

Perennial ryegrass의 종자유래 캘러스로부터 식물체 재분화

원성혜 · 이병현 · 조진기

Plant Regeneration from Seed-Derived Callus in Perennial Ryegrass

Sung-Hye Won, Byung-Hyun Lee and Jinki Jo

Abstract

This study was carried out in order to establish plant regeneration via seed-derived callus of perennial ryegrass.

Varietal difference in callus growth and plant regeneration was obvious between two cultivars of perennial ryegrass. "Reveille" showed a relatively high capacity for plant regeneration. The MS medium was superior to SH or B₅ in callus formation and plant regeneration. The highest regeneration frequency (60%) from callus was obtained in presence of 5 mg/ℓ 2,4-D and 1 mg/ℓ kinetin. Regeneration response varied among callus cultures initiated from the same cultivar. Regeneration frequency was the most effective in 6 weeks-old calli after initiation and lost their regeneration capacity gradually over a period of 12 weeks.

(Key words : Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), Plant regeneration)

I. 서 론

Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)는 초기생육이 빠르고 정착 및 분얼력이 강하여 이른 봄부터 이용할 수 있으며, 내한성에 강한 목초이다. 그러나 고온과 건조에 대한 저항성이 낮아 건조지대나 더운 지방에서는 재배하기 어렵고 특히 여름의 고온시에 엽부병의 발생이 많아 수량 감소에 영향을 주기도 한다. 최근에는 목초의 생산성 향상과 품질개량을 위해 많은 재배적인 연구가 진행되고 있다. 이와 더불어 조직배양기법을 이용한 재분화

된 식물체의 육성은 새로운 유전자원의 확대라는 측면에서 중요한 의미를 지닐 뿐만 아니라, 신종 육성을 위한 하나의 재료식물로 이용될 수 있다. 우리나라에서 목초 및 사료작물의 조직배양에 대한 연구는 외국에 비해 절대적으로 부족한 실정이며, 특히 perennial ryegrass의 조직배양에 대한 연구 보고는 전혀 없다. Perennial ryegrass의 식물체 재분화에 대한 연구는 캘러스 (Torello와 Symington, 1986), 원형질체 (Creemers-Molenaar 등, 1989; Dalton, 1988) 및 현탁배양세포 (Zaghmout와 Torello, 1990)에서 보고된 바 있다. 그러나 이러한

재분화 조건은 유전적 요인에 따른 영향을 많이 받으므로 품종에 따라 재분화 조건이 다양하다 (Zaghmout와 Torello, 1992). 특히 본 연구에서는 종자 유래의 캘러스로부터 식물체 재분화를 시도하고자 하였는데, 종자는 배양 재료의 안정적인 공급이라는 측면에서 매우 중요한 의의를 가진다. 최근에는 형질전환 기술의 발달로 인하여 콩과 작물 뿐만 아니라 화본과 작물에 외래 유전자를 도입함으로써 신품종의 개발 및 유용 작물의 창출에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다 (Wang 등, 1997; van der Mass 등, 1994; Denchev 등, 1997; Cheng 등, 1997).

본 실험에서는 perennial ryegrass의 종자 유래의 캘러스로부터 효율적인 식물체 재분화 체계를 확립하고자, 품종간의 차이와 배지조성 및 성장조절 물질의 조성 등에 대한 일련의 실험을 수행하여 얻어진 결과를 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

본 실험에는 perennial ryegrass 품종 중 Reveille과 Modus의 종자를 공시품종으로 사용하였다. Perennial ryegrass의 종자로부터 캘러스 형성을 위한 종자 멸균은 30% sodium hypochlorite에서 1시간 살균한 후, 멸균수로 3회 세정하고, 4°C 암상태에서 7일 동안 멸균수에 담구어 두었다. 다시 10% sodium hypochloride 용액으로 10분간 처리한 다음 멸균수로 3회 세정하여 캘러스 유도에 이용하였다.

