

오차드그래스의 종자유래의 캘러스로부터 식물체 재분화율에 미치는 Copper의 영향

이효신 · 이병현 · 원성혜 · 이상현 · 조진기

Effect of Copper on the Plant Regeneration from Seed Derived Callus of Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.)

Hyoshin Lee, Byung-Hyun Lee, Sunghye Won, Sanghyun Lee and Jinki Jo

Abstract

This study was conducted to investigate the effects of copper in the efficiencies of callus formation and plant regeneration of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). Seeds were cultured on MS medium containing 2 mg/ℓ 2,4-D and different concentrations (0.1-100 μmol) of copper sulfate. Plant regeneration was achieved on N6 medium containing 1 mg/ℓ NAA, 5 mg/ℓ kinetin and 0.1-100 μmol of copper sulfate. Callus formation was not affected by copper incorporation into MS medium. However, the efficiency of plant regeneration was promoted by copper and the maximum efficiency was obtained when 70 μmol copper was incorporated in the culture medium. The average number of regenerated plants from the seed-derived callus was also increased by copper.

Key words : Callus formation, Copper, Multi-shoot, Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.), Plant regeneration

I. 서 론

식물 조직배양은 식물조직의 일부분 또는 세포를 시험관 내에서 배양하여 여러 가지 목적에 따라 이용하는 기술로서, 최근 식물별 조직 및 세포 배양기술이 확립되고 분자생물학적 기법에 의한 유전자 조작기술이 도입되면서 생물공학의 응용폭이 확대되어 증식능률의 향상, 무병주 생산, 품종 개량, 유용물질의 생산 및 유전자원의 보존 등에 널리 이용되고 있다. 이러한 조직배양의 중요성에

따라 조직배양 재료의 안정적인 공급과 배양효율의 향상을 위하여 많은 연구가 수행되었으며 그 결과, 성장조절물질(George 등, 1987), 배지의 pH (Leifort 등, 1992), 습도 (Adams와 Holder, 1992) 및 gas exchange (Cassels와 Roche, 1994) 등과 같은 다양한 물리적, 화학적 요인들이 식물의 조직배양 효율에 영향을 미치는 것으로 알려졌다. 또한 최근에는 배지 내에 첨가되는 미량원소의 함량이 캘러스로부터 식물체 재분화율에 영향을 미치는 것으로 보고되었으며, 특히 copper가 벼와 보리의 식

물체 재분화 효율의 향상에 있어 중요한 촉매제로서의 역할을 하는 것으로 보고되었다(Dahleen, 1995; Sahrawat와 Chand, 1999). 그러나, 주요 작물의 조직배양 효율의 향상을 위한 다양한 시도에도 불구하고 목초류를 포함한 일부 식물의 경우는 조직배양에 관한 연구가 아직 미미한 실정이며, 낮은 배양 효율로 인해 조직배양 및 유전자 조작을 통한 품종개량에 장애로 작용하고 있다. 따라서, 본 연구에서는 우리나라에서 가장 많이 재배되고 있는 화분과 목초인 오차드그래스의 조직배양 효율의 향상을 위하여, 배지 내에 첨가되는 copper의 함량이 캘러스 형성 및 재분화 효율에 미치는 영향에 관한 실험을 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

본 실험의 재료식물로 축산기술연구소로부터 분양받은 오차드그래스 품종 중 Potomac을 이용하였다. 완숙종자를 70% ethanol에 30초간 침지한 다음, 1% NaOCl 용액에 45분간 교반하면서 표면 살균하였다. 표면 살균된 종자를 멸균수로 3회 세척하여 배지가 20 ml씩 분주된 직경 90 mm의 Petri dish에 10립씩 배양하였다.

캘러스의 유도는 2 mg/l 2,4-D, 30 g/l sucrose 및 6 g/l gelrite가 첨가된 MS 배지 (Murashige와 Skoog, 1962)를 이용하였으며, 26±2℃의 암상태에서 4주동안 유지하였다. 이때, 캘러스의 유도 및 식물체 재분화에 미치는 copper의 영향을 알아보기 위하여 배지 내에 0.1, 10, 25, 50, 70 및 100 μmol의 copper sulfate를 각각 첨가하였다. 유도된 캘러스를 copper의 함량이 동일하고 2,4-D의 농도를 1/2로 줄인 MS 배지로 옮겨, 다시 26±2℃의 암상태에서 4주동안 배양하였다.

