

## 이탈리안 라이그라스 × 툴페스큐 속간 교잡종의 약배양 기법을 이용한 식물체 생산

김기용 · 강경민 · 최기준 · 장요순 · 임영철 · 김맹중 · 김종근 · 김원호 · 박근제

### Production of New Regenerated Plants by Anther Culture of the Hybrids of Italian ryegrass × Tall fescue

K. Y. Kim, K. M. Kang, G. J. Choi, Y. S. Jang, Y. C. Lim, M. J. Kim, J. G. Kim, W. H. Kim and G. J. Park

#### ABSTRACT

Several regenerated plants were obtained from anther culture of the hybrid lines of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) × Tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). When the anthers of the hybrid plants were incubated for 20 days on callus induction medium, MS medium containing 30 g/l of sucrose, 2 mg/l of NAA and 1 mg/l of kinetin, their calli were induced. The mean ratio of callus induction was 11.6 percent, and the mean of callus weight was 9.1 mg/callus/anther. When the calli of the hybrid plants were incubated for 50 days on plant regeneration medium, MS medium containing 30 g/l of sucrose, 1 mg/l of NAA and 2 mg/l of kinetin, the hybrid plants were regenerated. The mean ratio of plant regeneration was 27.1 percent and line Hyb-1 showed highest regenerability with the frequency of 30.2 percent.

(Key words : Italian ryegrass, Tall fescue, Anther culture, Callus induction, Plant regeneration)

#### I. 서 론

이탈리안 라이그라스 (*Lolium multiflorum* Lam.)는 답리작으로 이용가치가 높은 일년생 또는 월년생 목초로서, 수량 및 사료가치가 높고 여러 번 베어 먹일 수 있는 장점이 있으나, 더위에 약해 여름철 재배가 어렵고 추위에 견디는 힘이 약해 우리 나라에서 재배지역은 대전이남으로 국한되는 단점이 있다. Choi 등 (2000)은 다교잡(polycross)법으로 내한성 이탈리안 라이그라스를 개발하여, 1월 평균기온이 -9℃ 이상이고 해발 400 m 이하인 지역에서

재배가 가능할 뿐만 아니라, 내도복성, 품엽성 및 건물생산성이 우수한 “화산 101호” 품종을 개발하여 국내 축산농가에 보급하고 있다. “화산 101호” 품종은 다른 이탈리안 라이그라스 품종에 비해서 내한성이 많이 강해졌지만, 품종 고유의 특성으로 인해 심한 추위에서는 다른 화본과 초종에 비해 내한성이 떨어질 수밖에 없다. 한편 툴페스큐 (*Festuca arundinacea* Schreb.)는 생육적온이 15~21℃로서 서늘한 곳에서 잘 자라고, 더운 여름철이나 추운 겨울철에도 잘 견디며 그늘에도 강한 편이다. 하지만 다른 화본과 목초에 비하여 잎과 줄기가 거칠

어 사료가치 및 가축의 기호성이 떨어지므로 많이 재배되지 않는 단점이 있다. 이러한 두 초종의 단점들을 보완하면서 장점은 그대로 유지하기 위해, 여러 해 전부터 교잡육종을 연구해 왔으나, 속간 교잡종은 임성이 없어 종자생산이 어려운 관계로 이탈리아 라이그라스 × 툴페스큐 속간 교잡종 계통들이 품종으로 만들어지지 못하고 있는 실정이다.

속간 교잡종의 임성을 회복하기 위해 콜히친 처리 등의 방법으로 연구를 진행하여 보았지만, 아직까지 종자생산이 가능할 정도의 임성을 갖는 계통은 만들지 못하고 있다. 그래서 본 연구에서는 속간 교잡종의 임성을 회복시키는 하나의 방편으로 약(藥) 배양을 실시함으로써, 불안정한 상태의 유전자형을 고정하고 임성을 높여주어 종자생산이 가능한 계통을 육성코자 하였다.

