

배지첨가물질이 이탈리아 라이그래스의 종자유래 캘러스 배양에 미치는 영향

우현숙 · 이병현

경상대학교 응용생명과학부 · 농업생명과학연구원

Effects of Medium Supplements on Seed-derived Callus Culture of Italian Ryegrass

H. S. Woo and B. H. Lee

Division of Applied Life Science · Institute of Agriculture and Life Science,
Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT

In an effort to optimize tissue culture responses of Italian ryegrass(*Lolium multiflorum* Lam.) for future genetic manipulations to improve forage characteristics, the effects of culture medium supplements on tissue culture responses were investigated with mature seeds of three cultivars, 'Jeanne', 'Florida-80' and 'Metro', as explant tissues. For all explants, MS medium containing 5mg/L 2,4-D was optimal for embryogenic callus induction from mature seed and had a strong effect on successive plant regeneration. The optimal concentration of dicamba for the induction of embryogenic callus from mature seeds was 7mg/L. The highest plant regeneration frequency was observed when embryogenic callus was transferred to N6 medium supplemented with 1mg/L 2,4-D and 5mg/L BA. Plant regeneration frequency of callus cultured in the dark was higher than that of cultured in the light. Casein hydrolysate and L-proline improved both in embryogenic callus induction from mature seeds and plant regeneration. 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, Plant regeneration, Transgenic forage)

I 서 론

우리나라의 남부지방에서 많이 재배되고 있는 대표적인 사료작물 중의 하나인 이탈리아 라이그래스(*Lolium multiflorum* Lam.)는 유럽 및 아시아의 온대지역에 널리 분포하는 일년생 또는 월년생 사료작물로서 전 세계적으로도 널리 재배되고 있는 초종 중의 하나이다(Hides 등, 1993; Isselstein, 1993). 이탈리아 라이그래스는 사료가치가 높고 단기간에 높은 수량을 올릴 수 있고, 여러 번 수확할 수 있을 뿐만 아니라

가축의 기호성이 좋고 소화율이 높아서 가축생 산성이 좋으며, 당분 함량이 높아서 청예이용, 방목이용, 건조조제, 사일리지 및 곤포사료 조 제이용 등 소 사육에 있어서 그 용도가 다양하 여 재배적 가치가 매우 높은 사료작물이다(Park 등, 1987). 그러나 이탈리아 라이그래스의 여러 가지 장점에도 불구하고 우리나라에서 재배될 경우 1월 최저 평균기온이 -5℃ 이하인 중북 부 지방에서는 월동이 불가능하여 재배가 어려 운 단점이 있다(Choi 등, 2000). 이러한 단점을 보완하기 위해 국내에 있어서도 교잡육종에 의

Corresponding author : B. H. Lee, Division of Applied Life Science · Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea, Tel : 055-751-5418, Fax : 055-751-5410, E-mail : hyun@nongae.gsnu.ac.kr

해 ‘화산101호’와 같은 몇몇 신품종이 개발되었으며(Choi 등, 2000), 전 세계적으로도 선발과 교잡에 의한 전통적인 육종법에 의한 연구가 활발히 진행되고 있다(Van Wijk 등, 1993). 그러나 이탈리아 라이그래스는 자가불화합성이 매우 높아서 이러한 전통육종법에 의한 육종에는 많은 시간과 공간이 요구되는 제한이 있어서 속도가 매우 느린 단점이 있다(Ye 등, 1997). 최근에는 유용유전자의 도입을 통한 분자육종법에 의한 신품종 개발을 위한 많은 연구가 시도되고 있으며(McKersie, 1997; Spangenberg 등, 1998), 이를 위해서는 먼저 효율적인 조직배양 기술체계가 확립되어야 한다(Forster와 Spangenberg, 1999).

지금까지 이탈리아 라이그래스의 재분화에 관한 연구는 배주(Kumlehn과 Nitzsche, 1995), 미성숙 배(Dale, 1980) 및 미성숙 화서(Dale 등, 1981; Creemers-Molenaar 등, 1988) 등을 이용한 배발생 및 식물체 재분화에 관한 연구가 보고된 바 있으며, 국내에서도 최근 종자로부터 캘러스 유도 및 식물체 재분화에 관한 연구가 보고된 바 있다(Rim 등, 2000; Lee 등, 2001). 그러나 아직까지 전체적으로 식물체의 재분화율이 비교적 낮고 장기간의 배양기간을 요구하는 등의 제한요인으로 인해 형질전환에 적용하기에는 효율적이지 못한 측면이 있다.

