

禾本科牧草의 種·屬間 雜種에 관한 研究
I. 交雜胚 日齡에 따른 Callus形成과 植物體再分化
朴炳勳, 金明桓*

Studies on the Interspecific and Intergeneric Hybridization in Herbage Grasses
I. Effects of hybrid embryo age on callus formation and plant regeneration
Byung Hoon Park and Myoung Hwan Kim*

Summary

A breeding program in progress at Suweon Livestock Experiment Station, RDA, involves the hybridization of italian ryegrass (Lm) and several leading forage grasses in an effort to combine the nutritive, productivity and palatability qualities of Lm with the adaptive and cold resistance qualities of several leading grasses. In order to study the fate of the hybridization between remotely related species, immature hybrid embryos were cultured on media. The emasculated plants of Lm were Sikem and Tetrone. Reweille, 2n=14, of perennial ryegrass (Lp.), Forager, 2n=42, of tall fescue(Fa), First, 2n=14, of meadow fescue(Fp), Potomac, 2n=28, of orchardgrass(Dg), and Richmond, 2n=42, of timothy(Ph.p) were used as pollinators. Embryos were isolated on 4, 8, 12, 16, and 20 days after pollination and cultured them on modified Murashige and Skoog media.

Calluses and plantlets have been obtained after 8 days old embryos crossing between Lm x Fa, after 12 days embryos crossing between Lm x Lp, Dg, and Ph.p, and after 16 days embryos crossing between Lm x Fp. Both callus and shoot formation occurred on 6 % or less of the plated embryos of Lm x Fp, Dg, and Ph.p. Embryo-derived callus forming shoots have been obtained from 4 days old embryo crossing between Lm x Dg which has not successfully been done anywhere as far as we know.

It means that hybrid plants of species without crossability can be obtained through the use of immature embryo culture.

Some of plated embryos developed directly shoots from embryos and the others shoot-forming callus. Cross between related species showed a high frequency of directly shoot formation from plated embryos and cross between remotely related species a high frequency of callus formation.

I. 緒 論

種間 또는 屬間交雜등이 自然狀態下에서 흔히 일어나 새로운 異質倍數體(Allopolyploid)가 생긴다는것이 알려져 있다¹⁾. 이러한 현상은 異種의 有望形質을 한 植物體에 導入하고 또 많은 遺傳變異를 갖고져하는 育種家들에게 鼓舞的인 것이다.

예전에는 不可思議였던 遠緣種間 雜種도 最近에는 器內培養技術이 發達되어 그 頻度は 낮지만 雜種植物이 養成되었으며²⁾ 보리와 밀의 雜種植物까지도 아직 實用段階는 아니지만 植物體를 再分化시켰고³⁾ 이탈리아인 라이그라스와 툴케스큐의 優秀形質을 結合하기도 했다^{4, 6, 7, 8, 12)}. 그러나 지금까지의 報告內容을 보면 特定組合間 雜種植物 養成은 可能하지

畜産試驗場(Livestock Experiment Station, RDA, Suwon 440-350, Korea)

*建國大學校 大學院(Graduate School of Konkuk University, Seoul, 133-701, Korea)

만 모든 組合에서 可能하지는 않다. 톨케스큐와 오차드그라스의 雜種植物 養成은 어렵고⁹⁾ 이탈리아 라이그라스와 켄터키 부르그라스와의 雜種植物 養成은 아직 成功한 예가 없다¹¹⁾.

한편 Medicago 種間交雜의 胚培養에서 頻度は 낮지만 授精後 胚의 經過日數에 따라 植物體 再分化 頻도가 다르다¹²⁾. 따라서 本研究는 初期生育이 旺盛하고 多收性이며 品質이 良好한 이탈리아 라이그라스와 耐寒性이 좋고 적응성이 높은 우리나라 獎勵牧草와의 雜種養成을 目標로 試圖되었다.