형성된 캘러스를 1 mg/l NAA, 5 mg/l kinetin, 30 g/l sucrose, 6 g/l gelrite 및 0.1-100 μmol의

copper sulfate가 첨가된 N6 배지 (Chu, 1978)에 치상하여 2,600 Lux의 명상태에서 5주 이상 배양한 다음, 식물체 재분화율을 조사하였다.

캘러스 형성능력은 1 종자당 유도된 캘러스 생체중을 7반복 조사하였으며, 식물체 재분화율은 이식된 캘러스에 대한 식물체가 형성된 캘러스의 비율로 나타내었다.

III. 결과 및 고찰

오차드그래스의 완숙종자배양에서 배지 내에 첨가되는 copper의 농도가 캘러스 형성과 식물체 재분화율에 미치는 영향을 조사하였다. 살균된 종자를 0.1-100 μmol의 copper가 각각 첨가된 캘러스 유도배지에 치상하여 배양한 결과, 5일 후부터 캘러스의 유도가 관찰되었으며, 배양 20일 경에 황갈색의 조직이 치밀하지 못한 캘러스와 담갈색의 점액성 캘러스 및 백색의 조직이 치밀한 캘러스로 구분되어 증식하였다. 그러나, 배양 4주 후에 캘러스 형성능력을 1 종자당 유도된 캘러스의 생체중으로 조사한 결과, copper의 첨가가 캘러스 형성에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (그림 1). 또한 배양 8주 후의 캘러스 생체중도 처리농도에 따른 유의적인 변화를 나타내지 않았다 (결과 미제시). 그러나, 50-70 μmol의 copper가 첨가된 배지에서 생성된 캘러스에서는 식물체 재분화에 적합한 백색의 조직이 치밀한 캘러스의 비율이 높게 나타났다.

유도된 캘러스를 NAA (1 mg/l)와 kinetin (5 mg/l)이 첨가된 N6 배지에 치상하여 식물체의 재분화를 유도한 결과, 배양 4-5일 후부터 식물체의 재분화가 관찰되기 시작하였다. 배양 5주 후에 식물체 재분화율을 이식된 캘러스에 대한 식물체가 형성된 캘러스의 비율로 조사한 결과, 캘러스 유도배지 내에 첨가된 copper의 농도가 식물체 재분화율에 매우 큰 영향을 미치는 것으로 조사되었

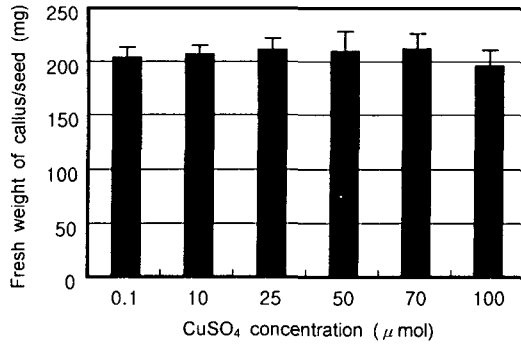


Fig. 1. Effect of copper on callus formation of orchardgrass. The callus was weighed after 4 weeks of seed culture. Each value represents the mean measured in at least seven independent experiments. Bars indicate standard deviation of mean activity.

다. 즉, 대조구로 이용한, MS 기본배지 수준인 0.1 μmol의 copper가 첨가된 배지에서 형성된 캘러스에서는 17.5%의 재분화율을 나타낸 반면에, 50 μmol의 copper가 첨가된 배지에서 형성된 캘러스에서는 32%의 재분화율을 나타내었으며, 70 μmol의 copper가 첨가된 배지에서 형성된 캘러스에서는 가장 높은 43%의 재분화율을 나타내어 대조구에 비해 각각 1.8배 및 2.5배 이상의 증가를 나타내었다 (표 1). 이러한 결과는 배지 내에 첨가되는 copper가 캘러스 형성능력에는 영향을 미치지 않지만 (그림 1), 식물체 재분화에 적합한 백색의 조직이 치밀한 캘러스의 비율을 높임으로써 식물체 재분화율을 증가시킨 결과로 생각된다. 그러나 100 μmol 이상의 농도에서 식물체 재분화율은 다시 감소하는 경향을 나타내었다.