본 연구에서는 형질전환을 통한 신품종 개발을 위한 기초실험으로 이탈리아 라이그래스 세 가지 품종의 성숙종자로부터 캘러스 유도 시에 첨가되는 배지첨가물질의 종류와 농도 및 배양 조건이 식물체 재분화에 미치는 영향을 체계적으로 조사함으로써 효율적인 재분화 시스템을 확립하여 분자육종의 기반기술을 확립하고자 하였다.

II 재료 및 방법

1. 식물재료 및 종자살균

식물재료로는 이탈리아 라이그래스의 품종 중 Metro, Florida-80 및 Jeanne 품종을 사용하였다. 종자살균은 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 캘러스 유도배지로 옮겨 치상하였다.

2. 종자로부터 캘러스 유도

성숙종자로부터 캘러스를 유도하기 위한 기본적인 캘러스 유도배지는 각종 생장조절물질과 배지 첨가물질이 첨가된 MS배지(Murashige와 Skoog, 1962)를 사용하였다. 캘러스 유도시의 생장조절제의 종류와 농도에 따른 배발생 캘러스 유도 효율과 재분화율을 조사하기 위하여, 상기의 캘러스 유도배지에 auxin(2,4-D, NAA, IAA, dicamba)과 cytokinin(BA, kinetin)을 단용 또는 혼용하여 첨가한 배지를 사용하였다. 배지에 살균된 종자를 치상한 다음, $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 생장실에서 암조건 또는 광조건($100 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$)으로 2주간 배양한 후, 형성된 캘러스 조직만을 취하여 새 배지로 계대하여 3주간 동일한 조건에서 배양하여 한 개의 종자로부터 각각 형성된 캘러스의 직경을 10반복으로 비교 조사하였다.

3. 캘러스로부터 식물체 재분화

성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체로 재분화시키기 위한 기본적으로 사용한 재분화배지는 N6 기본배지(Chu 등, 1975)에 1mg/L 2,4-D, 5mg/L BA, 1g/L casein hydrolysate, 1mg/L thiamine-HCl, 500mg/L L-proline, 30g/L sucrose 및 5g/L gelrite가 첨가된 배지를 이용하였다. 식물체 재분화를 위한 적정 생장조절물질의 종류와 농도를 조사하기 위하여, 5주령의 배발생 캘러스를 식물생장조절물질 또는 배지첨가물질이 각각 조합처리된 재분화배지에 옮겨 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 16h light/8h dark 조건에서 3주간 배양한 다음, 동일한 새 배지에 1회 계대하여 3주간 배양하여 각각의 처리구에서 형성된 2cm 이상으로 자란 shoot를 재분화개체로 조사하였다.

재분화된 shoot는 1/2 MS배지에 이식하여 뿌리 발생을 유도하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

III 결과 및 고찰

1. 식물생장조절물질에 따른 배발생 캘러스 유도 효과

이탈리안 라이그래스의 종자배양에 있어서 캘러스 유도배지에 첨가되는 성장조절물질의 종류와 농도에 따른 효과를 규명하기 위하여, 예비실험으로 이탈리안 라이그래스 3품종의 종자를 다양한 auxin 종류로 처리해본 결과 2,4-D와 dicamba 처리구의 캘러스 유도효율이 다른 auxin 종류에 비해 높게 나타났다. 성숙종자로부터 캘러스 유도시에 배지에 첨가되는 2,4-D의 농도에 따른 각각의 이탈리안 라이그래스의 품종 종자로부터 캘러스가 유도되는 효율을 조사해 본 결과, Table 1과 같이 나타났다. 전체적으로 이탈리안 라이그래스의 성숙종자로부터 캘러스 유도율과 배양 5주째의 캘러스의 크기는 모든 품종이 5mg/L의 2,4-D를 첨가한 처리구에서 가장 높은 결과를 나타내었으며, 이보

