

N6 배지에서 오차드그래스 캘러스로부터 빠른 재분화

김기용 · 임용우 · 최기준 · 신재순 · 김정갑 · 조진기*

Rapid Regeneration of Plants on N6 Medium from Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) Calli

Ki-Yong Kim, Yong Woo Rim, Gi Jun Choi, Jae Soon Shin, Jeong Gap Kim and Jinki Jo*

Summary

We confirmed conditions for callus formation and plant regeneration of five varieties of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). Among five varieties of orchardgrass, "Hapsung 19" expressed the highest rate for both of callus formation and plant regeneration. Otherwise, among SH (Schenk and Hildebrandt), MS (Murashige and Skoog) and N6 medium (Chu), MS and N6 medium were highest degree of efficiencies in callus formation and plant regeneration, respectively. In this study, we determined volume of hormones appended in media; 3 mg/ℓ of dicamba for callus formation and 1 mg/ℓ of NAA (1-naphtalene acetic acid) and 5 mg/ℓ of kinetin (6-furfurylamino-purine) for plant regeneration were appended in their media. We obtained orchardgrass plants from callus about 50~80 days after transferred to regeneration media.

I. 서 론

오차드그래스는 1906년에 미국으로부터 우리나라에 도입된 이래, 현재 혼파초지 조성시 이용되는 가장 중요한 목초 중의 하나로 인식되어 있다. 또한 추위와 가뭄에도 잘 견디는 북방형 목초로서 우리나라 전역에 걸쳐 재배가 가능하다. 하지만 더위와 습해에 약한 단점이 있어 일 평균기온이 25℃ 이상이면 생육이 저하되고, 6월에 시작되는 장마기와 7~8월의 혹서기에 피해가 심하여 안정적인 조사료 생산에 차질을 빚게 된다. 우리나라에서는 1970년대에 들어 육종사업을 시작하여 몇 종의 합성종을 육성하였으나 널리 보급되지는 못하였다.

그런데, 어떤 형질을 발현시키고 그 후대에까지 유전이 가능한 특정 염기서열을 보유한 DNA 단편(유전자)을 분리하고 증폭하는 유전자클로닝 기술이 1970년대부터 개발되기 시작하여, 유전자재조합 기술의 발달과 함께, 분류학적으로 전혀 무관한 생물의 유전자를 각종 생명체에서 발현시킬 수 있으므로, 목초 및 사료작물에서 폭넓은 응용 가능성이 기대되고 있다. 물론 이러한 응용이 가능하게 되기 위해서는 조직배양을 통한 식물체의 재분화체계의 확립이 절대적으로 요구된다.

목초 및 사료작물의 조직배양에 있어서, 알팔파 등의 콩과 식물에 대한 연구는 다수 있었지만, 화본과 식물에 대한 연구는 절대적으로 많이 부족하였

축산기술연구소 초지사료과(National Livestock Research Institute, Suwon 441-350, Korea)

* 경북대학교 농과대학(College of Agriculture, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea)

다. 오차드그래스 (*Dactylis glomerata* L.)의 조직배양에 관한 연구가 시작된 것은 1980년대에 들어서이며, 그 후 이에 관한 몇 편의 논문이 발표되어 있다 (Conger 등, 1983, 1991; Gray 등, 1984; Songstad와 Conger, 1986; Hanning와 Conger, 1986; Horn 등, 1988). 하지만 우리나라에서는 오차드그래스의 조직배양에 대한 보고가 전혀 없기 때문에, 본 실험에서는 오차드그래스의 캘러스 유도 및 재분화 조건을 확립하므로써 효율적으로 재분화가 가능하도록 하므로써, 여름의 고온기에도 생육이 가능한 내하고성 오차드그래스 품종을 개발하기 위한 기초자료로서, 캘러스의 유도 및 재분화 조건을 확립하고자 하였다.

앞으로의 연구계획은, 본 실험에서 확립한 재분화 조건을 근거로 하여 Kim 등 (1997)이 분리한 내열성 유전자 (*BcHSP17.6*)를 오차드그래스에 도입하므로써, 여름철 고온에서도 생육이 잘 되는 오차드그래스 품종을 개발하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 종자소득

오차드그래스 종자로부터 캘러스 유도 조건 및 식물체 재분화 조건을 확립하기 위한 식물재료로서, 외국 도입종 중 Potomac, Warrior 및 국내 육종품종인 합성 19호, 합성 20호, 합성 21호 등 5품종의 오차드그래스를 공시하였다. 이들 품종의 종자를 70% 에탄올에서 1분, 0.1% SDS/HgCl₂ 용액에서 15분, 1% NaOCl 용액에서 5분간 소독한 다음, 멸균수로 2회 씻어내었다.

