

이탈리안 라이그라스 종자로부터 캘러스 유도 및 식물체 재분화

임용우 · 김기용 · 최기준 · 성병렬 · 신정섭*

Callus Induction from Seeds of Italian ryegrass and Plant Regeneration

Yong Woo Rim, Ki-Yong Kim, Kee Jun Choi, Byung Ryul Sung and Jeong Sheop Shin*

Abstract

The conditions for callus formation and plant regeneration were confirmed in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). Among SH (Schenk and Hildebrandt), MS (Murashige and Skoog) and N6 medium (Chu) MS medium was highest degree of efficiencies respectively in callus formation and plant regeneration. In this study, we determined volume of hormones and other compounds appended in media. For callus formation, only 5 mg/ℓ of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) was appended in their media. For plant regeneration, we used MS medium containing 1.0 mg/ℓ of BA and 0.1 mg/ℓ of NAA.

(Key words : Italian ryegrass, Callus induction, Plant regeneration)

I. 서 론

이탈리안 라이그라스(*Lolium multiflorum* Lam.)는 일년생 또는 월년생 목초로서 초기 생육이 빠르고, 단위 면적당 수량, 영양가치 및 가축의 기호성이 우수하여 양질의 조사료 생산을 위해 좋은 초종이다. 이 초종은 전형적인 채초형으로 기후의 변화에 민감하여 여름의 고온이나 건조, 겨울의 추위 등에 약하나 토양이 비옥하고 습하며 겨울이

따뜻한 기후지대에서는 생육이 우수하다. 우리나라에서는 주로 남부지방(대전 이남)에서 답리작으로 재배되고 있으며 청예, 건조, 사일리지 등으로 이용하고 있으나 주로 청예 및 예건하여 사일리지로 이용하고 있다.

이탈리안 라이그라스의 품종은 대부분 도입품종이며 최근에 내한성을 향상시킨 국내 육성 품종(화산 101호)가 개발되었다(최 등, 1998). 유전공학을 이용한 목초개발 또한 전통적인 육종방법과

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

* 고려대학교 생명공학원 (Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

함께 활발하게 연구되어지고 있는데, 대부분의 목초종들에서 새로운 유전자를 도입하여 형질전환 식물체를 얻은 보고는 90년대 이후에나 많으며 (Ye 등, 1997; Spangenberg 등, 1995; van der Maas 등, 1994), 그 응용 폭이 모든 목초 초종으로 확대되고 있다. 형질전환 기술을 이용한 유용유전자 도입의 선행과제는 조직배양을 통한 식물체의 재분화 체계를 확립하는 것이 필수적으로 선행되어야 한다.

목초의 재분화 체계에 관한 연구는 1980년대 이후 시작되어 왔는데 알팔파와 같은 두과목초에 비해 화분과 목초의 재분화 연구는 절대적으로 부족한 실정이다. 특히 라이그라스류 (*Lolium spp.*)의 식물체 재분화에 관한 보고는 극히 제한되어 있다 (Creemers 등, 1989; Wang 등, 1993). 우리나라의 경우 이탈리아 라이그라스의 조직배양에 대한 기술이 확립되어 있지 않기 때문에, 본 실험에서는 이탈리아 라이그라스의 캘러스 유도 및 재분화 체계를 확립하여 효율적으로 재분화가 가능하도록 함으로서, 형질전환을 위한 기초자료로서 활용하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 종자소독

이탈리안 라이그라스 (*Lolium multiflorum* Lam.) 종자로부터 캘러스 유도 조건 및 식물체 재분화 조건을 확립하기 위한 식물재료로서 국내 합성종인 화산101호와 도입품종인 Florida 80을 공시하였다. 두 품종의 종자를 70% 에탄올에서 1분, 0.1% SDS/HgCl₂ 용액에서 15분, 1% NaOCl 용액에서 5분간 소독한 다음, 멸균수로 2회 씻어내었다(Table 1).