다 낮거나 높은 농도의 2,4-D 처리구에서는 낮은 유도율과 크기를 나타내었다. Jeanne 품종의 경우 종자로부터 배발생 캘러스의 유도율은 5mg/L의 2,4-D를 첨가한 처리구에서 69.1%로 가장 높게 나타났으며, 배양 5주째 형성된 캘러스의 크기도 직경이 7.1mm로 가장 왕성하게 증식되었다. Florida-80의 경우도 캘러스 유도배지에 5mg/L의 2,4-D를 첨가했을 때, 캘러스 유도율과 크기가 각각 62.7%와 4.3mm로 가장 높게 나타났으나, Jeanne 품종에 비해서는 낮은 수치를 나타내었다. Metro의 경우 캘러스 유도율과 크기가 각각 52.5%와 5.4mm로 세 품종 중에서 가장 낮은 수치를 나타내었다.

한편 종자로부터 캘러스 유도배지에 성장조절물질로 dicamba를 첨가했을 때의 배양효율을 조사해 본 결과, Table 2와 같았다. 캘러스 유도배지에 2,4-D를 첨가한 처리구와는 달리 dicamba 처리구의 경우 7mg/L의 농도로 첨가한 배지에서 세 가지 품종 모두 캘러스 유도율과 한 개의 종자로부터 형성된 캘러스의 평균 크기가 가장 높게 나타났다. 전체적으로는 2,4-D를 첨가한 처리구에 비해서 높은 캘러스 유도율과 크기의 수치를 나타내었다. Jeanne 품종의 경우 7mg/L dicamba 처리구에서 캘러스 유도율

Table 1. Effect of 2,4-D on callus induction from mature seed of Italian ryegrass

Cultivars	2,4-D(mg/L)	No. of seeds cultured ^a	Callus induction(%)	Callus diameter (mm) ^b
Jeanne	1	110	57.1	6.1 ± 0.10
	3	108	66.7	5.5 ± 0.15
	5	110	69.1	7.1 ± 0.10
	7	114	62.3	6.3 ± 0.12
	9	109	63.3	6.5 ± 0.20
Florida-80	1	115	39.1	3.3 ± 0.21
	3	104	50.0	3.6 ± 0.14
	5	102	62.7	4.3 ± 0.21
	7	105	51.4	2.5 ± 0.41
	9	110	50.9	2.2 ± 0.23
Metro	1	114	42.1	3.5 ± 0.14
	3	105	46.7	4.3 ± 0.12
	5	103	52.5	5.4 ± 0.31
	7	112	50.9	4.6 ± 0.13
	9	102	41.2	3.3 ± 0.21

^a Dehusked 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 and 5 g/L gelrite, and cultured for 5 weeks.

^b Data represent mean of callus diameter formed from one seed.

Table 2. Effect of dicamba on callus induction from mature seed of Italian ryegrass

Cultivars	Dicamba(mg/L)	No. of seeds cultured ^a	Callus induction(%)	Callus diameter(mm) ^b
Jeanne	1	110	59.1	6.2 ± 0.16
	3	112	61.6	7.0 ± 0.12
	5	109	62.4	7.7 ± 0.21
	7	107	73.8	9.0 ± 0.31
	9	106	67.9	9.6 ± 0.20
Florida-80	1	106	30.2	6.4 ± 0.35
	3	109	42.2	7.0 ± 0.21
	5	115	42.6	6.5 ± 0.14
	7	109	63.3	8.1 ± 0.22
	9	106	52.8	7.7 ± 0.10
Metro	1	114	38.6	7.1 ± 0.11
	3	107	43.9	8.6 ± 0.31
	5	110	51.8	8.8 ± 0.23
	7	107	60.7	9.0 ± 0.22
	9	112	56.3	9.0 ± 0.13

^a Dehusked 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 and 5 g/L gelrite, and cultured for 5 weeks.

^b Data represent mean of callus diameter formed from one seed.