2. 캘러스 유도 및 증식

종자로부터 직접 캘러스를 유도함에 있어 가장 적합한 유도 조건을 찾기 위하여, 기본배지로는 MS (Murashige와 Skoog, 1962), SH (Schenk와 Hilde-

brandt, 1972), N6 (Chu, 1978) 등 3종의 배지를 사용하였고, 이들 배지에 auxin으로는 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) 또는 dicamba (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid)를, cytokine으로는 kinetin (6-furfurylaminopurine)을 각각 0~7 mg/ℓ 농도로 첨가하여 사용하였다. 호르몬 조합은 auxin을 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 mg/ℓ 로 하고 cytokine을 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 mg/ℓ 로 해서 전체 64처리 조합으로 하였다. 각 처리별 배지에 소독한 종자를 직접 치상하여 28℃에서 배양하면서 캘러스 유도조건을 배지별로, 호르몬 종류별로, 호르몬 농도별로 조사하였다. 모든 배지에서 pH는 5.8, agar 농도는 0.8%로 조절하였으며, 광조건과 암조건으로 구분했을 때의 캘러스 유도 조건도 조사하였다.

유도된 캘러스는 식물체로의 재분화에 이용하기 위하여, 본 실험에서 찾아낸 최적 조건의 유도배지에서 20일 간격으로 계대배양하면서 대량으로 증식하였다.

3. 캘러스로부터 식물체 재분화

공시한 5가지 품종의 오차드그래스 캘러스로부터 식물체를 재분화하기 위한 최적 조건을 찾기 위하여, 기본배지로는 MS, SH, N6, 등 3종의 배지를 사용하였고, NAA (1-naphthalene acetic acid) 농도를 0.5, 1, 1.5, 2 mg/ℓ 로 하고 kinetin 농도를 4, 5, 6, 7 mg/ℓ 로 하여 각각 조합된 처리조건에서 재분화 정도를 조사하였다. 재분화 배지로 옮겨준 캘러스의 크기는 직경 2 mm 정도로 했으며, 16시간의 광조건 (2,500 Lux)에서 26℃로 조절되는 생장실에서 배양하였고, 캘러스를 재분화 배지로 옮긴지 50일째에 형성된 shoot 및 root의 비율을 재분화율로 하였다.

SH 배지에는 첨가되는 호르몬 외에 배지 1ℓ 에 sucrose 30 g을, N6 배지에는 sucrose 50 g과 casein hydrolysate 2 g을, MS 배지에는 sucrose 30 g과 casein hydrolysate 2 g을 각각 첨가하였으며, 잎과 뿌리가 형성된 캘러스는 호르몬을 첨가하지 않은 각각의 배지에 옮겨 재분화를 완성하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 오차드그래스 종자로부터 캘러스 유도

2,4-D와 kinetin의 농도를 달리하여 오차드그래스 종자로부터 직접 캘러스를 유도하였을 때, 가장 적합한 호르몬의 농도는 사용된 기본배지의 종류 및 품종에 관계없이 kinetin은 첨가하지 않고 2,4-D를 2~5 mg/ℓ 로 첨가한 처리구에서 캘러스 형성이 양호하였으며, 2,4-D를 3 mg/ℓ 첨가한 처리구에서 가장 우수하였다. 또한 2,4-D를 첨가하지 않은 처리구에서는 캘러스가 전혀 형성되지 않았고, kinetin의 농도가 높아질수록 캘러스 형성 정도는 급격히 저하되었다.

Kinetin은 첨가하지 않고 2,4-D를 3 mg/ℓ 첨가하였을 때, 모든 품종에서 SH나 N6 배지에 비해 MS 배지에 배양한 것이 캘러스 형성량이 많았다. 그래서, MS 배지에서 캘러스를 유도하여 1개월 배양 후 종자 1 개당 유도된 캘러스 무게를 측정할 결과, 5 가지 품종 중에서 합성 19호가 225.3 mg으로 캘러스 형성이 가장 좋았으며, Potomac이 197.8 mg으로 가장 저조하였다 (Table 1).