2. 캘러스 유도 및 증식

종자로부터 직접 캘러스를 유도함에 있어 가장 적합한 유도조건을 찾기 위하여, 기본배지로는 MS(Murashige와 Skoog, 1962), SH (Schenk와 Hildebrandt, 1972), N6 (Chu, 1978) 등 3종의 배지를 사용하였고, 이들 배지에 auxin으로는 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)를, cytokinin으로는 kinetin (6-furfurylaminopurine)을 각각 0~7 mg/l 농도로 첨가하여 사용하였다. 각 처리별 배지에 소독한 종자를 직접 치상하여 28℃에서 배양하면서 캘러스 유도조건을 배지별 및 호르몬 농도별로 조사하였다. 모든 배지에서 pH는 5.8, agar 농도는 0.8%로 조절하였다.

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

Table 1. Effect of basic medium on callus growth of several varieties of Italian ryegrass

Plant	Degree of callus size from seed in three kinds of media 1~10 (1; small size, 10; large size)		
	SH	MS	N6
Italian ryegrass (화산 101호 및 Florida 80)	8	10	7

The size of callus formed from seed was measured after culture for 30 days and was indicated to a numeral such as 1~10 (1; small size, 10; large size). 5 mg/l of 2,4-D was added in three kinds of media.

증식하였다.

3. 캘러스로부터 식물체 재분화

이탈리안 라이그라스 캘러스로부터 식물체를 재분화하기 위하여 1개 대조구와 10개 처리구로 나누어 실험을 진행하였다. 모든 처리구의 기본배지는 MS 배지로 하였으며, 배지에 첨가한 호르몬은 BA (6-Bentylaminopurine), NAA (α -Naphthaleneacetic acid), kinetin (6-Furfurylaminopurine) 등 3종류이다. 배지별 첨가된 양은 2~4가지로 다양하게 처리하였다 (Table 2).

Table 2. Plant regeneration ratio of Italian ryegrass in different medium condition

Treatment (mg/ℓ)	Regeneration ratio (%)	
	Green	White
Control —	0	1
T1 Kinetin* 0.1	0	2
T2 Kinetin 1.0	0	9
T3 BA** 0.1	2	7
T4 BA 1.0	12	6
T5 NAA*** 0.1	0	2
T6 NAA 1.0	0	2
T7 BA 0.1 + NAA 0.1	0	7
T8 BA 0.1 + NAA 1.0	0	12
T9 BA 1.0 + NAA 0.1	15	1
T10 BA 1.0 + NAA 1.0	13	1

kinetin* : 6-Furfurylaminopurine
 BA** : 6-Bentylaminopurine
 NAA*** : α -Naphthaleneacetic acid

III. 결과 및 고찰

1. 이탈리안 라이그라스 종자로부터 캘러스 유도

2,4-D와 kinetin의 농도를 달리하여 이탈리안 라이그라스 종자로부터 직접 캘러스를 유도하였을 때, 가장 적합한 호르몬의 농도는 사용된 기본배지의 종류에 관계없이 kinetin은 첨가하지 않고 2,4-D를 0~7 mg/ℓ 처리 중 2,4-D를 3~5 mg/ℓ로 첨가한 처리구에서 캘러스 형성이 양호하였으며, 2,4-D를 5 mg/ℓ 첨가한 처리구에서 가장 우수하였다. 또한 2,4-D를 첨가하지 않은 처리구에서는 캘러스가 전혀 형성되지 않았고, kinetin의 농도가 높아질수록 캘러스 형성 정도와 뿌리 발육이 급격히 저하되었으며, kinetin은 첨가하지 않고 2,4-D를 5 mg/ℓ 첨가하였을 때, MS 배지에 배양한 것이 SH나 N6 배지에 배양한 것보다 캘러스 형성량이 좀 더 많았으며, 품종간의 캘러스 형성량에 있어서는 차이가 없었다 (Table 1).

2. 캘러스로부터 식물체로의 재분화

재분화의 일반적 과정은 cytokinin의 처리에 의해 shoot 형성을 유도한 후, NAA, IBA (Indol-3-butyric acid) 혹은 IAA (Indol-3-acetic acid)와 같은 rooting 호르몬에 의해, 또는 호르몬을 제거한 조건에서 뿌리를 내리게 함으로써 완전한 식물체를 형성하게 하는 것이다 (Thorpe, 1981).

