

## 오차드그래스 성숙종자로부터 캘러스 유도 및 고효율 식물체 재분화

이상훈<sup>1</sup>, 이동기<sup>1</sup>, 김진수<sup>1</sup>, 이병현<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>경상대학교 응용생명과학부, <sup>2</sup>농업생명과학연구원

### High-frequency Plant Regeneration from Mature Seed-derived Callus Cultures of Orchardgrass

Sang-Hoon Lee<sup>1</sup>, Dong-Gi Lee<sup>1</sup>, Jin-Soo Kim<sup>1</sup>, Byung-Hyun Lee<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Applied Life Science, <sup>2</sup>Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

**ABSTRACT** In an effort to optimize tissue culture conditions for genetic transformation of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.), an efficient and high-frequency plant regeneration system from seed-derived calli was established. Embryogenic calli induced on MS medium containing 3 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L BA had significantly improved regeneration ability. Plant regeneration rate was 62% when embryogenic calli were cultured on N6 medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D and 3 mg/L BA. Among three kinds of medium, MS and N6 medium were optimal for embryogenic callus induction and plant regeneration, respectively. No difference in callus induction frequency was observed among four cultivars of orchardgrass, however, "Roughrider" cultivar showed higher regenerability with the frequency of 61%. Addition of maltose to the regeneration medium as a carbon source dramatically increased regeneration frequency up to 69%. A short tissue culture period and high-frequency regeneration system would be beneficial for molecular breeding of orchardgrass through genetic transformation.

**Key words:** Callus, *Dactylis glomerata*, forage, orchardgrass, regeneration

#### 서 론

오차드그래스 (*Dactylis glomerata* L.)는 전 세계적으로 널리 재배되고 있는 다년생의 서늘한 기후조건에서 잘 자라는 북방형 화분과 목초로서 우리나라에서도 가장 많이 재배되고 있는 목초종 중의 하나이다. 이 초종은 주로 방목초지용 목초로서 많이 재배되고 있으나, 건초 또는 사일리지 조제용으로도 재배되고 있어서 그 이용도가 가장 넓은 초종 중의 하나이며 (Miller 1984), 우리나라 전체 도입 목초종자의 90% 이상을 차지하고 있다. 그러나 평야지대에서 재배할 경우 여름철 고온다습한 기후조건에 약하여 생육이 극도로 저하되는 하고 현상 (summer depression)을 나타내어 적절한 재배관리를 해주지 못하면 고사되기 쉽고, 내건성과 월동성이 다소 약하며

출수기 이후에는 사료가치가 급격히 저하되는 단점이 있다 (Van Santen and Sleper 1996). 이러한 단점을 보완하기 위해 지금까지 자연계에 존재하는 우수형질을 가진 품종을 선발하고 이들 간의 교잡에 의해 유용한 유전형질을 고정시키는 전통적인 육종법에 의한 연구가 활발히 진행되어 왔다 (Van Wijk et al 1993). 그러나 이러한 전통육종법에 의한 신품종 육종에는 많은 시간과 노력 및 공간이 요구될 뿐만 아니라, 도입 가능한 유전형질의 제한 등 여러가지 제약이 따르는 단점이 있다. 최근에는 분자육종법에 의한 사료작물의 신품종 개발을 위한 많은 연구가 시도되고 있다 (McKersie 1997; Spangenberg et al. 1998). 사료작물 및 목초류에 도입하고자 하는 유전자는 품질관련 유전자, 내병성 관련 유전자, 환경스트레스 내성 유전자, 사료작물의 생장시기 조절관련 유전자 등의 도입이 주로 시도되어 왔다 (Forster and Spangenberg 1999). 이러한 유용유전자의 형질전환을 통한 신품종 육종을 위해서는 우선 효율적인 조직배양체계와 형질전환 체계가 확

\*Corresponding author Tel 055-751-5418 Fax 055-751-5410

E-mail hyun@nongae.gsnu.ac.kr

립되어야 한다.