각 배지에 dicamba를 3 mg/ℓ 첨가했을 경우, 2,4-D를 3 mg/ℓ 첨가했을 때보다 캘러스 형성 정도가 약 20% 향상되었다 (Table 2). 앞에서와 마찬가지로 MS 배지가 가장 양호한 것으로 나타났고, SH 배지와 N6 배지간에는 별 차이를 나타내지 않았으며, 품종별로 관찰했을 때에도 역시 합성 19호가 가장 우

Table 1. Effect of basic medium on callus growth of several varieties of orchardgrass. Fresh weight of callus formed from seed was measured after culture for one month. 3 mg/ℓ of 2,4-D and 0 mg/ℓ of kinetin were added in three kinds of media

Variety	Fresh weight of callus/seed in three kinds of media		
	Mean ± SD (mg)		
	SH	MS	N6
Hapsung 19	198.4 ± 3.39	225.3 ± 2.43	201.8 ± 1.78
Hapsung 20	190.7 ± 0.88	218.1 ± 2.19	189.3 ± 1.39
Hapsung 21	196.0 ± 2.04	221.3 ± 1.62	196.8 ± 0.84
Potomac	165.5 ± 1.53	197.8 ± 1.78	163.6 ± 3.52
Warrior	190.1 ± 2.47	220.2 ± 1.53	191.1 ± 2.14

Table 2. Effect of basic medium on callus growth of several varieties of orchardgrass. Fresh weight of callus formed from seed was measured after culture for one month. 3 mg/ℓ of dicamba and 0 mg/ℓ of kinetin were added in three kinds of media

Variety	Fresh weight of callus/seed in three kinds of media		
	Mean ± SD (mg)		
	SH	MS	N6
Hapsung 19	219.5 ± 2.63	247.5 ± 1.40	220.7 ± 1.45
Hapsung 20	209.1 ± 1.41	239.2 ± 2.78	208.0 ± 1.68
Hapsung 21	213.4 ± 3.77	242.7 ± 1.49	214.8 ± 2.42
Potomac	185.7 ± 2.35	215.0 ± 3.05	181.3 ± 1.37
Warrior	210.2 ± 1.93	242.5 ± 2.64	212.8 ± 2.50

수하였고, Potomac이 제일 저조하였다. MS 배지에서 켈러스 형성 정도는 합성 19호가 247.5 mg이었고 Potomac은 215.0 mg이었다. 또한 광조건과 암조건으로 구분하여 켈러스를 유도하고 배양하였을 때, 빛의 유무에는 거의 영향을 받지 않았다. 따라서 종자로부터 켈러스를 유도하고 증식하기 위한 배지는 MS 기본배지에 dicamba를 3 mg/ℓ 첨가하여 사용하는 것이 가장 좋은 것으로 판단된다.

Zhou와 Yang (1991)이 벼에서 배발생을 유도한 연구와 Conger와 Hanning (1991)이 오차드그래스 잎 조직으로부터 체세포발생을 유도한 연구에서도 2,4-D를 첨가한 배지보다는 dicamba를 첨가한 배지에서 배발생율이 높은 것으로 보고하고 있다.

2. 켈러스로부터 식물체로의 재분화

재분화를 유도하기 위해 사용한 켈러스는 켈러스 형성후 2~3회 계대배양한 켈러스를 주로 사용하였으며, 재분화배지로 옮겨기 전에 dicamba 3 mg/ℓ 을 첨가한 N6 배지에서 15일간 배양하였다.

기본배지로 MS, SH, N6 등 3종의 배지를 사용하고, NAA 농도를 0.5, 1, 1.5, 2 mg/ℓ 로 하고 kinetin 농도를 4, 5, 6, 7 mg/ℓ 로 하여 각각 조합된 처리조건에서, 합성 21호의 재분화 정도를 조사한 결과, N6 기본배지에 NAA 1 mg/ℓ 와 kinetin 5 mg/ℓ 을 첨가한 처리구에서 재분화율이 가장 높은 것으로 관찰되었다. 그래서 호르몬 첨가량을 NAA 1 mg/ℓ 와 kinetin 5 mg/ℓ 으로 고정하고 기본배지를 MS, SH, N6 배지로 달리하여, 5가지 공시품종에 대해 재분화

율을 조사한 결과, 모든 품종에서 N6 기본배지를 사용하였을 때 가장 높게 나타났으며, 공시한 5가지 품종 중에서 재분화율이 가장 높은 품종은 합성 19호였고, 재분화율이 가장 낮은 품종은 Warrior 였다 (Table 3).

합성 21호는 뿌리 형성율에서는 가장 높게 나타났지만, 잎 형성율에서는 합성 19호나 합성 20호에 비해 낮았으며, 전체적으로 국내에서 육종한 합성 품종이 도입품종인 Potomac이나 Warrior에 비해 재분화율이 높은 것으로 나타났다. Li 등 (1993)도 식물체 재분화는 genotype에 따라 변화가 있는 것으로 보고하고 있다.