이탈리안 라이그라스의 재분화와 관련된 연구에는 Rim 등 (2000), Kim 등 (2001), Lee 등 (2002) 등의 연구논문들이 있지만, 이탈리아 라이그라스 × 툴페스큐 속간 교잡종에 대해서는 재분화 연구나 약(藥) 배양과 관련된 연구가 미미한 실정이다. 툴페스큐의 조직배양에 관한 연구는 성숙배 (Lowe 및 Conger, 1979), 미숙배 (Bai 및 Qu, 2001), 종자 (Lee 등, 2001) 등을 이용한 재분화 연구들이 보고된 바 있다. 하지만 식물체의 약(藥) 배양을 통해 식물체를 재분화 하는 것은 그 식물체의 세포나 조직으로부터 식물체를 재분화 하는 것과 많은 차이가 있을 것이므로, 우리는 같은 화본과 식물인 벼의 약(藥) 배양 관련 논문들을 검토하여 이탈리아 라이그라스 × 툴페스큐 속간 교잡종의 약(藥) 배양을 시도해 보기로 하였다. 벼 약(藥) 배양 관련 논문들로는 Kwon 등 (2001), Qian 등 (2001), Guzman 및 Zapata Arias (2000), Afza 등 (2000), Khush (1997), Xu 등 (1997) 등이 있다.

본 연구의 성과로서 약(藥) 배양을 통해 이탈리아 라이그라스 × 툴페스큐 속간 교잡종의

임성이 회복된다면, 환경적응성이 강하고 수량성이 높으면서도 툴페스큐의 거친 특성을 완화시켜 사료가치를 높일 수 있는 새로운 우수 품종의 육성이 가능할 것으로 사료된다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 식물재료

식물재료로는 축산기술연구소에서 육성한 이탈리아 라이그라스 (*Lolium multiflorum* Lam.)와 툴페스큐 (*Festuca arundinacea* Schreb.)의 속간 교잡종 중 툴페스큐에 비해 잎이 부드러우면서도 이탈리아 라이그라스에 비해 더위나 추위에 강한 3개의 계통 (Hyb-1, Hyb-2, Hyb-3)을 공시하였다. 이들 계통을 2월부터 온실에서 재배하여 4월 중순 출수기부터 개화 전까지 속간 교잡종 3계통의 화서(花序)를 채취한 다음, 멸균수를 채운 용기에 배양재료를 깨끗이 비닐로 외부를 밀봉하고, 8℃로 유지되는 chamber에서 암조건으로 10일 이상 전처리를 실시하였다. 전처리를 마친 꽃차례를 꺼내어 약(藥)을 싸고 있는 영(穎)을 떼내어 70% EtOH에서 5분간, 1~5% NaOCl 용액에서 10~20분간 살균한 다음, 멸균수로 2~3회 행구고, 멸균된 filter paper로 옮겨 물기를 제거 후, 준비된 캘러스 유도배지에 치상하였다.

### 2. 사용배지

이탈리안 라이그라스와 툴페스큐의 속간 교잡종 3계통의 약(藥)으로부터 캘러스를 유도하기 위한 배지로는 MS 기본배지 (Murashige 및 Skoog, 1962) 1 ℓ 에 sucrose 30 g, NAA 2 mg, kinetin 1 mg을 첨가하여 사용하였으며, 식물체의 재분화를 위한 배지로는 MS 기본배지에 sucrose 30 g, NAA 1 mg, kinetin 2 mg을 첨가하여 사용하였다(Table 1). 모든 배지는 pH 5.8, gelrite 농도 0.6%로 조절하였다.

Table 1. The medium conditions for callus induction and plant regeneration from anther of the Hybrids of Italian ryegrass×Tall fescue

Callus induction				Plant regeneration			
Basal medium	Addition (per Liter)			Basal medium	Addition (per Liter)		
	Sucrose	NAA	Kinetin		Sucrose	NAA	Kinetin
MS	30 g	2 mg	1 mg	MS	30 g	1 mg	2 mg

### 3. 캘러스 유도 및 식물체 재분화

이탈리안 라이그라스와 툴페스큐의 속간 교잡종 3계통의 약(藥) 유래 캘러스를 유도 시 교잡종 계통의 약(藥)을 싸고 있는 영(穎)을 소독하여 캘러스 유도배지에 치상한 다음, 25±2℃로 유지되는 생장실에서 암상태로 3~6주간 배양하였다. 캘러스로부터 식물체의 재분화는 25±2℃로 유지되는 생장실에서 1일에 12~16 시간의 명상태 (2000~2500 Lux 유지)로 2개월 이상 배양하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