II. 材料 및 方法

이탈리안 라이그라스의 2 倍體와 4 倍體 品種을 母本으로 하고 花粉親으로 퍼레니얼 라이그라스, 톨케스큐, 메도우케스큐, 오차드그라스, 티모시를 表 1 과 같이 組合하여 除雄交配하였다.

Table 1. The interspecific and intergeneric cross combination in herbage grasses.

No. of combination	Combination			
	Female	Chromosome	Male	Chromosome
1	L. multiflorum	14, 28	L. perenne	14
2	L. multiflorum	14, 28	F. arundinacea	42
3	L. multiflorum	14, 28	F. pratensis	14
4	L. multiflorum	14, 28	D. glomerata	28
5	L. multiflorum	14, 28	Ph. pratense	42

Variety name : L. multiflorum(Sikem=2x, Tetrone=4x), D. glomerata (Potomac=4x), F. arundinacea (Forager=6x), F. pratensis (First=2x), L. perenne (Reveille=2x), Ph. pratense (Richmond=6x).

穎果는 授粉後 4 일부터 20 일까지 4 日 간격으로 4 차에 걸쳐 수집되어 内外穎을 除去, 無菌水에 2~3 時間 담그었다가 70% Ethanol 용액에 90 초간, 그리고 0.2% Mercuric Chloride 용액에 10 분간 담그어 殺菌한 후 無菌水로 5 回 洗滌하였다. 그리고 無菌床內의 해부현미경하에서 胚盤 바로 頂부분에서 胚와 胚乳를 分離시킨 후 胚의 幼芽와 幼根 部分이 培地에 접촉되도록 置床하였다.

培養은 4 週 간격으로 繼代培養하였는데 1 次 培養은 MS+2.0 mg/l 2,4-D 培地에서 28°C 暗狀態, 2 次培養은 같은 培地에서 24°C, 18 時明 光條件下에서 실시하였다.

2 次培養중에 Callus를 形成하지 않고 직접 S-

hoot와 Root가 나온것은 이것을 왕성하게 하기 위하여 3 次培地인 1/2MS培地에서 培養하여 Pot에 移植하였다.

한편 Callus가 形成된것은 MS+2.0mg/l 2,4-D 培地에서 光을 주어 Green spot을 유도한 후 1/2 MS 培地上에서 Shoots를 왕성하게 하였다. 그리고 이것을 MS-Free medium에서 發根을 促進시켜 Pot에 移植하였다.

III. 結果 및 考察

1. Callus 形成과 植物體再分化 頻度

이탈리안 라이그라스와 퍼레니얼 라이그라스 조합에서는 4 日令과 8 日令胚에서 母本의 染色體 倍數性에 관계없이 Callus가 形成되지 않았고 Callus를 거치지 않고 直接 植物體 再分化도 되지 않았다. 그러나 12 日令胚 부터는 Callus 形成도 잘되고 植物體 再分化도 잘 되었다(表 1). 이를 母本의 染色體 倍數性으로 보면 2 倍體에서는 植物體 再分化 頻도가 높았으나 Callus 形成은 큰 差異가 없었다. 이 組合은 種間交雜으로써 染色體間에 親和性이 높아 14.4~32.0%의 높은 交雜率을 나타낸 것으로 사료되며 Medicago 種間交雜에서 授精後 14 日令부터¹⁰⁾, Lolium 種間交雜에서 18 日令¹¹⁾, 보리와 호밀교잡의 18~20 日令⁵⁾부터 植物體 再分化가 되었다는 報告와 유사하였다.

屬間交雜인 이탈리아 라이그라스와 톨케스큐 組合에서는 8 日令胚부터 Callus가 形成되고 植物體 再分化도 되지만 Callus 生長은 저조하고 植物體 再分化 頻도도 0.9~10.7%로 種間交配에서 보다 낮았다. 특히 이 組合에서는 母體의 染色體 倍數性에 영향받아 4 倍體에서는 Callus 形成도 미약하고 植物體 再分化도 거의 없었으나 2 倍體에서는 Callus 形成도 비교적 왕성하고 植物體 再分化 頻도도 높았다(表 1). 그리고 Callus 形成과 植物體 再分化 頻도는 胚令이 높을수록 좋은 경향이었다. 이들 屬間交雜에서 雄性不稔 雜種植物을 養成하였다는 報告는 많다^{1,3,4,7,8)}.

