

이탈리안 라이그래스의 성숙종자 유래 캘러스로부터 효율적인 식물체 재분화

우현숙¹, 이상훈¹, 이동기¹, 김진수¹, 원성혜³, 이병현^{1,2*}

¹경상대학교 응용생명과학부, ²경상대학교 PMBBRC, ³경북대학교 농업과학기술연구소

Efficient Plant Regeneration from Mature Seed-derived Callus of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.)

Hyun-Sook Woo¹, Sang-Hoon Lee¹, Dong-Gi Lee¹, Jin-Soo Kim¹, Sung-Hye Won³, Byung-Hyun Lee^{1,2*}

¹Division of Applied Life Science, ²PMBBRC, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

³Institute of Agricultural Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

ABSTRACT As an initial step for future genetic manipulations to improve forage characteristics of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.), an efficient tissue culture system was established and the factors affecting plant regeneration were evaluated. MS medium containing 5 mg/L 2,4-D was optimal for embryogenic callus induction from mature seed and had a strong effect on successive plant regeneration. The plant regeneration frequency was observed at above 70% when embryogenic calli induced were transferred to N6 medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D and 5 mg/L BA. Among several basic media tested, MS and N6 medium were optimal for callus induction and plant regeneration, respectively. Genotype was an important factor in plant regenerability. 'Jeanne' showed the highest regeneration frequency of 73%. A short tissue culture period and high-frequency regeneration system established in this study will be useful for molecular breeding of Italian ryegrass through genetic transformation.

Key words: Forage crop, Italian ryegrass, *Lolium multiflorum*, plant regeneration

서 론

이탈리안 라이그래스 (*Lolium multiflorum*)는 유럽 및 아시아의 온대지역에 널리 분포하는 일년생 또는 월년생 사료작물이며 같은 *Lolium* 속에 속하는 다년생 사료작물인 perennial ryegrass와 함께 전세계적으로도 널리 재배되고 있는 초종 중의 하나이다 (Hides et al. 1993; Isselstein 1993). 우리나라에서는 남부지방에서 많이 재배되고 있는 중요한 사료작물 중의 하나이며, 사료가치가 높고 단기간에 높은 수량을 얻을 수 있어서 여러 번 수확할 수 있을 뿐만 아니라 가축의 기호성이 좋고 소화율이 좋아서 가축생산성이 좋으며 당분함량이 높아서 청예이용, 방목이용, 건초조제, 사일리지 및 곤포사료 조제

이용 등 소 사육에 있어서 그 용도가 다양하여 재배적 가치가 매우 높은 사료작물이다 (Park et al. 1987). 그러나 이탈리아 라이그래스는 추위에 견디는 힘이 약하여 1월 최저 평균 기온이 -5°C 이하인 중북부 지방에서는 월동이 불가능하여 재배가 어려운 단점이 있다 (Choi et al. 2000). 이러한 단점을 보완하기 위해 지금까지 자연계에 존재하는 우수형질을 가진 품종을 선발하고 이들 간의 교잡에 의해 유용한 유전형질을 고정시키는 전통적인 육종법에 의한 연구가 활발히 진행되어 왔으며 (Van Wijk et al, 1993), 국내에 있어서도 교잡육종에 의해 '화산101호'와 같은 몇몇 신품종이 개발되었으나 아직 널리 보급되어 있지 못하고 있는 실정이다 (Choi et al. 2000). 이탈리아 라이그래스는 자가불화합성이 매우 높아서 이러한 전통육종법에 의한 육종에는 많은 시간과 공간이 요구되는 제한이 있어서 속도가 매우 느린 단점이 있다 (Ye et al. 1997). 최근에는 유용유전자의 도입을 통한 분자육종법에 의

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

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

한 사료작물의 신품종 개발을 위한 많은 연구가 시도되고 있다 (McKersie 1997; Spangenberg et al. 1998). 이러한 유용유전자의 형질전환에 의한 신품종 사료작물의 분자유육종을 위해서는 먼저 단기간 내에 높은 재분화율을 나타내는 효율적인 조직배양 기술체계가 확립되어야 한다 (Forster and Spangenberg 1999).