지금까지 오차드그래스의 형질전환을 위해 사용된 방법에는 protoplast를 이용한 유전자의 직접 도입법에 의한 형질전환 (Horn et al. 1988), microprojectile bombardment에 의한 형질전환 (Denchev et al. 1997; Cho et al. 2001) 등이 보고된 바 있다. 그러나 아직 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 대해서는 전 세계적으로도 보고된 바가 없다. 따라서 유용유전자를 가장 경제적이면서 효율적이고 안정적인 유전자 도입기술인 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환기법을 통해 오차드그래스에 도입하기 위해서는 먼저 고효율 재분화시스템이 필수적이라 할 수 있다. 이를 위해서는 실험재료를 쉽게 구할 수 있어야 하며 단기간 내에 높은 재분화율을 나타내는 조직배양 기술체계가 필수적이다. 지금까지 보고된 오차드그래스의 bombardment 법에 의한 형질전환체 획득에는 최소 10개월 이상의 조직배양기간이 소요된 것으로 보고되었다 (Horn et al. 1988; Cho et al. 2001), 이는 장기간의 기내배양에 따른 체세포변이의 발생 증가로 인해 정상적인 재분화식물체의 획득 빈도가 낮아지는 결과를 초래한다.

따라서 본 연구에서는 우리나라에서 재배되고 있는 대표적인 화본과 목초인 오차드그래스에 *Agrobacterium*에 의한 유용유전자 형질전환을 통하여 신품종 개발을 목적으로 우선 성숙종자로부터 캘러스를 유도하여 단기간 내에 완전한 식물체로 재분화시킬 수 있는 효율적인 재분화시스템을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 종자살균

식물재료로는 오차드그래스 (*Dactylis glomerata* L.)의 품종 중 Frontier, Potomac, Roughrider 및 Frode의 4가지 품종을 사용하였다. 종피를 제거한 성숙종자를 70% 에탄올에서 30초간 표면살균하고 멸균수로 3회 세정 후, 5% sodium hypochlorite 용액을 첨가하여 30분간 교반하면서 표면살균 하였다. 살균된 종자는 멸균수로 3회 이상 세정한 다음 멸균된 filter paper로 옮겨 불기를 제거한 후, 캘러스 유도배지에 치상하였다.

### 배발생 캘러스 유도

성숙종자로부터 캘러스를 유도하기 위한 기본적인 캘러스 유도배지는 3 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamin-HCl, 100 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose 및 5 g/L Gelrite가 함유된 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지를 사용하였다. 캘러스 유도 시의 생장조절제의 종류와 농도에 따른 배발생 캘러스 유도 효율을 조사하기 위하여 상기의 캘러스 유도배지에 auxin

(2,4-D, dicamba, NAA, IAA)과 cytokinin (BA, kinetin)을 단용 또는 혼용 첨가한 배지를 사용하였다. 배지에 살균된 종자를 치상한 다음, 24±2°C의 생장실에서 약광조건 (50 µE/m<sup>2</sup>·s)으로 4주간 배양한 후, 1개의 종자로부터 형성된 캘러스의 생체중을 조사하여 비교하였다.

### 식물체 재분화

성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체로 재분화시키기 위한 재분화배지로는 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamin-HCl, 100 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose 및 5 g/L Gelrite가 함유된 N6 기본배지 (Chu et al. 1975)를 사용하였다. 식물체 재분화를 위한 적정 생장조절물질의 종류와 농도를 조사하기 위하여 4주령의 배발생 캘러스를 auxin과 cytokinin이 각각 조합처리된 재분화배지에 옮겨 24±2°C, 16 h light/8 h dark 조건에서 3주간 배양한 다음 동일한 새 배지에 1회 계대배양한 후, 총 6주 동안 배양하여 각각의 처리구에서 형성된 2 cm 이상으로 자란 shoot을 재분화개체로 조사하였다. 재분화된 shoot는 1/2 MS배지에 이식하여 뿌리발생을 유도하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

### 기본배지 및 탄소원 종류별 배양효과

성숙종자로부터 캘러스 유도와 식물체 재분화를 위한 적정 기본배지의 종류를 규명하기 위하여 MS, N6 및 SH (Schenk and Hildebrandt 1972)배지에 상기와 동일방법으로 살균된 종자 및 캘러스를 배양하여 기본배지종류에 따른 캘러스 유도 효율과 식물체 재분화율을 각각 조사하였다.

