Evaluation of tissue culture response from mature seeds of *Panicum* spp. *Grassland Sci.* 54: 125-130.
  14. Seo, M.S., M. Takahara, and T. Takamizo. 2010. Optimization of culture condition for plant regeneration of *Panicum* spp. through somatic embryogenesis. *Grassland Sci.* 56:6-12.
  15. Somleva, M., Z. Tomaszewski, and B. Conger. 2002. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of switchgrass. *Crop Sci.* 42:2080-2087.
  16. Toki S., N. Hara, K. Ono, H. Onodera, A. Tagiri, S. Oka, and H. Tanaka. 2006. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *The Plant J.* 47:969-976.
  17. Toyama, K., C.H. Bae, J.G. Kang, Y.P. Lim, T. Adachi, K.Z. Riu, P.S. Song, and H.Y. Lee. 2003. Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol Cells.* 16:19-27.
  18. Vain, P., H. Yean, and P. Flament. 1989. Enhancement and regeneration of embryogenic type II callus in *Zea mays* L. by AgNO<sub>3</sub>. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 18:143-151.
  19. Vogel, K.P., J.J. Brejda, D.T. Walters, and D.R. Buxton. 2002. Switchgrass biomass production in the Midwest USA: harvest and nitrogen management. *Agron. J.* 94:413-420.
  20. Yamada-Akiyama, H., Y. Akiyama, M. Ebina, Q. Xu, S. Tsuruta, J. Yazaki, N. Kishimoto, S. Kikuchi, M. Takahara, T. Takamizo, S. Sugita, H. Nakagawa. 2009. Analysis of expressed sequence tags in apomictic guineagrass (*Panicum maximum*). *J. Plant Physiol.* 166:750-761.
- (접수일: 2010년 8월 31일, 수정일 1차: 2010년 10월 5일, 수정일 2차: 2010년 10월 25일, 게재확정일: 2010년 11월 1일)