지금까지 이탈리아 라이그래스의 재분화에 관한 연구는 배주배양을 통한 식물체 재분화 (Kumlehn and Nitzsche 1995), 미성숙 배 (Dale 1980) 및 미성숙 화서 (Dale et al. 1981; Creemers-Molenaar et al. 1988) 등을 이용한 배발생 및 식물체 재분화에 관한 연구가 보고 되었다. 그러나 이러한 조직 및 기관을 이용한 식물체 재분화 체계는 사료조직을 분리하기 위한 조작이 번거로울 뿐만 아니라 재료식물의 생장시기에 따라 사료의 확보 자체가 제한받는 등 유전자도입을 통한 분자유육을 위한 조직배양체계로 이용하기에는 부적합하다. 국내에서도 최근 종자로부터 켈러스 유도 및 식물체 재분화에 관한 연구가 보고 된 바 있으나 (Rim et al. 2000; Lee et al. 2001), 식물체의 재분화율이 비교적 낮고 체계적인 재분화 조건이 확립되어 있지 않을 뿐만 아니라, 특히 장기간의 배양기간을 요구하는 드의 제한요인으로 인해 형질전환에 적용하기에는 효율적이지 못한 측면이 있다.

따라서 본 연구에서는 유용유전자의 형질전환을 통한 신품종 이탈리아 라이그래스를 개발할 목적으로 우선 실험재료로서 연중 안정적인 확보가 가능한 성숙종자를 이용하여 켈러스 유도 조건 및 단기간 고효율 식물체 재분화 조건을 체계적으로 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 종자살균

식물재료로는 이탈리아 라이그래스 (*Lolium multiflorum* Lam.)의 품종 중 Jeanne, Florida-80, Rio 및 Metro 4가지 품종을 사용하였다. 종자 살균은 Lee 등 (2003)의 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 성숙종자의 종피를 제거한 다음 70% ethanol에서 30초간 살균한 후, 30% sodium hypochlorite 용액에서 30분간 교반하면서 표면살균 하였다. 살균한 종자는 멸균수로 3회 세정한 후 멸균된 filter paper에 옮겨 물기를 제거하고 켈러스 유도배지로 옮겨 치상하였다.

종자로부터 켈러스 유도

성숙종자로부터 켈러스를 유도하기 위한 기본적인 켈러스 유도배지는 5 mg/L 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose 및 5 g/L Gelrite가 함유된 MS배지

(Murashige and Skoog 1962)를 사용하였다. 켈러스 유도시의 생장조절제의 종류와 농도에 따른 배발생 켈러스 유도 효율을 조사하기 위하여 상기의 켈러스 유도배지에 auxin (2,4-D, NAA, IAA, dicamba)과 cytokinin (BA, kinetin)을 단용 또는 혼용하여 첨가한 배지를 사용하였다. 배지에 살균된 종자를 치상한 다음, 24±2°C의 생장실에서 50 µE/m²·s의 광조건으로 2주간 배양한 후 형성된 켈러스 조직만을 취하여 새 배지로 계대하여 3주간 배양하여 한 개의 종자로부터 형성된 켈러스의 생체중을 10반복으로 비교 조사하였다.