캘러스 유도배지와 식물체 재분화배지에 에너지원으로 첨가되는 탄소원의 종류별 배양효과를 조사하기 위하여 캘러스 유도배지 및 재분화배지에 sucrose, maltose, glucose 및 sorbitol을 각각 30 g/L 농도로 배지에 첨가하여 배양한 후, 유도된 캘러스의 생체중과 재분화된 식물체의 개체수를 각각 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 생장조절물질의 배양효과

오차드그래스의 종자배양에 있어서 캘러스 유도배지에 첨가되는 생장조절물질의 종류에 따른 효과를 규명하기 위하여 살균된 Roughrider 품종의 종자를 2,4-D, dicamba, NAA 및 IAA가 각각 1~5 mg/L의 농도로 첨가된 캘러스 유도배지에서 배양해 본 결과, 종자로부터의 캘러스 유도율은 3 mg/L 2,4-D 또는 3 mg/L dicamba 단용처리구가 50% 이상으로 NAA

또는 IAA처리구 보다 높게 나타났다 (결과 미제시). 가장 좋은 캘러스 유도효율을 보였던 2,4-D에 대해 단용처리 또는 cytokinin과의 혼용처리 때의 배양효율을 조사해보았다 (Table 1). 종자로부터 캘러스 유도율은 2,4-D의 농도에 따른 큰 차이가 발견되지 않았으나, 종자 1개당 증식된 캘러스의 생체중은 3 mg/L의 2,4-D가 첨가된 배지에서 78 mg으로 가장 높게 나타났으며, 재분화율은 3 mg/L 이상의 농도에서는 급격히 감소하였다. 한편 2,4-D와 BA를 혼용처리 했을 경우는 3 mg/L의 2,4-D에 0.1 mg/L의 BA를 첨가하여 배양했을 때 3 mg/L의 2,4-D 단용처리구에 비해 캘러스 유도율과 생체중은 거의 변화가 없었으나, 식물체 재분화율은 61%로 1.6배 정도 급격히 증가하였다. 이 때 형성된 캘러스는 형태적으로도 조직이 치밀하고 유백색을 띤 배발생 캘러스가 가장 많이 형성되었다. 그러나 2,4-D와 kinetin의 혼용처리의 경우 배양효율이 2,4-D 단용처리에 비해 오히려 낮은 결과를 보였다 (결과 미제시).

이러한 결과는 오차드그래스의 종자배양에 있어서 캘러스 유도배지에 첨가되는 성장조절제의 종류와 농도가 캘러스의 증식뿐만 아니라 식물체로의 재분화시에도 많은 영향을 미친다는 것을 의미한다. 지금까지 연구된 오차드그래스 Potomac 품종의 세포배양의 경우에는 주로 30  $\mu$ M의 dicamba (3,6-dichloro-o-anisic acid)가 가장 효과적인 것으로 보고되었으나 (Conger et al. 1983; 1989), 본 연구의 Roughrider 품종의 경우 2,4-D와 BA의 혼용처리가 더 효과적인 것으로 나타나 이들 품종간의 genotype 차이에 따른 배양효율의 차이가 큰 것으로 추측된다. 최근 BA를 캘러스 유도배지에 첨가해주는 것이 배발생 캘러스의 형성률과 재분화율을 개선시킨다는 결과가 화본과 작물인 보리 (Cho et al. 1998), 캔터키 블루그래스 (Griffin et al. 1995; Van der Valk et al. 1995), 버뮤다그래스 (Chaudhury and Rongda 2000) 및 밴트그래스 (Zhong and Sticklen 1991) 등에서도 보고된 바가 있다.

#### 캘러스로부터 식물체 재분화

종자유래의 캘러스로부터 식물체 재분화시에 배지에 첨가되는 성장조절제의 종류와 적정농도를 조사하기 위하여 3 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L의 BA가 첨가된 캘러스 유도배지에서 4주간 형성된 캘러스를 여러가지 종류의 auxin과 cytokinin을 예비실험을 통하여 처리해 본 결과 (결과 미제시), 2,4-D와 BA의 혼용처리가 가장 높은 재분화율을 나타내었다. Table 2에 나타낸 바와 같이 식물체 재분화에는 1 mg/L 2,4-D와 3 mg/L BA 혼용처리구가 재분화율이 62%로 가장 높게 나타났으며, 5 mg/L BA 처리구는 오히려 37%로 감소하였다 (Table 2). 따라서 이후의 실험에는 캘러스유도에는 3 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA가 첨가된 배지를, 재분화에는 1 mg/L 2,4-D와 3 mg/L BA를 첨가하여 사용하였다.