멸균된 종자는 외피를 제거한 후 2,4-D 5-10 mg/l, kinetin 0-0.5 mg/l, sucrose 30 g/l, gelrite 3 g/l가 첨가된 MS 배지에 이식하여 26±1°C의 암상태에서 배양하여 캘러스를 유도하였다. 유도된 캘러스는 2주일간 배양하고 2주 간격으로 계대

하여 캘러스 증식을 유도하였다. 캘러스 형성 능력은 20종자당 형성된 캘러스 생체중을 5반복 조사하였으며, 식물체 재분화율은 이식된 캘러스에 대한 재분화 식물체가 형성된 캘러스의 비율로 나타내었다.

Perennial ryegrass의 종자로부터 캘러스 유도를 위한 적정배지를 규명하고자 B₅ (Gamborg 등, 1968), SH (Schenk와 Hildebrandt, 1972), 및 MS (Murashige와 Skoog, 1962) 배지에 2,4-D 10 mg/l를 첨가하여 캘러스 형성률과 식물체 재분화 능력을 각 배지간에 비교하였다.

Perennial ryegrass의 캘러스로부터 재분화 조건을 확립하기 위하여 종자로부터 유도된 5주령의 캘러스를 2~3 mm 크기로 세분하여 2,4-D 1-10 mg/l와 kinetin 0~2 mg/l이 조합 처리된 MS배지 (sucrose 30 g/l, gelrite 3g/l, pH5.6)에 이식하여 26±1°C, 16시간 명상태 (2,500 Lux)에서 배양하였으며, 45일 후에 식물체 재분화율을 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

Perennial ryegrass의 성숙종자배양에서 캘러스 형성의 품종간 차이를 조사한 바 (Table 1), 공시 품종 Reveille이 Modus보다 대부분의 처리구에서 캘러스 형성이 좋았다. Reveille은 2,4-D 10 mg/l의 단용처리시 캘러스 생체중이 457 mg/l로 가장 높게 나타났으며, 2,4-D 5 mg/l와 kinetin 0.5 mg/l 처리구에서 캘러스 형성률이 가장 낮았다. Modus는 2,4-D 10 mg/l의 처리구에서 캘러스 생체중이 257 mg/l로 가장 높게 나타났다. 두 품종 공히 2,4-D와 kinetin의 혼용 처리보다는 2,4-D 단용처리시 캘러스 형성이 좋은 것으로 조사되었다. 캘러스는 형태적으로 조직이 치밀하고 유백색을 띠는 embryogenic 캘러스와 부쉬지기 쉬운 조

적과 노란색을 띠는 non-embryogenic 캘러스로 구분되었는데, embryogenic 캘러스만을 선별하여 재분화에 이용하였다. 또한 배양시간이 증가할수록 embryogenic 캘러스의 형성률은 감소하였으며, 이러한 결과는 대부분의 화분과 식물의 조직배양에서 보고된 결과들과 일치하였다 (Vasil 등, 1983).

Perennial ryegrass 종자유래의 캘러스로부터 식물체 재분화를 유도하기 위하여 2,4-D와 kinetin 조합으로 처리한 결과, 2,4-D 5 mg/ℓ와 kinetin 1 mg/ℓ 조합에서 가장 좋은 재분화 효율을 나타내

었다 (Table 2). Creemers-Molenaar 등 (1989)은 현탁배양세포와 원형질체로부터 2,4-D 무첨가배지에서 shoot을 유도한 바 있었으나, 본 실험에서는 kinetin이 전혀 첨가되지 않았거나, 2,4-D가 1 mg/ℓ 이하의 저농도 또는 10 mg/ℓ의 고농도로 처리하였을 때는 캘러스가 전혀 shoot을 형성하지 못하였다. Zaghmout와 Torello (1992)는 perennial ryegrass의 종자 및 줄기로부터 유도된 캘러스를 cefotaxime에 처리하였을 때, embryogenic 캘러스의 생성율은 증가하였으나 재분화된 식물체의 대부분

Table 1. Varietal differences on callus growth in the mature seed culture of *Lolium perenne* L.