이탈리안 라이그라스와 메도우케스큐의 屬間交雜에서는 톨케스큐와의 屬間交雜보다 Callus 形成과 植物體 再分化 頻도가 低調하였다. 이것은 草種間 染色體의 親和性 때문인 것으로 생각된다¹⁾.

Table 2. Effect of embryo age on callus formation and plant regeneration from interspecific and intergeneric hybrid embryo cultured *in vitro*.

Combination	Embryo age	No. of embryo inoculated		% Explants forming		Extent of callus growth	
		Mother plant		Mother plant		Mother plant	
		di.	te.	di.	te.	di.	te.
Lm × Lp (di)	4	207	100	0.0	0.0	-	-
	8	250	120	0.0	0.0	-	-
	12	156	116	30.8	0.0	++	-
	16	142	174	21.8	14.4	++	++
	20	100	120	32.0	29.2	++	++
Lm × Fa (hex)	4	217	354	0.0	0.0	-	-
	8	277	103	0.7	0.0	+	+
	12	256	238	5.5	2.9	+	+
	16	424	218	9.7	0.9	++	+
	20	244	228	10.7	0.0	++	-
Lm × Fp (di)	4	207	112	0.0	0.0	-	-
	8	251	106	0.0	0.0	-	-
	12	196	220	0.0	0.0	-	+
	16	379	94	2.4	6.4	+	++
	20	165	-	0.0	-	+	-
Lm × Dg (te)	4	113	248	0.0	0.0	-	+
	8	142	388	0.0	0.0	-	-
	12	320	226	0.6	0.0	+	+
	16	164	418	1.2	0.2	+	+
	20	285	132	1.4	3.8	+	++
Lm × Ph. p (hex)	4	108	148	0.0	0.0	-	-
	8	140	94	0.0	0.0	-	-
	12	152	272	3.3	2.6	+	++
	16	165	132	1.5	1.5	+	++
	20	-	-	-	-	-	-

Lm : *Lolium multiflorum*
Lp : *Lolium perenne*
Fa : *Festuca arundinacea*

Fp : *Festuca pratensis*
Dg : *Dactylis glomerata*
Ph.p : *Phleum pratense*

di : diploid
te : tetraploid
hex : hexaploid

- : no callus
+ : slight
++ : moderate

이탈리안 라이그라스와 오차드그라스 조합에서는 배수성에 관계없이 8 日齡까지는 植物體 再分化는 되지 않으나 Callus는 4 日齡에서 형성되었으며 12 日齡 이후부터는 Callus가 形成되고 植物體 再分化도 되었다. 툴케스큐와 오차드그라스의 雜種을 育成하였다는 보고^{3,9)}는 많지만 이탈리안 라이그라스와 오차드그라스의 雜種을 育成하였다는 報告는 아

직 없다. 그러나 이 組合에서는 12 日齡 이후부터 器內培養하면 直接 雜種植物을, 早期培養 즉 4 日齡을 培養하면 Callus를 거쳐 雜種植物을 養成할 수 있었다¹¹⁾.

이탈리안 라이그라스와 티모시의 組合에서는 12 日齡부터 植物體가 再分化되고 Callus가 形成되었으며 母本의 倍數性間에는 차이가 없었다.