재분화유도를 위해 사용한 캘러스는 캘러스 형성 후 2~3회 계대배양하여 증식한 캘러스를 사용하였다. 이탈리안 라이그라스 캘러스로부터 식물체 재분화를 유도해 본 결과는 Table 2와 같다. 정상적인 식물체로 재분화된 처리구 중 재분화율이 가장 좋은 처리구는 T9 (BA 1.0 + NAA 0.1)에서 15%로 가장 높게 나타났으며, 또한 BA 농도가 높은 T4 및 T10 처리구에서도 재분화율이 높게 나타났다. 한편 kinetin이나 NAA 수준이 높은 처리구 (T2, T8)에서는 재분화가 되더라도 흰색의 식

물체로 분화되어 albino화 정도가 높게 나타났다. 이는 이탈리아 라이그라스 초종의 경우 albino 비율이 처리농도에 따라 차이가 많았는데 (1~12%), 이는 다른 초종 (오차드그라스 및 알팔파)에서는 나타나지 않는 현상이다. 그러므로 캘러스 형성 후 캘러스 증식을 위해 계대배양 할 때에 호르몬 농도를 가능한 낮추어 재분화 식물체의 albino화를 줄이는 것이 바람직하다고 하겠다. 화분과 목초인 오차드그라스 캘러스로부터 식물체를 재분화한 보고 (Kim 등, 1998)에서는 kinetin 농도가 높은 처리구에서 재분화율이 높았던 반면에, 이탈리아 라이그라스의 경우에는 BA 농도가 높은 처리구에서 재분화율이 높은 것은 초종에 따른 차이가 있을 것으로 사료된다.

Fig. 1은 캘러스 증식부터 재분화까지의 과정을 사진으로 보여주는 것으로서, Fig. 1A에서는 종자

를 유도한 캘러스를 증식배지 (MS 배지에 2,4-D를 3 mg/l 첨가)에서 20일 간격으로 계대배양하며 캘러스를 증식하는 과정이고, 1B는 형성된 캘러스를 T9 처리구의 재분화배지에서 약 25일 배양하였을 때 캘러스가 녹색을 띄면서 배발생 단계로 들어가는 재분화 초기단계이다. 그리고 1C는 동일한 배지에서 약 50일 배양했을 때 배발생 단계를 거쳐 shoot와 root가 형성되는 단계이고, 1D는 뿌리와 잎이 모두 형성되어 재분화가 완성되어 무균적으로 기내에서 뿌리를 활착시키는 단계이다.

축산기술연구소에서 알팔파(Kim 등, 1999; Won 등, 1999), 오차드그라스 (Kim 등, 1998) 등의 재분화에 관한 논문을 발표한 바 있으나, 본 연구에서는 이탈리아 라이그라스의 재분화 조건을 확립함으로써, 외래의 유용유전자를 도입하여 형질전환

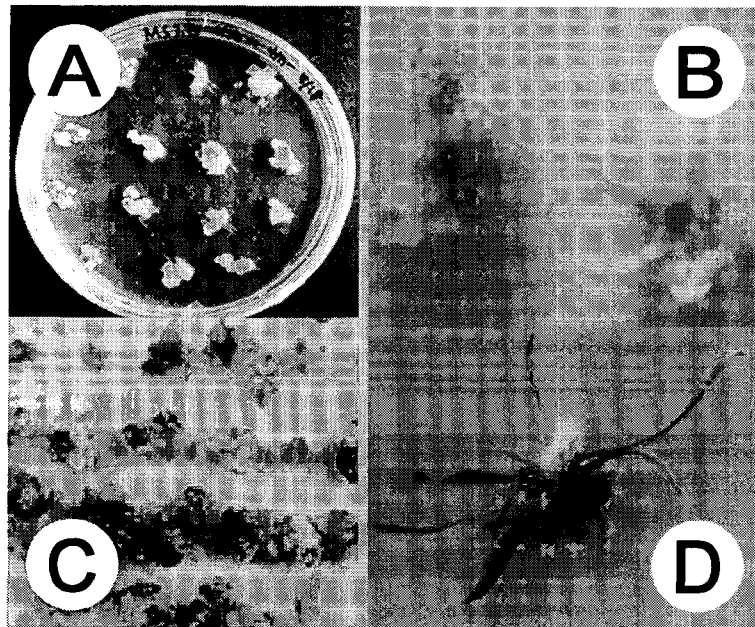


Fig. 1. Callus formation and plant regeneration of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). A, Callus formation and callus multiplication; B, Stage of embryo formation; C, Stage of shoot and root formation; D, Regenerated Italian ryegrass plant