또한, 캘러스 유도배지 내에 copper의 첨가는 식물체 재분화율을 증가시킬 뿐만 아니라 단일 캘러스로부터 재분화되는 식물체의 수도 증가시키는 것으로 나타났다. 일반적으로 오차드그래스의 캘

Table 1. Effect of copper on plant regeneration of orchardgrass

CuSO ₄ concentration (μmol)	No. of calli transferred	No. of calli with	
		Root (%)	Shoot (%)
0.1	80	31 (38.8)	14 (17.5)
10	80	34 (42.5)	19 (23.8)
25	100	44 (44.0)	27 (27.0)
50	100	53 (53.0)	32 (32.0)
70	100	62 (62.0)	43 (43.0)
100	100	51 (51.0)	24 (24.0)

* Plant regeneration was scored at 5 weeks after plating.

러스를 식물체 재분화 배지로 옮겨 배양하였을 때, 단일 캘러스로부터 1~2개의 식물체가 재분화되는 것으로 나타났다(이 등, 1998; 2000). 그러나 copper가 첨가된 배지에서 생성된 캘러스를 재분화배지로 옮겨 조사한 결과, 그림 2에 나타난 바와 같이 단일 캘러스로부터 multi-shoots의 유도를 통하여 대조구에 비해 훨씬 많은 재분화 식물체를 얻을 수 있는 것으로 나타났다.

즉, 대조구인 MS 기본배지 수준인 0.1 μmol의 copper가 첨가된 배지에서 형성된 캘러스에서는 캘러스당 1.7개의 식물체가 재분화되는 것으로 나타났다지만, 50 μmol의 copper가 첨가된 배지에서 형성된 캘러스에서는 3.3개의 식물체가 재분화되는 것으로 나타났다. 또한 식물체 재분화율이 가장 높게 나타난 70 μmol의 copper가 첨가된 배지에서 형성된 캘러스에서는 4.4개의 식물체가 재분화되는 것으로 나타나 대조구에 비해 2.6배 이상의 증가를 나타내었다(그림 3). Copper의 첨가에 의한 식물체 재분화율의 증가와 더불어 이러한 multi-shoots의 유도는 유용유전자의 도입을 위한 화분과 목초의 형질전환에 있어, 낮은 식물체 재분화율이 문제점으로 제기되어 온 사실을 고려하면 매우 중요한 결과로 생각된다.



Fig. 2. Multiple shoots proliferation from seed-derived callus of orchardgrass on N6 medium containing 1 mg/ℓ NAA and 5 mg/ℓ kinetin.

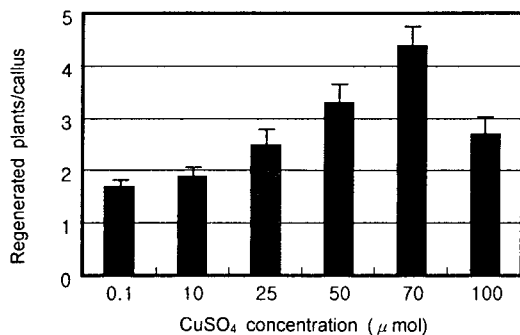


Fig. 3. Mean number of regenerated plants per seed-derived callus of orchardgrass. Plant regeneration was scored at 5 weeks after plating. Each value represents the mean measured in at least seven independent experiments. Bars indicate standard deviation of mean activity.

Copper가 식물체 재분화율을 증가시키는 기작은 아직 알려져 있지 않지만, 식물체 내에서 copper는 단백질 및 탄수화물 대사와 같은 대사활성에 중요한 역할을 수행하는 필수 미량원소이다(Murashige와 Skoog, 1962). 또한 copper는 plastocyanin의 구성물질로서 광합성의 전자전달반응에 직접 관여하는 것으로 알려져 있다(Droppa와 Horvath, 1990). 따라서, 캘러스로부터 식물체의 재분화가 캘러스 표면의 녹색의 조직으로부터 일어난다는 점을 고려하면 (Sahrawat와 Chand, 1999), copper는 광합성 과정에 영향을 미침으로써 식물체 재분화에 영향을 미치는 것으로 생각된다. Copper 이외에도 silver nitrate (AgNO₃)와 silver thiosulfate (Ag₂S₂O₃) 첨가가 밀과 보리에서 embryo의 생성과 식물체 재분화를 촉진하는 것으로 보고되었으며 (Lashems, 1992; Evans와 Batty, 1994), cobalt와 nickel의 첨가가 당근의 체세포배 발생을 촉진하는 것으로 보고되었다(Roustan 등, 1989). 식물세포 내의 이러한 미량원소의 농도는 식물 종과 유전자형 및 환경조건 등에 따라 다양하며, 동일 식물 내에서도 기관 및 조직에 따라 다른 것으로 알려져 있다(Welch, 1995). 따라서, 식물 조직배양 효율의 향상에 있어 배지 조성 및 호르몬 조건 등의 규명과 아울러 배지 내에 첨가되는 미량원소의 함량 또한 중요한 요인으로 작용할 것으로 생각된다.