Cultivars	Growth regulators (mg/ℓ)		Fresh weight of callus / 20 seeds Mean±SD (mg)
	2,4-D	kinetin	
Reveille	10	-	457±2.5
	5	-	203±5.2
	10	0.5	418±4.9
	5	0.5	197±3.8
Modus	10	-	257±3.2
	5	-	214±1.2
	10	0.5	132±3.9
	5	0.5	97±2.7

Table 2. Effect of growth regulators on shoot regeneration from callus of *Lolium perenne* L.

Kinetin (mg/ℓ)	Number of shoots				
	2,4-D (mg/ℓ)				
	1	2	3	5	10
0	0	0	0	0	0
0.5	0	n	5	10	0
1.0	2	2	8	12	0
2.0	0	1	1	2	0

Each value represents the number of shoots from 20 seed-derived calli per treatment. Shoot regeneration was scored at 45 days after plating. n: not determined.

이 albino를 생산하였다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 모든 처리구에서 albino는 거의 나타나지 않았으며, 유도된 shoot은 MS 기본배지에서 뿌리를 형성하여 완전한 개체로 성장하였다 (Fig. 1).

Perennial ryegrass의 종자배양에서 캘러스 형성 및 재분화에 가장 적합한 배지를 선정하고자 B₅, SH 및 MS 배지에 배양하였다. 캘러스 생체중은 MS배지에서 457 mg으로 가장 좋았으며 B₅ 배지에서 296 mg으로 가장 낮게 나타났다 (Table 3). 또한 재분화율도 MS 배지에서 60%로 가장 높게 나타나 캘러스 형성이 좋은 배지에서 재분화 효율도 높게 나타나는 경향을 보였다.

한편 캘러스의 배양 기간이 재분화 효율에 영향을 미쳤는데, 캘러스 유도 기간을 3주에서 24주까지 배양한 후 재분화를 유도한 결과, 배양 6주의

캘러스로부터 재분화 효율이 60%로 가장 높게 나타났다으며, 배양 기간이 길어질수록 재분화 효율은 감소하였다 (Table 4). 24주 이상 배양하였을 때는 전혀 재분화되지 않았다. 또한 12주 이상 배양하였을 때는 embryogeic 캘러스가 non-embryogenic 캘러스로 되면서 캘러스 증식만 일어났다. 뿐만 아니라 배양 기간이 긴 캘러스에서 유래된 식물체는 albino 현상이 나타났다. 이러한 결과는 Creemers-Molenaar 등 (1989)이 보고한 것과 일치하는 것으로, perennial ryegrass의 현탁배양세포로부터 재분화를 유도할 때 배양 시간에 따른 재분화 효율의 비교에서 중간 차이가 있기는 하나, 대부분 배양 10주 이상 되었을 때 재분화 효율이 현격히 감소하고 albino도 많이 나타난다고 보고하였다.

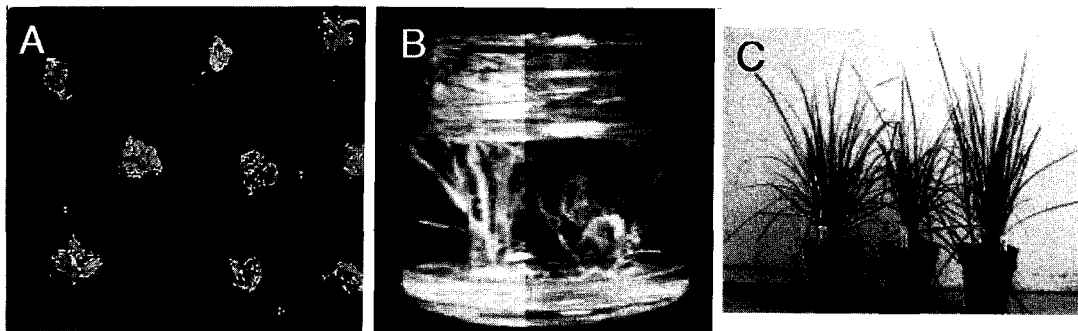


Fig. 1. Plant regeneration from seed-derived callus of *Lolium perenne* L.