식물체 재분화

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

결과 및 고찰

생장조절물질의 종류와 농도에 따른 배양효과

이탈리안 라이그래스의 종자배양에 있어서 켈러스 유도배지에 첨가되는 생장조절물질의 종류와 농도에 따른 효과를 규명하기 위하여 예비실험으로 각각의 이탈리아 라이그래스 4품종의 종자를 auxin 종류인 2,4-D, NAA, IAA 또는 dicamba와 cytokinin 종류인 BA 또는 kinetin을 각각 1~10 mg/L의 농도로 단용 또는 혼용 첨가된 켈러스 유도배지에서 배양해 본 결과, 품종별로는 Jeanne 품종이, 생장조절물질은 2,4-D 또는 dicamba (3,6-dichloro-o-anisic acid) 단용처리구에서 켈러스 유도율이 높게 나타났다 (결과 미제시). 예비실험 결과 가장 좋은 배양효율을 나타내었던 Jeanne 품종에 있어서 2,4-D와 dicamba의 첨가농도에 따른 배양효율을 조사하여 보았다 (Tables 1, 2). 켈러스 유도배지에 첨가한 2,4-D의 농도에 따른 성숙종자로부터 켈러스 유도율과 배양 5주체의 켈러스 생체중은 5 mg/L의 2,4-D 처리구에서 각각 65.7%와 40 mg으로서 가장 높았으며 이보다 낮거나 높은 농도의 2,4-D 처리구에서는 낮은 유도율과 생체중을 나타내었다 (Table 1). 또한 이때

형성된 캘러스를 재분화배지에 계대배양하여 식물체 재분화율을 조사해 본 결과 71%의 가장 높은 재분화율을 나타내었으며 다른 농도의 2,4-D 처리구 유래의 캘러스에 비해 높은 재분화율을 나타내었다.

한편 dicamba 처리구의 경우 7 mg/L의 농도로 배지에 첨가한 배지에서 캘러스 유도율과 한 개의 종자로부터 형성된 캘러스의 평균 생체중이 각각 73.8%와 85 mg으로서 가장 높게 나타났으나 재분화율은 1 mg/L dicamba 처리구 유래의 캘러스가 42%로 가장 높게 나타났다 (Table 2). 전체적으로 캘러스 유도율과 한 개의 종자로부터 형성된 캘러스의 생체중은 2,4-D 처리구에 비해 dicamba 처리구가 높게 나타났으나, 식물체 재분화율은 2,4-D 처리구에서 높게 나타났다. 이와 같은 결과는 이탈리안 라이그래스의 종자배양에 있어서 캘러스 유도 배지에 첨가되는 성장조절제의 종류와 농도가 캘러스의 증식뿐만 아니라 재분화배지에 계대배양했을 때 식물체로의 재분

화시에도 많은 영향을 미친다는 것을 의미한다. 이탈리안 라이그래스의 조직배양에 있어서 2,4-D의 첨가가 다른 종류의 auxin 첨가에 비해 배발생 캘러스유도에 있어서 보다 효과적이라는 결과가 종자 (Rim et al. 2000; Lee et al. 2001), 화서 (Creemers-Molenaar et al. 1988), 배주배양 (Kumlehn and Nitzsche 1995) 및 현탁배양 (Dalton et al. 1999) 등에서도 보고되어 본 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다.

캘러스로부터 식물체 재분화

종자유래의 캘러스로부터 식물체 재분화시에 배지에 첨가되는 성장조절제의 종류와 적정농도를 조사하기 위하여 5 mg/L 2,4-D가 첨가된 캘러스 유도배지에서 5주간 배양한 캘러스를 여러가지 종류의 auxin과 cytokinin이 첨가된 재분화배지에서 예비실험을 통하여 처리해 본 결과 2,4-D와 BA의 혼용처리가 다른 성장조절물질들의 단독 또는 혼용처리에 비해 비교적 높은 재분화율을 나타내었다 (결과 미제시). 성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체 재분화에 미치는 2,4-D와 BA의 첨가효과를 Table 3에 나타내었다. 식물체 재분화에는 1 mg/L 2,4-D와 5 mg/L BA 혼용처리가 재분화율이 72%로서 가장 높게 나타났으며, 3 mg/L 2,4-D와 5 mg/L BA 혼용처리구에서도 비교적 높은 56%의 재분화율을 나타내었다. 그러나 2,4-D와 kinetin, NAA와 BA 또는 kinetin, 및 dicamba와 BA 또는 kinetin 혼용처리구에서는 35% 이하의 재분화율을 나타내어 (결과 미제시) Jeanne 품종에 있어서 캘러스로부터 식물체 재분화에는 2,4-D와 BA의 혼용처리가 가장 효과적인 것으로 판단되었다. 이탈리안 라이그래스 배주유래의 캘러스로부터 식물체에는 0.2 mg/L 2,4-D와 1 mg/L zeatin을 혼용처리했을 때 43% 정도의 재분화율을 나타내었으며 (Kumlehn and Nitzsche 1995), Lee 등 (2001)의 경우 1 mg/L NAA와 5 mg/L