종자로부터 캘러스유도 및 식물체 재분화에 미치는 기본배지의 종류에 따른 영향을 조사하기 위하여 MS, SH 및 N6 기본배지를 사용하여 조사한 결과는 Table 3과 같다. 캘러스 유도율은 MS배지와 N6배지가 SH배지에 비해 비교적 효과적이

**Table 2.** Effect of 2,4-D and BA concentrations on plant regeneration from mature seed-derived callus of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L. cv. Roughrider).

2,4-D (mg/L)	BA (mg/L)	No. of calli cultured <sup>a</sup>	Plant regeneration (%) <sup>b</sup>
1.0	0	100	46.0
1.0	1.0	100	54.0
1.0	3.0	100	62.0
1.0	5.0	100	37.0

<sup>a</sup>Calli cultured on the callus induction medium (MS medium, 3 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamin-HCl, 100 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L Gelrite) were used.

<sup>b</sup>Calli were transferred to the regeneration medium (see the footnote in Table 1) containing different concentrations of growth regulators, and cultured for 6 weeks.

**Table 1.** Effect of 2,4-D on callus formation and plant regeneration from mature seed culture of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L. cv. Roughrider).

Growth regulators (mg/L)		No. of seeds cultured <sup>a</sup>	Callus formation (%)	Callus fresh weight per seed (mg) <sup>b</sup>	Plant regeneration (%) <sup>c</sup>
2,4-D	BA				
0	-	50	0	0	0
1	-	120	52.5	42 $\pm$ 1.8	35.0
3	-	120	54.8	78 $\pm$ 2.5	38.0
5	-	120	50.8	47 $\pm$ 2.3	26.0
3	0.1	120	53.3	75 $\pm$ 1.2	61.0
3	0.5	120	44.2	72 $\pm$ 2.1	53.0
3	1.0	120	22.5	70 $\pm$ 3.1	37.0

<sup>a</sup>Dehusked mature seeds were placed on MS medium containing 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamin-HCl, 100 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L Gelrite, and cultured for 4 weeks.

<sup>b</sup>Data represent mean of callus fresh weight formed from one seed.

<sup>c</sup>Calli were transferred to the regeneration medium (N6 medium, 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamin-HCl, 100 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L Gelrite), and cultured for 6 weeks.

었으며, 식물체 재분화에는 MS배지나 SH배지에 비해 N6배지가 월등히 높은 재분화율을 나타내었다 (Table 3). 화분과 작물의 캘러스 유도배지의 경우 일반적으로 N6배지가 효율적인 것으로 알려져 있으나 (Vasil and Vasil 1984), 화분과 사료작물인 톨페스큐의 미숙배 배양 (Bai and Qu 2000), 이탈리아 라이그래스의 종자배양 (Wang et al. 1993; Ye et al. 1997), 켄터키 블루그래스의 종자배양 (Griffin and Dibble 1995) 등의 경우에는 MS배지가 캘러스 형성에 효율적인 것으로 보고되어 오차드그래스도 이들과 유사한 결과를 나타내었다.

품종에 따른 배양효율의 차이

오차드그래스 Roughrider 품종의 성숙종자로부터 배발생 캘러스 유도에는 1 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA가 첨가된 MS배지가 가장 효과적이었으며, 식물체 재분화에는 1 mg/L 2,4-D와 3 mg/L BA가 첨가된 N6배지가 가장 효율적인 것으로 나타났다. 이와 동일한 배지조건에서 오차드그래스의 품종간의 캘러스유도 및 식물체 재분화 능력을 조사하기 위하여 Roughrider 외 3품종을 이용하여 배양효율을 조사하였다 (Table 4). 종자로부터 캘러스 유도율은 50.8~55.8%로 품종간에 큰 차이를 나타내지 않았으나, 재분화능력은 Roughrider가 61%로 가장 높았으며, Frode와 Frontier가 각각 52%와 45%로 중간정도의 재분화율을, Potomac이 34%로 가장 낮은 재분화율을 나타내었다. 품종간의 재분화능력의 차이가 화분과 사료작물인 이탈리아 라이그래스 (Rim et al. 2000), 피레니얼 라이그래스 (Wang et al. 1993), 레드페스큐 (Altpeter and Xu 2000) 등에서도 보고된 바 있다. 이러한 차이는 모식물체의 genotype에 따른 차이, 기내배양시 세포의 활력의 차이, 또는 품종에 따른 최적 재분화배지조건이 서로 다를 수 있음을 나타낸다.