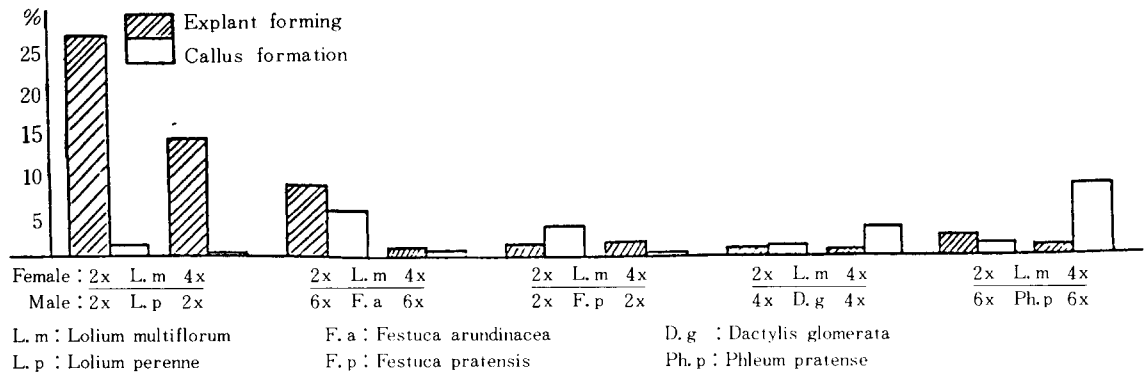


Fig. 1. Effect of ploidy on explant forming and callus formation from interspecific and -generic hybrid embryos

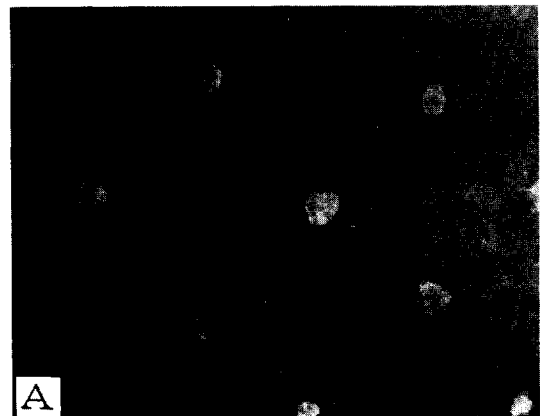
2. 染色體 倍數性에 따른 Callus 形成과 植物體 再分化

이탈리안 라이그라스의 2 배體와 4 배體 品種을 母本으로 하고 퍼레니얼 라이그라스, 툴페스큐, 메도우페스큐, 오차드그라스, 티모시를 花粉親으로 하여 倍數性에 따른 種·屬間 Hybridization을 검토한 바 그림 1 과 같이 Callus를 거치지 않은 植物體 再分化 頻度는 一般的으로 種間交雜에서 많았으며 Callus 形成은 染色體 倍數性間에 차이가 크지 않았다.

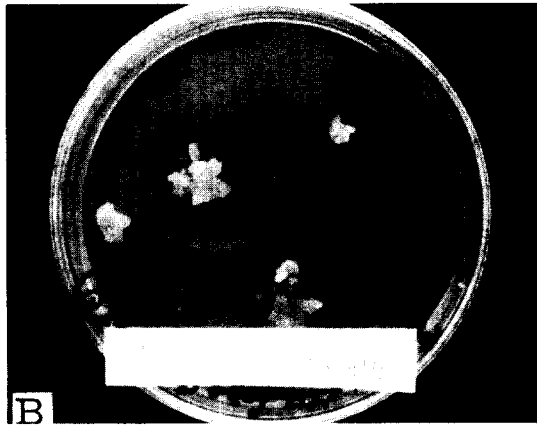
이탈리안 라이그라스와 퍼레니얼 라이그라스 및 툴페스큐와의 組合에서는 母本이 2 배體에서 植物體 再分化 頻度가 높았으며 메도우페스큐, 오차드그라스, 티모시와의 組合에서는 染色體 倍數性間에 큰 차이가 없었다. 즉 母本과 父本間에 親和性이 있는 染色體가 있을 경우에는 4 배體보다 2 배體에서 직접 植物體 再分化 頻度가 높았고 染色體가 親和性이 없는 組合에서는 倍數性의 意義가 없다는 것을 알 수 있었다. 그러나 Callus 형성은 染色體間에 親和性이 있는 이탈리안 라이그라스와 퍼레니얼 라이그라스 種間交雜에서는 잘 안될뿐 아니라 母本의 倍數性間에 차이가 없었고 이탈리안 라이그라스와 툴페스큐 및 메도우 페스큐와의 屬間交雜에서는 母本이 4 배體보다 2 배體에서 Callus 형성이 잘 되었다. 그러나 현재까지 交雜能力이 없다고 알려진 오차드 그라스와 티모시와의 組合에서는 오히려 4 배體에서 Callus 형성이 잘 되었다. 따라서 일반적으로 近緣種間에서는 直接 植物體 再分化가 잘되고 遠緣種間에서는 Callus 형성이 잘되었다.