이탈리안 라이그라스를 생산할 수 있는 기반이 마련되었다고 생각한다. 앞으로 연구에서는 확보하고 있는 몇 종류의 유용유전자를 이용하여 이탈리안 라이그라스의 형질전환을 시도할 계획이다.

IV. 적 요

이탈리안 라이그라스 (*Lolium multiflorum* Lam.) 종자로부터 직접 캘러스를 유도하고, 형성된 캘러스로부터 식물체를 재분화하는 조건을 확립하였다. 캘러스 유도시 사용한 SH (Schenk and Hildebrandt), MS (Murashige and Skoog) 및 N6 (Chu) 배지중에서 MS 배지가 캘러스 유도에 유리한 것으로 나타났으며, 캘러스 유도시에는 2,4-D 5 mg/ℓ을 첨가한 조건, 캘러스 증식시에는 2,4-D 3 mg/ℓ을 첨가한 조건이 가장 효율이 좋았다. 식물체 재분화 조건은 MS 배지에 BA 1.0 mg/ℓ와 NAA 0.1 mg/ℓ를 첨가한 재분화배지에서 계대배양하며 재분화를 완성한 처리구 9의 조건에서 재분화율 (15%)이 가장 높았다.

V. 인 용 문 헌

1. 최기준, 임용우, 신재순, 김원호. 1998. 이탈리안 라이그라스 신품종 육성 (화산 101호). 축산기술연구소 축산시험연구사업연보 pp 60-61.1.
2. Brown, D.C.W. and A. Atanassov. 1985. Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. Plant Cell Tissue Organ Culture 4:111-122.
3. Chen, T.H. and B.G. Thompson. 1987. Genotypic effects on somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of alfalfa. Plant Cell Tissue Organ Culture 8:73-78.
4. 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.
5. Creemers-Molenaar, J., P. van der Valk, J.P.M. Loeffen and Zaal MACM. 1989. Plant regeneration from suspension cultures and protoplasts of *Lolium perenne* L. Plant Sci. 63:167-176.
6. Kim, K.Y., Y.W. Rim, K.J. Choi, J.S. Shin, J.G. Kim and J. Jo. 1998. Rapid regeneration of plants on N6 medium from orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) calli. J. Korean Grassl. Sci. 18(3):267-272.
7. Kim, K.Y., Y.W. Rim, K.J. Choi, Y.S. Jang, W.H. Kim, S. Seo, B.H. Lee and J. Jo. 1999. Callus formation from alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed and plant regeneration from alfalfa calli. J. Korean Grassl. Sci. 19(1):23-30.
8. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15:71-78.
9. 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.
10. Spangenberg, G., Z.Y. Wang, X.L. Wu, J. Nagel and I. Potrykus. 1995. Transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. Plant Sci. 108:209-217.
11. Stuart, C.A. and S.G. Strikland. 1984. Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. Plant Sci. Lett. 34:165-174.

12. Thorpe, T.A. 1981. Plant tissue culture. Academic Press, Canada pp. 32-33.
13. van der Maas, H.M., E.R. de Jong, R. Saskia, A.M.H. Lambert 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 Mole. Biology 24:401-405.
14. Walker, K.A. and S.J. Sato. 1981. Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: The role of ammonium ion in somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue Organ Culture 1:109-121.
15. Won, S.H., B.H. Lee, K.Y. Kim, H. Lee, H.J. Lee and J. Jo. 1999. Multi-secondary somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl cultures of *Medicago sativa* L. J. Korean Grassl. Sci. 19(3):273-280.
16. Ye, X., J.Y. Wang, X. Wu, I. Potrykus and G. Spangenberg. 1997. Transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. Plant Cell Reports 16:379-384.