**Table 3.** Effect of basal medium on callus formation and plant regeneration from mature seed culture of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L. cv. Roughrider).

Culture media	No. of seeds cultured	Callus formation (%) <sup>a</sup>	No. of calli cultured	Plant regeneration (%) <sup>b</sup>
MS	120	54.2	100	47.0
N6	120	50.8	100	60.0
SH	120	44.2	100	45.0

<sup>a</sup>Dehusked mature seeds were placed on each medium containing 3 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 100 mg/L myo-inositol, 500 mg/L proline, 30 g/L sucrose and 5 g/L Gelite, and cultured for 4 weeks.

<sup>b</sup>Calli were transferred to each medium containing 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 100 mg/L myo-inositol, 30 g/L sucrose and 5 g/L Gelite, and cultured for 6 weeks.

탄소원의 종류에 따른 배양효율

성숙종자로부터 캘러스유도와 식물체 재분화배지에 에너지원으로 첨가되는 탄소원의 종류에 따른 배양효과를 조사한 결과 캘러스 유도에는 3%의 sucrose를 첨가했을 때 55.8%의 가장 높은 캘러스 유도율을 나타내었으며 maltose 첨가구가 54.2%, glucose와 sorbitol의 경우는 43% 이하의 비교적 낮은 캘러스 유도율을 나타내었다 (Table 5). 반면에 식물체 재분화율은 maltose 첨가구가 69%로 가장 높은 효율을 나타내었으며 sucrose 첨가구가 61%, glucose가 45%, 그리고 sorbitol 첨가구가 21%로 가장 낮은 효율을 나타내었다. 특히 maltose 첨가구의 경우 재분화율도 가장 높았을 뿐만 아니라 캘러스당 재분화 식물체의 수도 가장 많은 경향을 나타내었다 (결과 미 제시). 이러한 결과는 적정 생장조절제와 배지조건에서 배양하더라도 배지 내에 첨가되는 탄소원의 종류가 재분화효율에 미치는 영향이 매우 크다는 것을 의미한다. 따라서 오차드그래스의 최적 배양조건은 품종은 Roughrider가, 배발생 캘러스 유도에는 3 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA, 3% sucrose가 첨가된 MS배지가, 식물체 재분화에는 1 mg/L 2,4-D와 3 mg/L BA, 3% maltose가 첨가된 N6배지가 가장 효과적인 것으로 판명되었다. 이러한 조건에서 배양했을 때 배발생 캘러스는 캘러

**Table 4.** Effect of cultivars on callus formation and plant regeneration from mature seed culture of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.).

Cultivars	No. of seeds cultured <sup>a</sup>	Callus formation (%)	No. of calli cultured	Plant regeneration (%) <sup>b</sup>
Frontier	120	55.8	100	45.0
Potomac	120	50.8	100	34.0
Roughrider	120	56.7	100	61.0
Frode	120	57.5	100	52.0

<sup>a</sup>Dehusked mature seeds were placed on the callus induction medium (see the footnote in Table 1) and cultured for 4 weeks.