Table 1. Effect of 2,4-D on callus formation and plant regeneration from mature seed culture of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam. cv. Jeanne).

2,4-D (mg/L)	No. of seeds cultured ^a	Callus formation (%)	Callus fresh weight (mg) ^b	Plant regeneration (%) ^c
1	110	39.1	30±1.0	42.0
3	110	50.0	35±1.3	46.0
5	110	65.7	40±2.1	71.0
7	110	50.1	35±1.5	39.0
9	110	48.2	36±1.4	30.0

^aDehusked mature seeds were placed on MS medium containing 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L Gelrite, and cultured for 5 weeks.

^bData represent mean of callus fresh weight formed from one seed.

^cCalli were transferred to the regeneration medium (N6 medium, 1 mg/L 2,4-D, 5 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L Gelrite), and cultured for 6 weeks.

Table 2. Effect of dicamba on callus formation and plant regeneration from mature seed culture of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam. cv. Jeanne).

Dicamba (mg/L)	No. of seeds cultured ^a	Callus formation (%)	Callus fresh weight (mg) ^b	Plant regeneration (%) ^c
1	110	51.1	55±2.1	42.0
3	110	59.0	60±1.3	39.0
5	110	62.7	65±2.5	37.0
7	110	73.8	85±0.7	32.0
9	110	67.4	70±1.5	30.0

^aDehusked mature seeds were placed on MS medium containing 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L Gelrite, and cultured for 5 weeks.

^bData represent mean of callus fresh weight formed from one seed.

^cCalli were transferred to the regeneration medium (N6 medium, 1 mg/L 2,4-D, 5 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L Gelrite), and cultured for 6 weeks.

Table 3. Effect of growth regulators on plant regeneration from mature seed-derived callus of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam. cv. Jeanne).

2,4-D (mg/L)	BA (mg/L)	No. of calli cultured ^a	Plant regeneration (%) ^b
1	0	100	4.0
1	2	100	28.0
1	5	100	72.0
1	8	100	54.0
3	0	100	2.0
3	2	100	25.0
3	5	100	56.0
3	8	100	37.0

^aCalli cultured on the callus induction medium (MS medium, 5 mg/L 2,4-D, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 5 g/L Gelrite) were used.

^bCalli were transferred to the regeneration medium (see the footnote in Table 1) containing different concentrations of growth regulators, and cultured for 6 weeks.

kinetin을 첨가해주었을 때 42%의 재분화율을, Rim 등 (2000)은 0.1 mg/L의 NAA와 1 mg/L BA를 첨가해 주었을 때 15%의 재분화율을 나타내어 본 실험의 1 mg/L 2,4-D와 5 mg/L BA 첨가구에서 관찰된 72%의 재분화율에 비해서 훨씬 낮은 재분화율을 나타낸 것으로 보고된 바 있다. 따라서 이탈리아 라이그래스의 효율적인 재분화를 위한 적정 생장조절물질의 처리는 캘러스 유도시에는 고농도의 2,4-D를 첨가해주어 배 발생 캘러스를 형성시키고 이 캘러스를 저농도의 2,4-D와 고농도의 BA가 첨가된 배지에서 배양하는 것이 70% 이상의 높은 재분화율을 얻기 위해서 중요할 것으로 판단된다.