이 73.8%로 가장 높았으나, 캘러스의 크기는 9mg/L dicamba 처리구에서 9.6mm로 가장 높은 수치를 나타내었다. Florida-80과 Metro 품종의 경우, 캘러스 유도율은 7mg/L dicamba 처리구에서 각각 63.3%와 60.7%로 Jeanne 품종에 비해서는 낮은 효율을 나타내었다. 전체적으로 dicamba 처리구가 2,4-D 처리구에 비해 높은 캘러스 유도율과 생장속도를 나타내었으나, 2,4-D를 첨가한 배지에서 유도된 캘러스의 경우, 윤기가 있고 매우 치밀한 유백색 조직의 배발생능이 높은 캘러스로 형성되었다. Dicamba를 첨가한 배지에서 형성된 캘러스의 경우, 캘러스의 갈변현상과 부서지기 쉬운 형태의 배발생능이 낮은 캘러스가 유도되는 경향을 나타내었다. 이들 두 종류의 생장조절물질을 첨가한 배지에서 유도된 캘러스를 각각 식물체 재분화배지에서 배양해 본 결과, 2,4-D 첨가배지 유래의 캘러스가 dicamba 처리구 유래의 캘러스에 비해 높은 재분화율을 나타내었다(결과미제시). 이와 같은 결과는 이탈리아 라이그래스의 종자배양에 있어서, 캘러스 유도배지에 첨가되는 생장조절제의 종류와 농도가 성숙종자로부터 캘러스의 유도뿐만 아니라 세포분열 속도에도 많은 영향을 미친

다는 것을 의미한다. 이탈리아 라이그래스의 조식배양에 있어서 2,4-D의 첨가가 다른 종류의 auxin 첨가에 비해 배발생 캘러스유도에 있어서 보다 효과적이라는 결과가 종자(Rim 등, 2000), 미성숙 화서(Creemers- Molenaar 등, 1988), 배주배양(Kumlehn과 Nitzsche, 1995) 및 현탁배양(Dalton 등, 1999) 등에서도 보고되어, 본 연구결과와 유사한 결과를 나타내었다.

2. 캘러스로부터 식물체 재분화에 있어서 식물생장조절물질의 첨가효과

성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체 재분화시에 배지에 첨가되는 생장조절제의 종류와 농도에 따른 식물체 재분화율을 조사하기 위하여, 5mg/L 2,4-D가 첨가된 캘러스 유도배지에서 5주간 배양한 캘러스를 이용하여 품종별로 조사해본 결과, Table 3과 같았다. 캘러스로부터 식물체 재분화에는 세 가지 품종 모두 1mg/L의 저농도 auxin 종류인 2,4-D 또는 dicamba와 5 mg/L의 cytokinin 종류인 BA를 혼용처리했을 때가 auxin을 단독으로 첨가해 주었을 때보다 높은 식물체 재분화율을 나타내었다. Jeanne 품

Table 3. Effect of growth regulators on plant regeneration from mature seed-derived callus of Italian ryegrass

Cultivars	Auxins	BA(mg/L)	No. of callus cultured ^a	Plant regeneration(%)
Jeanne	1 mg/L 2,4-D	0	100	8.0
	1 mg/L 2,4-D	5	100	68.0
	1 mg/L dicamba	0	100	5.0
	1 mg/L dicamba	5	100	46.0
Florida-80	1 mg/L 2,4-D	0	100	4.0
	1 mg/L 2,4-D	5	100	40.0
	1 mg/L dicamba	0	100	1.0
	1 mg/L dicamba	5	100	31.0
Metro	1 mg/L 2,4-D	0	100	3.0
	1 mg/L 2,4-D	5	100	32.0
	1 mg/L dicamba	0	100	0.0
	1 mg/L dicamba	5	100	19.0

^a Callus was transferred to N6 medium containing 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamine-HCl, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose and 5 g/L gelrite, and cultured for 6 weeks.