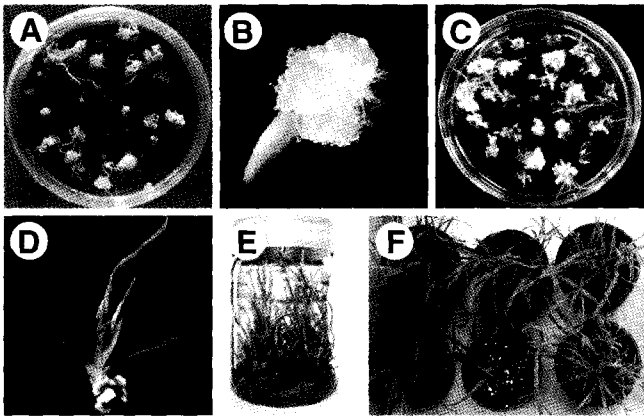
<sup>b</sup>Calli were transferred to the plant regeneration medium (see the footnote in Table 1) and cultured for 6 weeks.

**Table 5.** Effect of different carbon sources on callus formation and plant regeneration from mature seed culture of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L. cv. Roughrider).

Carbon sources	No. of seeds cultured <sup>a</sup>	Callus formation (%)	No. of calli cultured	Plant regeneration (%) <sup>b</sup>
Sucrose	120	55.8	100	61.0
Maltose	120	54.2	100	69.0
Glucose	120	43.3	100	45.0
Sorbitol	120	23.3	100	21.0

<sup>a</sup>Dehusked mature seeds were placed on the callus induction medium (see the footnote in Table 1) containing 30 g/L of each carbon source, and cultured for 4 weeks.

<sup>b</sup>Calli were transferred to the plant regeneration medium (see the footnote in Table 1) containing 30 g/L of each carbon source, and cultured for 6 weeks.



**Figure 1.** Plant regeneration from seed-derived callus of orchardgrass. A, Calli induced from mature seeds cultured on the callus induction medium; B, Embryogenic callus formed from a seed; C, Plant regeneration from embryogenic calli in the regeneration medium; D, Development of a shoot cultured in the regeneration medium; E, Plantlets cultured in the rooting medium; F, Whole plants grown in pots under green house.

스유도배지에서 배양 3일째부터 형성되기 시작하여 4주 후에는 50% 이상 형성되었으며 (Figure 1A, B), 재분화배지에 이식했을 때 배양 6주 후에는 약 70%의 높은 빈도로 신초가 재분화 되었다 (Figure 1C, D). 재분화된 신초는 1/2 MS로 구성된 rooting 배지에서 1주간 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 pot에 이식하여 재배할 수 있었다 (Figure 1E, F).

화분과 사료작물인 오차드그래스는 우리나라에서 가장 많이 재배되고 있는 주초종이나 여름철 고온다습 등의 환경스트레스에 약한 단점이 있어서 환경 스트레스에 강한 품종의 개발이 시급한 실정이다. 본 연구에서 개발한 단기간 내의 고효율 재분화 시스템은 환경 스트레스 내성 형질전환 식물체 개발에 유용하게 이용될 것으로 판단된다.

## 적 요

유용유전자 형질전환을 통한 신품종 오차드그래스 개발을 위한 최적 조직배양조건을 확립하기 위하여 성숙종자로부터 최적 배발생 켈러스 유도 및 고효율 식물체 재분화 체계를 확립하였다. 배발생 켈러스 유도시 첨가되는 auxin으로는 2,4-D가 가장 효율적이었으며, 3 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA가 첨가된 MS배지에서 배발생 켈러스가 가장 높은 빈도로 유도되었다. 식물체 재분화는 배발생 켈러스를 1 mg/L 2,4-D와 3 mg/L BA가 첨가된 N6배지에서 배양했을 때 62%의 재분화율을 나타내었다. 기본배지의 종류에 따른 배양효율의 차이는 켈러스 유도에는 MS배지가, 식물체 재분화에는 N6배지가 효과적이었다. 오차드그래스의 품종에 따른 배발생 켈러스의 유도율은 큰 차이가 없었으나, 재분화 능력은 품종 간에 큰 차이를 나타내어 Roughrider가 61%의 가장 높은 재분화율을 나타내었다. 재분화배지에 탄소원으로서 maltose를 첨가해주

었을 때 재분화율이 69%로 증가되었다. 본 연구를 통하여 확립된 단기간 고효율 재분화시스템은 분자유종을 통한 신품종 오차드그래스 개발에 유용하게 응용되어질 수 있을 것이다.

사사 - 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 연구비 지원으로 수행되었음.