3. 屬間雜種植物 誘導

현재까지 交雜能力이 없다고 알려진 이탈리안 라이그라스와 오차드그라스 交配에 있어서 母本을 이탈리안 라이그라스 4 배體 品種 "Leader"로 하고 父本을 오차드그라스 4 배體 Potomac으로 交配하여 4 일째 幼胚를 MS+2mg/l 2,4-D 배지에 20日 間 培養한 바 사진 1-A와 같이 Callus가 형성되었다. 이와같이 형성된 Callus 중에서 생장이 왕성하고 백색에 가까운 것을 光條件下에서 LS2.5培地에서 2차 繼代培養한바 사진 1-B와 같이 Callus가 점점 커지며 Green spot가 생기고 이것을 1/2 MS 培地에서 繼代培養한바 사진 1-C, D와 같이 Shoot가 나왔다. 이때 하나의 Callus에서 여러개의 Shoot가 나오므로 이것을 하나씩 分離하여 Root 培地인 1/4 MS 培地에서 배양한바 사진 1-E와 같이



Callus derived from 4 days old hybrid embryos cultured on MS-medium days containing 2mg/l of 2,4-D for 20 days.



B

Callus derived from A cultured on LS 2.5 medium for 1.5 month of 2. sub-culture.



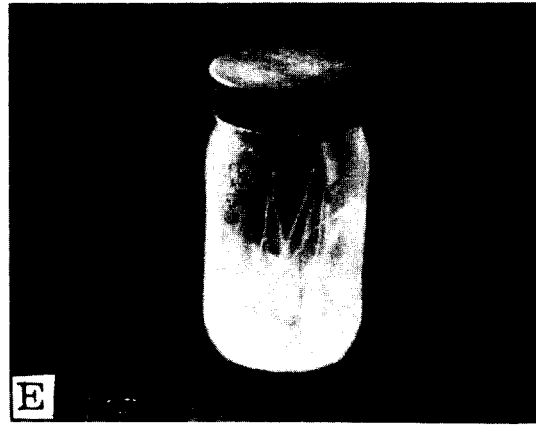
C

Early stage of shoot regeneration from B cultured on MS-medium containing 2mg/l 2,4-D for one month.



D

Bunch of shoots from C cultured on 1/2 MS-medium for one month.



E

Plantlets derived from D cultured on root medium eg. 1/4 MS-medium.

Photo 1. *L. multiflorum*, tetraploid cv. Leader x *D. glomerata* cv. Potomac plantlets regenerating from immature hybrid embryo in vitro.

發根이 되며 하나의 幼植物體가 되었다. 이와같이 육성된 幼植物體는 초기에는 葉이 기형적이었으나 Pot에 재배관리한바 正常의 植物體로 회복 되므로 後期生育까지 세심한 觀察이 요구된다.