종의 경우 1mg/L의 2,4-D와 5mg/L의 BA를 동시에 첨가해 주었을 때 식물체 재분화율이 68%로 가장 높게 나타났으며, 1mg/L의 dicamba와 5mg/L의 BA를 처리했을 때는 46%의 식물체 재분화율을 나타내었다. Florida-80 품종의 경우 동일한 조건에서 40%와 31%의 식물체 재분화율을 나타내었으며 Metro 품종의 경우도 32%와 19%의 식물체 재분화율을 나타내어, 전체적으로 세 가지 품종 모두 2,4-D와 BA 혼용 처리구가 dicamba와 BA 처리구에 비해 높은 식물체 재분화율을 나타내었다. 또한 품종별로는 Jeanne 품종의 식물체 재분화율이 가장 높았으며, Florida 품종이 중간 정도의, Metro 품종이 가장 낮은 재분화 효율을 나타내었다. 이러한 캘러스로부터 식물체 재분화 효율의 품종 간 배양효율의 차이는 품종 자체의 genotype의 차이에 의한 효과이거나, 종자 자체의 활력의 차이 또는 기내배양시 세포의 활력의 차이 등에 기인한 결과로 추측된다. 이와 유사한 실험결과가 Kumlehn과 Nitzsche(1995)에 의해 보고되었는데, 이탈리아 라이그래스의 배주유래의 캘러스를 이용한 식물체 재분화에 있어서, 낮은 농도의 2,4-D와 높은 농도의 cytokinin 종류인 zeatin을 혼용처리 했을 때, 43% 정도의 재분화율을 나타내었다고 하였다. 한편 Lee 등(2001)의 경우에는 낮은 농도의 auxin 종류인

1mg/L NAA와 cytokinin 종류인 5mg/L kinetin을 첨가해주었을 때 42%의 재분화율을, Rim 등(2000)은 0.1mg/L의 NAA와 1mg/L BA를 첨가해 주었을 때 15%의 재분화율을 나타내었다고 보고한 바 있다. 또한 화본과 작물인 보리(Cho 등, 1998), 벼트그래스(Zhong 등, 1991) 및 버뮤다그래스(Chaudhury와 Qu, 2000) 등의 재분화에 있어서도 BA의 첨가가 재분화효율을 증가시킨다고 보고된 바 있다. 이들의 보고에서 저농도의 auxin과 비교적 높은 농도의 cytokinin을 재분화배지에 첨가해 준 것은 동일하나, 본 실험에서의 1mg/L 2,4-D와 5mg/L BA 혼용 첨가구에서 관찰된 현저히 높은 68%의 재분화율에 비해서 훨씬 낮은 재분화율을 나타낸 것이다. 따라서 이탈리아 라이그래스의 효율적인 재분화를 위한 적정 성장조절물질 첨가 조합은 저농도의 2,4-D와 고농도의 BA를 배지에 첨가하여 배양하는 것이 68% 이상의 높은 재분화 효율을 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

3. 광조건과 기타 배지 첨가물질에 따른 배양효과

이탈리아 라이그래스의 성숙종자로부터 캘러스 유도시에 광조건에 따른 배양효율의 차이를 조사하기 위하여, 살균된 종자를 5mg/L의

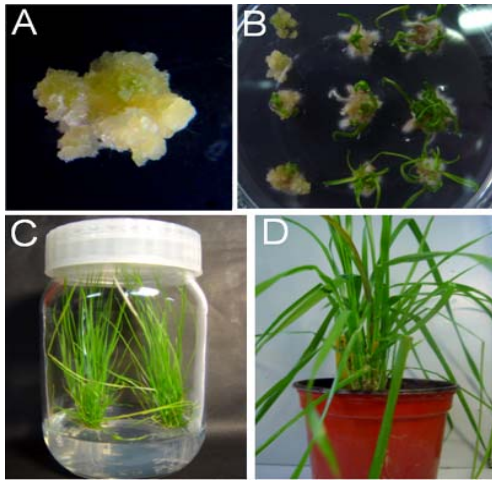


Fig. 1. Plant regeneration from seed-derived callus of Italian ryegrass. A, Embryogenic callus induced from mature seeds cultured on the callus induction medium; B, Plant regeneration from embryogenic calli in the regeneration medium; C, Regenerated plantlets cultured in the rooting medium; D, Whole plants grown in pots under green house.