## 인용문헌

- Altpeter F, Xu J (2000) Rapid production of transgenic turfgrass (*Festuca rubra* L.) plants. *J Plant Physiol* 157: 441-448
- Bai Y, Qu R (2000) An evaluation on callus induction and plant regeneration of 25 turf-type tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) cultivars. *Grass Forage Sci* 55: 326-330
- Chaudhury A, Rongda Q (2000) Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type Bermuda grass: effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. *Plant Cell Tiss Org Cult* 60: 113-120
- Cho MJ, Jiang W, Laumaux PG (1998) Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. *Plant Sci* 138: 229-244
- Cho MJ, Choi HW, Lemaux PG (2001) Transformed orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) plants produced from regenerative tissues derived from mature seeds. *Plant Cell Rep* 20: 318-324
- Chu CC, Wang CS, Sun CC, Hsu C, Yin KC, Chu CY, Bi FY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* 18: 659-668
- Conger BV, Hanning GE, Gray DJ, McDaniel JK (1983) Direct embryogenesis from methophyll cells of orchardgrass. *Science* 221: 850-851
- Conger BV, Hovanessian JC, Trigano R, Gray DJ (1989) Somatic embryo ontogeny insuspension cultures of orchardgrass. *Crop Sci* 29: 448-452
- Denchev PD, Songstad DD, McDaniel JK, Conger BV (1997) Transgenic orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) plants by direct embryogenesis from microprojectile bombarded leaf cells. *Plant Cell Rep* 16: 813-819
- Forster JW, Spangenberg G (1999) Forage and turf grass biotechnology: principles, methods and prospects. In: Setlow JK (eds), *Genetic engineering: principles and methods*, Vol 21, Kluwer Academic Publishers, New York, pp 191-237
- Griffin JD, Dibble MS (1995) High frequency plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). *Plant Cell Rep* 14: 721-724
- Horn ME, Shillito RD, Conger BV, Harms CT (1988) Transgenic plants of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) from protoplasts. *Plant Cell Rep* 7: 469-472

- McKersie BD (1997) Improving forage production systems using biotechnology. In: McKersie BD and Brown DCW (eds), *Biotechnology in Agriculture Series*, No. 17, CAB International, Wallingford, pp 3-21
- Miller DA (1984) Forage crops. McGraw-Hill, New York, pp 396-409
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Rim YW, Kim KY, Choi KJ, Sung BR, Shin JS (2000) Callus induction from seeds of Italian ryegrass and plant regeneration. *J Korean Grassland Sci* 20: 25-30
- Schenk RU, Hildebrand AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 199-204
- Spangenberg G, Wang ZY, Potrykus I (1998) Biotechnology in forage and turf grass improvement. In: Frankel et al (eds), *Monographs on theoretical and applied genetics*, Vol. 23, Springer Verlag, Heidelberg, pp 192-210
- Van der Valk P, Ruis F, Tettelaar-Schrier AM, van der Velde CM (1995) Optimizing plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass, the effect of benzyladenine. *Plant Cell Tiss Org Cult* 40: 101-103
- Van Santen E, Sleper DA (1996) Orchardgrass. In: Moser LE et al (eds), *Cool-season forage grasses*. Vol 34, ASA, CSSA, and SSSA, Madison WI, pp 503-534
- Van Wijk AJP, Boonman JG, Rumball W (1993) Achievements and perspectives in the breeding of forage grasses and legumes. In: Baker MJ (eds), *Grasslands for our world*, SIR, Wellington, pp 116-120
- Vasil V, Vasil IK (1984) Induction and maintenance of embryogenic callus cultures of Gramineae. In: Vasil IK (eds), *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, Vol 1, Academic Press, Orlando, pp 36-42
- Wang ZY, Nagel J, Potrykus I, Spangenberg G (1993) Plants from cell suspension-derived protoplasts in *Lolium* species. *Plant Sci* 94: 179-193
- Ye X, Wang ZY, Wu X, Potrykus I, Spangenberg G (1997) Transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. *Plant Cell Rep* 16: 379-384
- Zhong H, Sticklen MB (1991) Plant regeneration via somatic embryogenesis in creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds). *Plant Cell Rep* 10: 453-456

(접수일자 2003년 10월 20일, 수리일자 2003년 11월 10일)