A, green shoot from seed-derived callus 6 weeks after cultures. B, plant regeneration and root formation of plantlet. C, regenerated plants in soil in a greenhouse

Table 3. Effect of basic medium on callus growth and plant regeneration in mature seed culture of *Lolium perenne* L.

Media	Fresh weight of callus/20 seeds ^{a)}	No. of calli transferred	No. of shoot (%)
	Mean ± SD (mg)		
B ₅	296 ± 7.8	60	12 (20)
SH	327 ± 4.2	70	29 (41)
MS	457 ± 2.5	70	42 (60)

^{a)} Cultivar : Reveille

Table 4. Effect of culture age on plant regeneration from callus of *Lolium perenne* L.

Culture age (weeks)	No. of calli transferred	No. of calli with shoots (%)
3	50	27 (54)
6	70	42 (60)
12	100	12 (12)
24	100	0 (0)

IV. 적 요

Perennial ryegrass의 종자배양에서 캘러스 형성과 식물체 재분화에 적합한 조건을 규명하기 위하여 품종간의 차이와 배지조성 및 성장조절물질의 조성에 대한 일련의 실험을 수행한 바, 공시품종 중 Reveille이 종자로부터 형성된 캘러스 생체중이 가장 높게 나타났다. 또한 2,4-D 5 mg/ℓ 와 kinetin 1 mg/ℓ 이 조합 처리된 배지에서 재분화율이 가장 높게 나타났으며, MS 배지가 SH, B₅ 배지보다 종자에서 형성된 캘러스 생체중이 무거웠으며, 식물체 재분화율도 60%로 높게 나타났다. 배양 6주된 캘러스로부터 재분화율이 가장 높게 나타났으며 캘러스 배양기간이 길어질수록 식물체 재분화율은 감소하였다.

Acknowledgements

이 연구는 농림기술개발연구과제 (관리번호 297061-4) 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

V. 인 용 문 헌

1. Cheng, M., J.E. Fry, S. Plang, H. Zhou, C.M. Hironaka, D.R. Duncan, T.W. Conner and Y. Wan. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol. 115: 971-980.
2. Creemers-Molenaar, J., P. van der Valk, J.P.M. Loeffen and M.A.C.M. Zaal. 1989. Plant regeneration from suspension cultures and protoplasts of *Lolium Perenne* L. Plant Sci. 63:167-176.
3. Dalton, S.J. 1988. Plant regeneration from cell suspension protoplasts of *Festuca arundinacea* Schreb. (tall fescue) and *Lolium Perenne* L. J. Plant Physiol. 132:170-175.
4. Donchev, P.D., D.D. Songstad and J.K. McDaniel, 1997. Transgenic orchardgrass (*Dactylis glomerata*) plants by direct embryogenesis from microprojectile mombarded leaf cells. Plant Cell reports 16:813-819.
5. Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151.
6. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15:473-492.
7. 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.* 50:199-201.
8. Torello, W.A. and A.J. Symington. 1986. Regeneration from perennial ryegrass callus tissue. *Hort Science* 19:56-57.
 9. van der Maas, H.M., E.R. de Jong, S. Rueb, L.A.M. Hensgens and F.A. Krens. 1994. Stable transformation and long-term expression of the *gusA* reporter gene in callus lines of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant Mol. Biol.* 24:401-405.
 10. Vasil, V., D. Wang and I.K. Vasil. 1983. Somatic embryos and plants from cultured protoplasts of *Pennisetum purpureum* Schum. (Napier grass). *Z. Pflanzenphysiol.* 111:233-236.
 11. Wang, G.R., H. Binding and U.K. Posselt. 1997. Fertile transgenic plants from direct gene transfer to protoplasts of *Lolium perenne* L. and *Lolium multiflorum* Lam. *J. Plant Physiol.* 151:83-90.
 12. Zaghmout, O.M.F. and W.A. Torello. 1990. Isolation and culture of protoplasts from embryogenic suspension cultures of red fescue (*Festuca rubra* L.). *Plant Cell Reports* 9:340-343.
 13. Zaghmout, O.M.F. and W.A. Torello. 1992. Plant regeneration from callus and protoplasts of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *J. Plant Physiol.* 140:101-105.