농촌진흥청 축산기술연구소에서 육성한 이탈리안 라이그라스 (*Lolium multiflorum* Lam.)와 툴페스큐 (*Festuca arundinacea* Schreb.)의 속간 교잡종 중 툴페스큐에 비해 잎이 부드럽고 이탈리안 라이그라스에 비해 더위나 추위에 강하지만 임성이 없거나 약해서 종자생산이 불가능한 3개의 계통 (Hyb-1, Hyb-2, Hyb-3)을 공시하여, 약(藥) 배양을 통해 이들 계통의 임성회복을 가능케 함으로써 이탈리안 라이그라스와 툴페스큐의 장점만을 포함하는 새로운 품종을 개발할 목적으로 본 실험이 진행되었다.

이탈리안 라이그라스와 툴페스큐의 속간 교잡종 3계통의 화서(花序)를 채취하여 8℃ chamber에서 전처리 및 살균처리 후, 화서(花序)에서 약(藥)을 분리하여 여러 차례 캘러스의

유도를 시도하였으나, 벼, 보리, 호밀 등의 약(藥) 크기에 비해 이탈리안 라이그라스의 약(藥) 크기가 너무 작은 이유로 캘러스 유도에 실패하였다. 이들 계통에 대해 출수 초기의 약(藥)을 분리해 보면, 쉽게 분리가 되지 않을 뿐만 아니라, 약(藥)의 길이가 1~2 mm 정도로 짧고 연약한 상태이기 때문에 쉽게 상처를 받아 약(藥)을 직접 배양하기에는 부적합하였다.

속간 교잡종 식물체의 약(藥)을 싸고 있는 영(穎)을 떼내어 배양하는 방법으로 실험을 진행한 결과, 오염율은 다소 높았지만 캘러스를 유도할 수 있었다. 이탈리안 라이그라스의 캘러스 유도와 관련된 연구들 (Rim 등, 2000; Lee 등, 2002)에서는 캘러스를 유도할 때 옥신으로 2,4-D를 사용하였으며, Park 및 Kim (1989)이 이탈리안 라이그라스와 툴페스큐 속간 교잡종의 재분화실험에서 역시 2,4-D를 사용하였지만, 본 연구에서는 약(藥) 이외의 조직으로부터 캘러스가 유도되는 것을 방지하기 위해, 2,4-D를 사용하지 않고 2,4-D 보다 역가가 낮은 NAA를 사용하였다.

MS 기본배지 (Murashige 및 Skoog, 1962)에 sucrose 30 g/l, NAA 2 mg/l, kinetin 1 mg/l을 첨가한 캘러스 유도배지에 속간 교잡종 3계통의 영(穎)을 치상하여 배양하였을 때, 배양 20일이 지나면서 캘러스가 유도되기 시작하여 40일 정도까지 캘러스 유도가 관찰되었다. 종자로부터 캘러스를 유도하는 경우, 정상적인 종자를 사용하면 90% 이상 캘러스가 유도되지

Table 2. The ratio of callus induction and plant regeneration from anthers of the three Hybrids of Italian ryegrass × Tall fescue

Line	No. of anthers transferred	% of callus induction	Callus weight of per anther (mg)	No. of calli transferred	% of plant regeneration
Hyb-1	1000	10.9	9.0	100	30.2
Hyb-2	1000	11.7	8.8	100	27.5
Hyb-3	1000	12.2	9.6	100	23.6
Mean	1000	11.6	9.1	100	27.1

만, 속간 교잡종 3계통의 영(穎)으로부터의 캘러스 유도율은 11.6%로서 낮았다 (Table 2). 또한 캘러스의 크기는 이탈리아 라이그라스 종자 유래의 캘러스의 평균 크기인 16~17mg/callus/seed (Lee 등, 2002)에 비해 8~10mg/callus/anther로서 다소 작았다 (Table 2). 계통간

캘러스 유도율이나 캘러스 크기에 있어 큰 차이는 나타나지 않았다.