배지 지지체 및 기본배지 종류별 배양효과

이탈리안 라이그래스의 성숙종자유래의 캘러스로부터 식물체 재분화시에 배지에 첨가되는 여러 가지 불활성 지지물의 종류와 농도에 따른 영향을 예비실험을 통해 조사해 본 결과 Gelite (Duchefa, Netherlands)가 비교적 높은 배양효율을 나타내었다 (결과 미제시). 배지에 첨가되는 Gelite의 최적 농도를 규명하기 위하여 3~9 g/L의 농도로 첨가한 배지에서의 캘러스 유도율과 식물체 재분화율을 조사하였다 (Table 4). 캘러스 유도율은 3~5 g/L 농도에서 66% 이상으로 비교적 높게 나타났으며 식물체 재분화율은 5 g/L에서 71%로 가장 높은 효율을 나타내었다.

Table 4. Effect of Gelite concentrations on callus formation and plant regeneration from mature seed culture of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam. cv. Jeanne).

Gelite (g/L)	No. of seeds cultured	Callus formation (%) ^a	No. of calli cultured	Plant regeneration (%) ^b
3.0	110	69.1	100	67.0
5.0	110	66.4	100	71.0
7.0	110	62.7	100	60.0
9.0	110	58.2	100	54.0

^aCalli cultured on the callus induction medium (see the footnote in Table 3) were used.

^bCalli were transferred to the regeneration medium (see the footnote in Table 1) containing different concentrations of growth regulators, and cultured for 6 weeks.

Table 5. Effect of basal medium on callus formation and plant regeneration from mature seed culture of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam. cv. Jeanne).

Culture media	No. of seeds cultured	Callus formation (%) ^a	No. of calli cultured	Plant regeneration (%) ^b
MS	110	66.0	100	47.0
N6	110	59.0	100	70.0
SH	110	58.0	100	41.0

^aCalli cultured on the callus induction medium (see the footnote in Table 3) were used.

^bCalli were transferred to the regeneration medium (see the footnote in Table 1), and cultured for 6 weeks.

한편 성숙종자로부터 캘러스유도 및 식물체 재분화에 미치는 기본배지의 종류에 따른 배양효과를 조사하기 위하여 MS, SH (Schenk and Hildebrandt 1972) 및 N6기본배지를 사용하여 조사한 결과는 Table 5와 같다. 캘러스 유도율은 58~66%로서 기본배지의 종류에 따른 큰 차이는 관찰되지 않았으나 MS배지가 N6배지와 SH배지에 비해 비교적 효과적이었다. 종자유래의 캘러스로부터 식물체 재분화에는 SH배지와 MS배지가 각각 41와 47%의 재분화율을 나타낸 반면 N6배지는 이에 비해 월등히 높은 70%의 재분화율을 나타내어 가장 효과적인 것으로 판단되었다 (Table 5). 일반적으로 화분과 작물의 캘러스배양 및 식물체 재분화에는 N6배지가 효율적인 것으로 알려져 있으나 (Vasil and Vasil 1984), 화분과 사료작물인 톨페스큐의 미숙배 배양 (Bai and Qu 2000), 캔터키 블루그래스의 종자배양 (Griffin and Dibble 1995) 등의 경우에는 MS배지가 배 발생 캘러스 유도에 더 효과적인 것으로 보고된 바 있다. 본 연구에서도 이탈리아 라이그래스의 종자로부터 캘러스 유도에는 MS배지가 효과적이었으며 식물체 재분화에는 N6배지가 MS배지보다 더 효과적인 것으로 나타났다.