오차드그래스 품종 중 재분화율이 가장 높은 것으로 판명된 합성 19호를 예로 들어, 종자로부터 켈러스를 유도하고 재분화를 완성할 때까지 사용한 배지 및 소요된 시간을 살펴보면, 소독한 종자를 dicamba 3 mg/ℓ 를 첨가한 MS 배지에 치상하여 30일 경과하였을 때, 종자 1개당 247.5 mg의 켈러스를 얻을 수 있었으며, 동일한 배지에서 20일 간격으로 2~3회 계대배양하였으며, 그 후 dicamba 3 mg/ℓ 를 첨가한 N6 배지로 옮겨 15일간 배양하였고, 재분화배지인 NAA 1 mg/ℓ 와 kinetin 5 mg/ℓ 를 첨가한 N6 배지에 1~2회 계대배양하는 동안 뿌리가 형성되었고, 동일한 배지에 1~2회 더 계대배양하면서 잎이 형성되었으며, 뿌리와 잎이 형성된 켈러스를 호르몬을 첨가하지 않은 N6 기본배지에 옮겨, 2회 계대배양하는 동안 완전한 모양의 식물체로 재분화되었다 (Table 4).

Table 3. Effect of basic medium on plant regeneration of several varieties of orchardgrass. The ratio was determined by counting of regenerated (rooting and/or shooting) calli. 1 mg/ℓ of NAA and 5 mg/ℓ of kinetin were added in three kinds of media

Variety	Percentage of rooting (%)			Percentage of shooting (%)		
	SH	MS	N6	SH	MS	N6
Hapsung 19	37.0	30.0	56.0	9.0	13.0	29.0
Hapsung 20	31.0	24.0	43.0	7.0	10.0	25.0
Hapsung 21	44.0	36.0	68.0	2.0	7.0	17.0
Potomac	20.0	18.0	31.0	4.0	9.0	22.0
Warrior	28.0	23.0	35.0	2.0	5.0	11.0

Table 4. Suitable media condition and culture time in callus formation and plant regeneration

Regeneration Steps	Basal medium	Addition (/ ℓ)	Culture time (day)
Callus formation	MS	dicamba (3mg), casein hydrolysate (2g)	30
Callus multiplication	MS	dicamba (3mg), casein hydrolysate (2g)	40~60
	N6	dicamba (3mg), casein hydrolysate (2g)	15
Plant regeneration	N6	NAA (1mg), kinetin (5mg), casein hydrolysate (2g)	30~50
Completion of regeneration	N6	casein hydrolysate (2g)	20~30

Chung (1985)은 벼의 재분화 실험에서 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 양을 반으로 줄이고 L-Glutamine을 첨가한 N6 배지에서 재분화율이 높다고 보고하였으며, Zong 등 (1993)은 turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.)의 재분화

실험에서 MS 배지에 $30 \mu\text{M}$ 의 dicamba와 $2.25 \mu\text{M}$ 의 BA (6-benzylaminopurine)을 첨가한 배지에서 재분화율이 우수한 것으로 보고하였다.