IV. 摘 要

禾本科 牧草의 種間 또는 屬間雜種을 育成하기 위하여 이탈리아 라이그라스의 2倍體와 4倍體 品種을 母本으로 하고 우리나라 獎勵草種인 퍼레니얼 라이그라스, 톨레스큐, 메도우세스큐, 오차드그라스, 티모시를 花粉親으로 하여 除雄交配한후 穎果를 交配後 4일부터 20일간격으로 수집, 幼胚를 器內培養한바 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 이탈리아 라이그라스와 퍼레니얼 라이그라스 조합에서는 12日齡胚부터, 이탈리아 라이그라스와 톨레스큐 조합에서는 8日齡부터 Callus가 形成되고 植物體 再分化가 되었다.

2. 이탈리아 라이그라스와 메도우 세스큐 조합에서는 Callus 형성도 미약하고 植物體 再分化 頻度も 낮았다.

3. 이탈리아 라이그라스와 오차드그라스 및 티모시 조합에서는 그 頻도는 낮지만 Callus가 形成되어 植物體 再分化가 되었다.

4. 幼胚培養에서 Regeneration은 直接 植物體 再分化와 Callus를 거친 植物體 再分化로 분류할 수

있었다.

5. 交配能力이 없는 組合도 胚를 早期培養 하면 Callus를 거쳐 植物體가 再分化되어 雜種育成이 가능하였다.

6. 近綠種間에는 直接 植物體 再分化 頻도가 높고 遠綠種間에는 Callus 형성이 잘 되었다.

7. 近綠種間에서는 母本이 2倍體에서 植物體 再分化 頻도가 높았고 遠綠種間에서는 4倍體에서 Callus 形成率이 높았다.

V. 引用文獻

1. Berg, C.C., R.R. Hill, R.C. Buckner, and R.F. Barnes. 1979. Forage production and quality of synthetic derived from *Lolium* x *Festuca* hybrids. *Crop Sci.* 19: 89-93.
2. Borrill, M. 1979. Evolution of crop plant. London and New York. 137-141.
3. Buckner, R.C., H.C. Hill, A.W. Hovin, and P.B. Burrus. 1963. Cytogenetic and morphological characteristics of progenies of cross of annual ryegrass x tall fescue hybrid and their amphiploid derivatives. *Crop Sci.* 3: 453-454.
4. Buckner, R.C., H.D. Hill, and P.B. Burrus. 1961. Some characteristics of perennial and annual ryegrass x tall fescue hybrids and of the amphiploid progenies of annual ryegrass x tall fescue. *Crop Sci.* 1: 75-80.
5. Cooper, K.V., J.E. Dale, A.F. Dyer, R.L. Lyne, and J.T. Walker. 1978. Hybrid plants from the barley x rye cross. *Plant Sci. Letters* 12: 293-298.
6. Dijkstra, J., and A.L.F. Devos. 1975. Seedling growth of allopolyploids from *Lolium multiflorum* L. x *Festuca arundinacea* L. *Euphytica* 24: 181-189.
7. Hill, H.D., and H.L. Carnahn. 1962. *Lolium perenne* L. x induced *Festuca elatior* L. and hybrids with *Festuca arundinacea* Schreb. *Crop Sci.* 2: 245-248.
8. Kasperbauer, M.J., R.C. Buckner, and L.P. Bush. 1979. Tissue culture of annual ryegrass x tall fescue F1 hybrid: Callus establishment and plant regeneration. *Crop Sci.* 19: 457-460.
9. Matzk, F. 1981. Successful crosses between *Festuca arundinacea* Schreb. and *Dactylis glomerata* L. *Theor. Appl. Genet.* 60: 119-122.
10. McCoy, T.J. 1985. Interspecific hybridization of *Medicago sativa* L. and *M. rupestris* M.B. using ovule-embryo culture. *Can. J. Genet. Cytol.* 27: 238-245.
11. Nitzsche, W. 1988. Personal communication.
12. Springer, W.D., and R.C. Buckner. 1982. A meiotic examination of *Lolium multiflorum* Lam. x *Festuca arundinacea* Schreb. F1 hybrids. *Crop Sci.* 22: 305-309.