품종에 따른 배양효율의 차이

이탈리안 라이그래스의 품종간의 배양효율의 차이를 조사하기 위하여 Jenne의 3품종의 성숙종자를 이용하여 배 발생 캘러스의 유도율과 식물체 재분화율을 비교하였다 (Table 6). 각각의 품종의 성숙종자로부터 캘러스 유도율과 재분화능력은 Jeanne 품종의 최적 캘러스 유도배지조건 및 재분화 배지 조건과 동일한 조건에서 가장 높은 효율을 나타내었다 (결과 미제시). 이러한 동일 배양조건에서 Jeanne 품종의 경우 배 발생 캘러스 유도율과 식물체 재분화율이 각각 67.3%와 73%로서 가장 높았으며 Metro 품종이 각각 40%와 35%로서 가장 낮은 경향을 나타내어 품종 간에 배양효율에 큰 차이가 관찰되었다. 전체적으로는 캘러스 유도율이 높은 품종이 식물체 재분화율도 높은 경향을 나타내었다. 이러한 품종 간의 배양효율의 차이는 품종 자체의 genotype의 차이에 의한 효과이거나, 종자 자체의 활력의 차이 또는 기내배양시 세포의 활력

Table 6. Effect of cultivars on callus formation and plant regeneration from mature seed culture of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam).

Cultivars	No. of seeds cultured	Callus formation (%) ^a	No. of calli cultured	Plant regeneration (%) ^b
Jeanne	110	67.3	100	73.0
Florida-80	110	41.8	100	41.0
Metro	110	40.0	100	35.0
Rio	110	55.5	100	51.0

^aDehusked mature seeds were placed on the callus induction medium and cultured for 5 weeks.

^bCalli were transferred to the plant regeneration medium and cultured for 6 weeks.

의 차이 등에 기인한 결과로 추측된다. 지금까지의 연구에서 이탈리아 라이그래스의 재분화율은 현탁배양세포 유래의 캘러스의 경우 품종에 따라 5~25%의 차이를 보였으며 (Wang et al. 1993), Lee 등 (2001)의 경우 22~56%까지 차이를 보인다고 보고한 바 있어서 본 실험에서 관찰된 결과처럼 품종 간의 배양효율의 차이가 큰 것을 확인할 수 있었다.

본 실험을 통하여 이탈리아 라이그래스의 성숙종자로부터 단기간 내에 재분화 식물체를 획득할 수 있는 조직배양 조건을 확립하였다. 성숙종자를 캘러스 유도배지에서 배양한 결과 배양 3일째부터 배발생 캘러스가 형성되기 시작하여 5주 후에는 65% 이상 형성되었으며 (Figure 1A, B), 재분화 배지에 이식했을 때 배양 6주 후에는 약 70% 이상의 높은 빈도로 신초가 재분화 되었다 (Figure 1C, D). 재분화된 신초는 rooting 배지에서 1주간 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 pot에 이식하여 재배할 수 있었다 (Figure 1E, F). 이와 같은 단기간 내의 효율적인 이탈리아 라이그래스의 재분화 시스템은 고품질 또는 환경스트레스에 대해 강한 내성을 가지는 신품종 형질전환 식물체 개발 등에 있어서 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

적 요

이탈리안 라이그래스의 최적 조직배양 조건을 확립하기 위하여 성숙종자로부터 최적 배발생 캘러스 유도조건 및 효율적인 식물체 재분화 체계를 확립하였다. 배발생 캘러스 유도 시 첨가되는 auxin으로는 2,4-D가 가장 효율적이었으며, 5 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에서 배발생 캘러스가 가장 높은 빈도로 유도되었다. 식물체 재분화는 배발생 캘러스를 1