2,4-D가 첨가된 캘러스 유도배지에 치상하여 암상태 또는 광상태에서 배양한 후, 캘러스 유도율과 식물체 재분화율을 조사한 결과, Table 4와 같았다. 성숙종자로부터 캘러스 유도시에는 세 가지 품종 모두 암상태에서 배양하는 것이 광상태에서 배양하는 것보다 캘러스 유도율이 높게 나타났으며, 이들 각각의 캘러스를 재분화배지에 계대배양했을 때 식물체 재분화율도

암상태에서 배양한 캘러스가 광상태에서 배양한 것보다 7~9% 정도 높은 효율을 나타내었다. 암상태에서 배양한 캘러스의 경우 유백색의 치밀한 조직의 재분화능이 높은 캘러스의 형성율이 높았으나(Fig. 1A), 광상태에서 배양한 성숙종자의 경우, 캘러스로 탈분화되는 비율보다 종자로부터 정상적으로 발아되어 유식물로 분화되는 개체가 많이 관찰되었다. 이러한 광조건에 따른 분화양상의 차이가 캘러스 유도율과 재분화율에 영향을 미친 것으로 판단된다.

한편 성숙종자로부터 캘러스 유도 및 식물체 재분화시에 각각의 배지에 첨가되는 배지첨가물질의 종류와 농도에 따른 배양효과를 조사한 결과는 Table 5와 같다. 예비실험으로부터 여러 가지 배지 첨가물질 중 효과적이었던 casein hydrolysate와 L-proline을 단용 또는 혼용처리한 후, 캘러스 유도율과 식물체 재분화율을 비교해 보았다. 그 결과 세 가지 품종 모두 무첨가구에 비해 단용처리구의 경우 캘러스 유도율과 식물체 재분화율이 증가되었으며, 두 가지 첨가물질을 동시에 첨가해주었을 때 가장 높은 캘러스 유도율과 식물체 재분화율을 나타내었다. 배지 첨가물질인 casein hydrolysate와 proline의 첨가가 화분과 사료작물의 미숙배 또는 성숙종자로부터 캘러스 유도와 식물체 재분화에 효과적이라는 보고가 툴페스큐(Bai와 Qu, 2001), 켈터키 블루그래스(Griffin과 Dibble, 1995)와 밀(Zale 등, 2004) 등에서도 보고되었다.

본 실험을 통하여 이탈리아 라이그래스의 세

Table 4. Effect of light on callus induction from mature seed and plant regeneration in Italian ryegrass

Cultivars	Light condition	Callus induction(%) ^a	Plant regeneration(%) ^b
Jeanne	light	57.1	56.2
	dark	67.6	65.3
Florida-80	light	42.1	40.6
	dark	54.3	49.5
Metro	light	40.7	31.2
	dark	56.7	38.4

^a Dehusked mature seeds were placed on MS medium containing 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 and 5 g/L gelrite, and cultured for 5 weeks.

^b Calli were transferred to the plant regeneration medium (N6 medium containing 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 and 5 g/L gelrite), and cultured under 16h light/8h dark condition for 6 weeks.

Table 5. Effect of medium supplements on mature seed culture of Italian ryegrass

Cultivars	Medium supplements	Callus induction (%) ^a	No. of callus cultured ^b	Plant regeneration (%)
Jeanne	None	51.8	100	51.3
	1 g/L Casein hydrolysate	53.9	100	58.4
	500 mg/L L-proline	58.7	100	60.1
	1 g/L Casein hydrolysate + 500 mg/L L-proline	67.5	100	69.7
Florida-80	None	47.5	100	30.4
	1 g/L Casein hydrolysate	53.1	100	33.8
	500 mg/L L-proline	52.3	100	38.7
	1 g/L Casein hydrolysate + 500 mg/L L-proline	61.7	100	45.6
Metro	None	43.2	100	25.3
	1 g/L Casein hydrolysate	45.2	100	28.3
	500 mg/L L-proline	47.8	100	32.1
	1 g/L Casein hydrolysate + 500 mg/L L-proline	52.4	100	37.5

^a Callus cultured on MS medium containing each medium supplements with 5 mg/L 2,4-D, 1 mg/L thiamine-HCl, 30 g/L sucrose and 5 g/L gelrite, and cultured for 5 weeks.

^b Calli were transferred to N6 medium containing each medium supplements with 1 mg/L 2,4-D, 5 mg/L BA, 1 mg/L thiamine-HCl, 30 g/L sucrose and 5 g/L gelrite, and cultured for 6 weeks.