종자로부터 캘러스를 유도한 것에 비해 약(藥) 배양에서 캘러스 유도율이 낮은 것은 약(藥) 배양 자체에서 낮아지는 원인도 있지만, 2,4-D에 비해 NAA의 역가가 낮고 약(藥)이 영

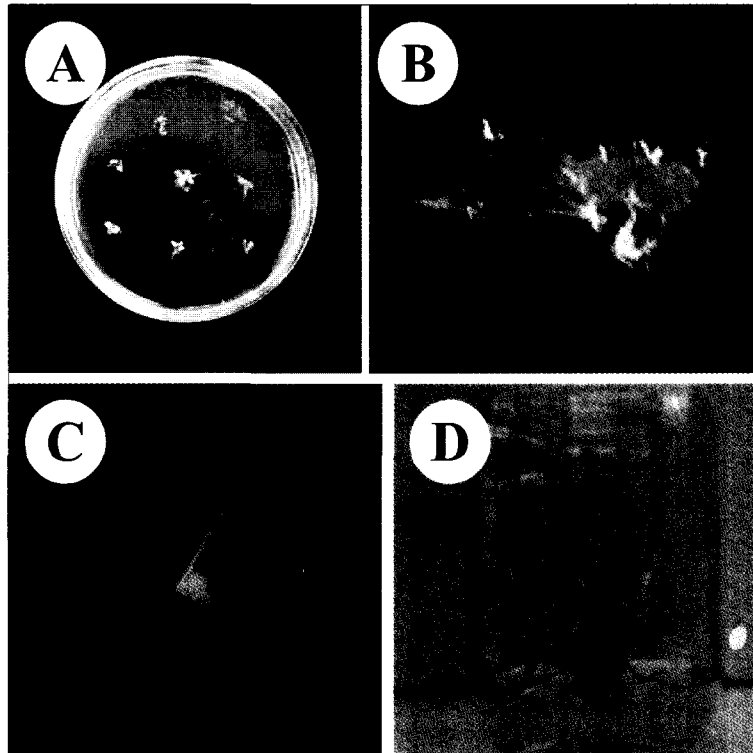


Fig. 1. Callus induction and plant regeneration from anther of Line Hyb-1 Hybrid of Italian ryegrass × Tall fescue.

(穎)에 싸여 있기 때문에 배지에 접촉하는 정도가 약해서 캘러스 유도율이 낮은 것으로 판단된다.

속간 교잡종 3계통의 약(藥) 유래의 캘러스를 증식시켜 MS 기본배지에 sucrose 30 g/l, NAA 1 mg/l, kinetin 2 mg/l을 첨가한 재분화 배지에 치상하여 배양한 결과, 배양 30일이 되면서 일부에서 shoot가 나타났고, 배양 50일에는 완전히 재분화된 식물체를 얻을 수 있었다. 재분화 배지에 치상 후 90일까지 배양하며 식물체 재분화를 조사한 결과, 캘러스로부터 식물체로 재분화되는 비율은 27.1%로 나타났다 (Table 2). 3계통 중 Hyb-1 계통의 식물체 재분화율이 30.2%로서 가장 높았으며, Hyb-2 계통과 Hyb-3 계통의 식물체 재분화율은 각각 27.5%와 23.6% 였다.

Fig. 1은 이탈리아인 라이그라스와 툴페스큐의 속간 교잡종 3계통 중 Hyb-1 계통의 약(藥) 유래의 캘러스로부터 식물체를 재분화시켜 기내에서 키우고 있는 사진으로서, Fig. 1A는 속간 교잡종 계통 Hyb-1의 약(藥)을 캘러스 유도배지에 치상하여 30일간 배양했을 때 캘러스가 유도된 사진, Fig. 1B는 증식중인 캘러스를 확대한 사진, Fig. 1C는 캘러스를 재분화 배지에 옮겨 40일간 배양했을 때 식물체의 잎이 나오고 있는 사진, Fig. 1D는 완전히 재분화된 식물체를 배양중인 사진이다.

Park 등 (1991)은 이탈리아인 라이그라스와 툴페스큐의 속간 교잡종은 내한성, 내하고성, 내도복성 등이 좋았으며, 봄생육은 이탈리아인 라이그라스, 여름생육은 툴페스큐 정도 되는 것으로 보고하였다. 본 실험이 성공적으로 수행되어 약(藥) 배양 기술을 이용해 우수한 특성을 가진 속간 교잡종들의 임성을 회복할 수 있기를 기대하는 바이다.