IV. 적 요

오차드그래스의 완숙 종자배양에서 배지 내에 첨가되는 copper의 농도가 캘러스 형성과 식물체 재분화율에 미치는 영향을 조사하였다. 캘러스의 유도는 2 mg/ℓ의 2,4-D와 0.1-100 μmol의 copper sulfate를 첨가한 MS 배지를 이용하였으며, 식물체 재분화는 1 mg/ℓ의 NAA, 5 mg/ℓ의 kinetin 및

0.1-100 μmol 의 copper sulfate가 첨가된 N6 배지를 이용하였다. 그 결과, copper의 첨가는 캘러스 형성능력에는 유의성있는 차이를 나타내지 않았으나, copper가 첨가된 배지에서 생성된 캘러스에서 백색이면서 조직이 치밀한 즉, 식물체 재분화에 적합한 캘러스의 비율이 높게 나타났다. 식물체 재분화율은 copper가 첨가된 배지에서 생성된 캘러스가 첨가되지 않은 배지에서 생성된 캘러스보다 높게 나타났으며, 특히 70 μmol 의 copper가 첨가된 배지에서 생성된 캘러스가 대조구에 비해 2.5배 이상 증가된 가장 높은 재분화 능력을 나타내었다. 또한, 캘러스당 재분화된 식물체의 수는 70 μmol 의 copper가 첨가된 배지에서 생성된 캘러스에서 대조구에 비해 2.6배 이상 증가된 것으로 나타났다.

Acknowledgements

이 논문은 2000년도 경북대학교 Post-Doc. 연구 지원에 의하여 연구되었음.

V. 인 용 문 헌

1. Adams, P. and R. Holder. 1992. Effect of humidity, Ca and salinity on the accumulation of nutrients in the leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum*). J. Hort. Sci. 66:545-550.
2. Cassels, A.C. and T.D. Roche. 1994. The influence of the gas permeability of the vessels lid and growthroom light intensity on the characteristics of *Dianthus microplants in vitro* and *ex vitro*. In: Lumsden, P.J., J.R. Nicholas and W.J. Davies (eds.): Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
3. Chu, C. 1978. The N₆ medium and its applications to anther culture of cereal crops. Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture, Science Press, Pecking. pp. 43-50.
4. Dahleen, L.S. 1995. Improved plant regeneration from barely callus cultures by increased copper levels. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 43:267-269.
5. Droppa, M. and G. Horvath. 1990. The role of copper in photosynthesis. Critl. Rev. Plant Sci. 9:111-123.
6. Evans, J.M. and N.P. Batty. 1994. Ethylene precursors and antagonists increase embryogenesis of *Hordeum vulgare* L. anther culture. Plant Cell Rep. 13:676-678.
7. George, E.F., D.J.M. Puttock and H.J. George. 1987. Plant culture media, Vol. 1, Formulation and uses. Exegetics Ltd., Edington, UK.
8. Lasherms, P. 1992. Improved anther culture method for obtaining regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.). J. Genet. Breed. 46:99-102.
9. Leifort, C., S. Pryce, P.J. Lumsden and W.M. Waits. 1992. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plants growing *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 30:171-179.
10. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
11. Roustan, J.P., A. Latche and J. Fallot. 1989. Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene biosynthesis:

- cobalt and nickel. *Plant Cell Rep.* 8:182-185.
12. Sahrawat, A.K. and S. Chand. 1999. Stimulatory effect of copper on plant regeneration in indica rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 154: 517-522.
13. Welch, R.M. 1995. Micronutrient nutrition of plants. *Critl. Rev. Plant Sci.* 14:49-82.
14. 이효신, 권용삼, 이병현, 이상현, 조진기. 1998. Orchardgrass의 종자유래 켈러스로부터 식물체 재분화. *한초지.* 18(4):285-290.
15. 이효신, 권용삼, 이병현, 원성혜, 김기용, 조진기. 2000. 오차드그래스의 현탁배양으로부터 부정배 형성과 식물체 재분화. *한초지.* 20(1): 7-12.