Fig. 1은 캘러스 유도부터 재분화까지의 과정을

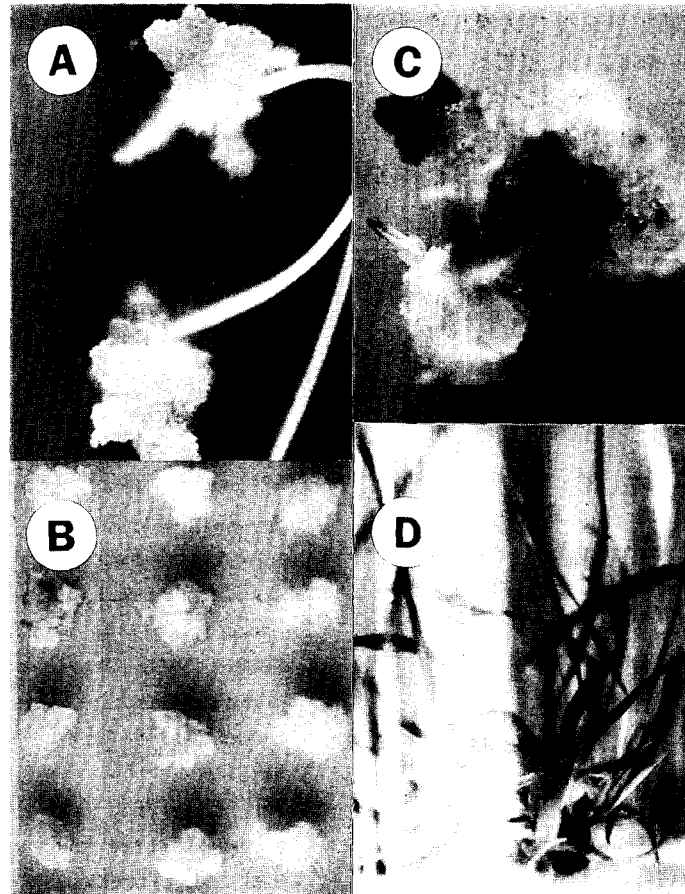


Fig. 1. Callus formation and plant regeneration of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L. cv. Hapsung 19). A, Callus formation from mature seed; B, Callus multiplication; C, Shooting form; D, Regenerated orchardgrass.

사진으로 보여주는 것으로서, Fig. 1A는 종자를 캘러스 유도배지에 치상후 15일째의 사진으로, 종자가 발아되면서 어린 유묘가 캘러스 형태로 바뀌는 것을 관찰할 수 있다. Fig. 1B는 형성된 캘러스를 동일한 배지로 옮겨 증식하는 과정의 사진이며, Fig. 1C는 캘러스로부터 뿌리와 잎이 형성되고 있는 상태의 사진이고, Fig. 1D는 재분화가 완성되고 화분으로 옮겨지기 직전의 사진이다.

IV. 적 요

5품종의 오차드그래스 종자로부터 직접 캘러스를 유도하고, 형성된 캘러스로부터 식물체를 재분화하는 조건을 확립하였다. 공시품종중 합성 19호가 캘러스 유도 및 재분화에서 가장 우수한 것으로 판명되었으며, SH, MS, N6 배지중에서 캘러스 유도시에는 MS 배지가, 재분화시에는 N6 배지가 유리한 것으로 나타났다. 각 단계별 배지중 호르몬 첨가는 캘러스 유도 및 증식시에 dicamba 3 mg/ℓ, 뿌리와 잎의 유도시에 NAA 1 mg/ℓ 와 kinetin 5 mg/ℓ, 재분화 완성기에 무첨가한 조건이 가장 효율이 좋았으며, 캘러스로부터 완전한 식물체로 재분화되는데 필요한 시간은 약 50~80일이었다.

V. 참고 문헌

1. Chu, C. 1978. The N6 medium and its applications to another culther of cereal crops. Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture, Science Press, Pecking, pp. 43-50.
2. Chung, K.S. 1985. Application of anther culture techniques to rice improvement. Korean J. Plant Tissue Cult. 12:35-55.
3. Conger, B.V., G.E. Hanning, D.J. Gray and J.K. McDaniel. 1983. Direct embryogenesis from mesopyll cells of orchardgrass. Science. 221:850-851.
4. Conger, B.V. and G.E. Hanning. 1991. Regeneration of embryogenic orchardgrass germplasm with a high capacity for somatic embryogenesis from *in vitro* cultures. Crop Sci. 31:855.
5. Gray, D.J., B.V. Conger and G.E. Hanning. 1984. Somatic embryogenesis in suspension and suspension derived callus cultures of *Dactylis glomerata* L. Protoplasma. 122:196-202.
6. Hanning, G.E. and B.V. Conger. 1986. Factors influencing somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata* L. Plant Physiol. 123:23-29.
7. Horn, M.E., B.V. Conger and C.T. Harms. 1988. Plant regeneration from protoplasts of embryogenic suspension cultures of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). Plant Cell Rep. 7:371-374.
8. Kim, K.Y., M.S. Chung and J.K. Jo. 1997. Acquisition of thermotolerance in the transgenic plants with *BcHSP17.6* cDNA. J. Korean Grassl. Sci. 17:379-386.
9. Li, L., R. Qu, A. de Dochko, C. Fauquet and R.N. Beachy. 1993. An improved rice transformation system using the biolistic method. Plant Cell Rep. 12:250-255.
10. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:71-78.
11. Schenk, R.U. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50:199.
12. Songstad, D.D. and B.V. Conger. 1986. Direct embryogenesis from cultured anthers and pistils of *Dactylis glomerata* L. Am. J. Bot. 73:989-992.
13. Zhong, H., M.G. Bolyard, C. Srinivasan and M.B. Sticklen. 1993. Transgenic plants of turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. Plant Cell Rep. 13:1-6.
14. Zhou, C. and H.Y. Yang. 1991. *In vitro* production of haploids in rice through ovary culture. In Bajaj YPS, ed., Biotechnology in Agriculture and Forestry 14. Springer Verlag, Berlin. pp. 180-192.