#### IV. 요 약

이탈리안 라이그라스 (*Lolium multiflorum*

Lam.)와 툴페스큐 (*Festuca arundinacea* Schreb.)의 속간 교잡종 3계통에 대한 약(藥) 배양을 실시하여 약(藥) 유래의 식물체를 생산하였다. MS 기본배지에 sucrose 30 g/l, NAA 2 mg/l, kinetin 1 mg/l을 첨가한 캘러스 유도배지에서 배양 20일만에 약(藥) 유래의 캘러스를 유도하였다. 캘러스 유도율은 평균 11.6%였으며, 캘러스의 크기는 평균 9.1 mg/callus/anther 였다. MS 기본배지에 sucrose 30 g/l, NAA 1 mg/l, kinetin 2 mg/l을 첨가한 재분화 배지에 캘러스를 치상하여 배양 50일만에 완전히 재분화된 식물체를 얻었으며, 캘러스로부터 식물체로 재분화되는 비율은 평균 27.1%였고, Hyb-1 계통의 식물체 재분화율이 30.2%로서 가장 높았다.

#### V. 인 용 문 헌

1. Afza, R., M. Shen, F.J. Zapata-Arias FJ, J. Xie, H.K. Fundi, K. Lee, E. Bobadilla-Mucino and A. Kodym. 2000. Effect of spikelet position on rice anther culture efficiency. *Plant Sci.* 153(2): 155-159.
2. Bai, Y. and R. Qu. 2001. Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue. *Plant Breeding.* 120:239-242.
3. Choi, G.J., Y.W. Rim, K.Y. Kim, S.H. Choi, B.R. Sung, W.H. Kim, D.E. Shin and Y.C. Lim. 2000. A cold-tolerant and high-yielding italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) new variety "Hwasan 101". *J. Korean Grassl. Sci.* 20(1):1-6.
4. Guzman, M. and F.J. Zapata-Arias. 2000. Increasing anther culture efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) using anthers from ratooned plants. *Plant Sci.* 151(2):107-114.
5. Khush, G.S. 1997. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Mol Biol.* 35(1-2): 25-34.
6. Kim, K.Y., G.J. Choi, B.R. Sung, Y.W. Rim, G.J. Park, Y.S. Jang and J. Jo. 2001. Root initiation in cut Italian ryegrass stems by treatment of IBA.

- J. Korean Grassl. Sci. 21(1):31-34.
7. Kwon, Y.S., H.G. Lee, G.H. Park and J.K. Sohn. 2001. High frequency production of doubled-haploid plants by colchicine application in anther cultures of rice. Korean J. Plant Tissue Culture 28(1):47-52.
  8. Lee, H., S. Lee, Y. Kwon, B. Lee and J. Jo. 2001. Factors Affecting Plant Regeneration from Seed-Derived Calli in Tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). J. Korean Grassl. Sci. 21(2):45-48.
  9. Lee, H.S., K.M. Kang and J. Jo. 2002. Factors affecting plant regeneration from seed-derived calli in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.). Korean J. Plant Tissue Culture 28(6):323-328.
  10. Lowe, K.W. and B.V. Conger. 1979. Root and shoot formation from callus cultures of tall fescue. Crop Sci. 19:397-400.
  11. Park, B.H., J.W. Ryoo and Y.H. Lee. 1991. Studies on the interspecific and intergeneric hybridization in herbage grasses. II. Morphological and physiological characteristics of Italian ryegrass × Tall fescue hybrid. J. Korean Grassl. Sci. 11(1):1-5.
  12. Park, B.H. and M.H. Kim. 1989. Studies on the interspecific and intergeneric hybridization in herbage grasses. I. Effects of hybrid embryo age on callus formation and plant regeneration. J. Korean Grassl. Sci. 9(2):62-67.
  13. Qian, Q., P. He, S. Teng, D.L. Zeng and L.H. Zhu. 2001. QTLs analysis of tiller angle in rice (*Oryza sativa* L.). Yi Chuan Xue Bao. (Chinese) 28(1):29-32.
  14. Rim, Y.W., K.Y. Kim, K.J. Choi, B.R. Sung and J.S. Shin. 2000. Callus induction from seeds of Italian ryegrass and plant regeneration. J. Korean Grassl. Sci. 20(1):25-30.
  15. Xu, Y., L. Zhu, J. Xiao, N. Huang and S.R. McCouch. 1997. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F2, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). Mol. Gen. Genet. 253(5):535-545.