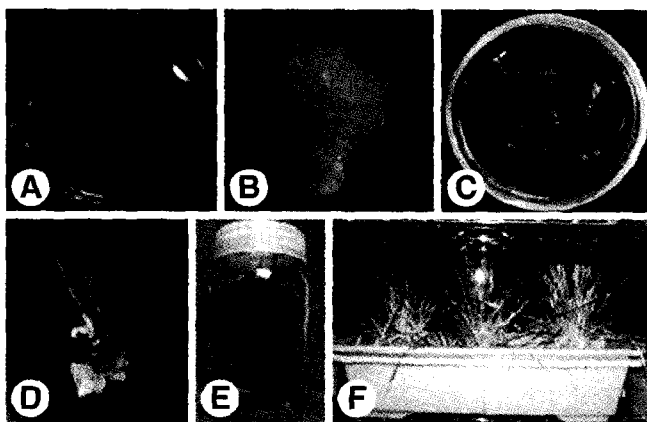


Figure 1. Plant regeneration from seed-derived callus of Italian ryegrass. A, Calli induced from mature seeds cultured on the callus induction medium; B, Embryogenic callus formed from a seed; C, Plant regeneration from embryogenic calli in the regeneration medium; D, Development of a shoot cultured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

mg/L 2,4-D와 5 mg/L BA가 첨가된 N6배지에서 배양했을 때 70% 이상의 재분화율을 나타내었다. 기본배지의 종류에 따른 배양효율의 차이는 캘러스 유도에는 MS배지가, 식물체 재분화에는 N6배지가 효과적이었다. 배발생 캘러스의 형성율은 품종 간에 큰 차이가 없었으나, 재분화 능력은 Jeanne 품종이 73%의 가장 높은 재분화율을 나타내어 품종 간에 큰 차이를 나타내었다. 본 연구를 통하여 확립된 단기간 고효율 재분화 시스템은 분자육종을 통한 신품종 이탈리아 라이그래스의 개발에 유용하게 응용되어질 수 있을 것이다.

사사 - 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 연구비지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

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

Choi GJ, Rim YW, Kim KY, Choi SH, Sung BR, Kim WH, Shin DE, Lim YC (2000) A cold-tolerant and high-yielding Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) new variety 'Hwasan 101'. *J Kor Grassl Sci* 20: 1-6

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

Creemers-Molenaar J, Loeffen JPM, Van der Valk P (1988) The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and donor plant environment on plant regeneration from immature inflorescence derived callus of *Lolium perenne* L. and *Lolium multiflorum* L. *Plant Sci* 57: 165-172

Dale PJ (1980) Embryoids from cultured immature embryos of *Lolium multiflorum*. *Pflanzen Physiol* 100: 73-77

Dale PJ, Thomas E, Brettell RIS, Wemicke W (1981) Embryogenesis from cultured immature inflorescences and nodes of *Lolium multiflorum*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 1: 47-55

Dalton SJ, Betanny AJE, Timms E, Morris P (1999) Co-transformed, diploid *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum* and *Lolium temulentum* plants produced by microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep* 18: 721-726

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

Hides DH Kute CA, Marshall AH (1993) Seed development and seed

- yield potential of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) populations. Grass and Forage Sci 48: 181-188
- Isselstein J (1993) Influence of slight shading, sward density and nitrogen fertilization on yield and nutritive value of *Lolium multiflorum* Lam. J Agro and Crop Sci 170: 341-347
- Kumlehn J, Nitzsche W (1995) Plant regeneration from isolated ovules of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.): effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and different cytokinins supplemented to the ovule culture medium. Plant Sci 111: 107-116
- Lee HS, Kang KM, Jo J (2001) Factors affecting plant regeneration from seed-derived calli in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam). Kor J Plant Tiss Cult 28: 323-328
- Lee SH, Lee DG, Kim JS, Lee BH (2003) High-frequency plant regeneration from mature seed-derived callus culture of orchardgrass. Kor J Plant Biotechnol 30: 341-346
- 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
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Park BH, Park BS, Kang JH (1987) A comparison between diploid and tetraploid cultivars of *Lolium multiflorum* Lam. J Kor Grassland Sci 7: 135-139
- Rim YW, Kim KY, Choi KJ, Sung BR, Shin JS (2000) Callus induction from seeds of Italian ryegrass and plant regeneration. J Kor Grassland Sci 20: 25-30
- Schenk RU, Hildebrandt 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 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

(접수일자 2004년 1월 14일, 수리일자 2004년 3월 8일)