가지 품종의 성숙종자로부터 단기간 내에 고빈도로 재분화 식물체를 획득할 수 있는 효율적인 조직배양 조건을 확립하였다. 가장 재분화 효율이 높았던 Jeanne 품종의 경우, 성숙종자를 캘러스 유도배지에서 배양한 결과, 배양 3일째부터 캘러스가 형성되기 시작하여 5주 후에는 67% 이상 배발생 캘러스가 형성되었으며(Fig. 1A), 재분화 배지에 계대배양한 후 6주 정도에는 약 68% 이상의 높은 빈도로 신초가 재분화되었다(Fig. 1B). 재분화된 신초는 rooting 배지에서 1주간 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 pot에 이식하여 재배할 수 있었다 (Fig. 1C, D). 이와 같은 각각의 품종에 대한 효율적인 이탈리아 라이그래스의 재분화 시스템은 고품질 또는 환경스트레스 내성 유전자의 도입에 의한 신품종 형질전환 사료작물 개발 등에 있어서 유용하게 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

IV 요약

이탈리안 라이그래스의 최적 조직배양조건을 확립하기 위하여 'Jeanne', 'Florida-80', 'Metro' 세 가지 품종의 성숙종자로부터 배발생 캘러스

유도 및 캘러스로부터 식물체 재분화에 미치는 배지 첨가물질의 영향을 조사하였다. 성숙종자로부터 배발생 캘러스 유도시에 첨가되는 식물생장조절물질로는 모든 품종에서 2,4-D의 경우 5mg/L의 농도로 첨가된 MS 배지에서 배발생 캘러스가 가장 높은 빈도로 유도되었으며, dicamba의 경우 7mg/L의 농도로 첨가해주었을 때 배발생 캘러스의 유도율이 가장 높았다. 배발생 캘러스로부터 식물체 재분화는 배발생 캘러스를 1mg/L 2,4-D와 5mg/L BA가 첨가된 N6 배지에서 배양했을 때 가장 높은 식물체 재분화율을 나타내었다. 광조건에 따른 배양효율의 차이는 모든 품종에서 배발생 캘러스의 유도시에 암상태에서 배양한 캘러스로부터 식물체 재분화율이 광상태에서 배양한 캘러스의 재분화율 보다 약 10%정도 높게 나타났다. Casein hydrolysate와 L-proline의 경우 동시에 배지에 혼용 첨가해 주었을 때 배발생 캘러스 유도율과 식물체 재분화율이 증가되었다. 본 연구를 통하여 확립된 효율적인 배발생 캘러스의 유도 및 식물체 재분화체계는 분자육종을 통한 신품종 이탈리아 라이그래스의 개발에 유용하게 이용되어질 수 있을 것이다.

V 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 연구비 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

VI 인용 문헌

- Bai, Y. and 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. and Qu, R. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: effect of 6-BA in callus induction medium. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 60:113-120.
- Cho, M. J., Jiang, W. and Lemaux, P. G. 1998. Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. Plant Sci. 138:229-244.
- Choi, G. J., Rim, Y. W., Kim, K. Y., Choi, S. H., Sung, B. R., Kim, W. H., Shin, D. E. and Lim, Y. C. 2000. A cold-tolerant and high-yielding Italian ryegrass(*Lolium multiflorum* Lam.) new variety 'Hwasan 101'. J. Kor. Grassl. Sci. 20:1-6.
- Chu, C. C., Wang, C. S., Sun, C. C., Hsu, C., Yin, K. C., Chu, C. Y. and Bi, F. Y. 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, J. P. M. and 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* Lam. Plant Sci. 57:165-172.
- Dale, P. J. 1980. Embryoids from cultured immature embryos of *Lolium multiflorum*. Pflanzen Physiol. 100:73-77.
- Dale, P. J., Thomas, E., Brettell, R. I. S. and Wernicke, W. 1981. Embryogenesis from cultured immature inflorescences and nodes of *Lolium multiflorum*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 1:47-55.
- Dalton, S. J., Betanny, A. J. E., Timms, E. and Morris, P. 1999. Co-transformed, diploid *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum* and *Lolium temulentum perenne* plants produced by microprojectile bombardment. Plant Cell Rep. 18:721-726.
- Forster, J. W. and Spangenberg, G. 1999. Forage and turf grass biotechnology: principles, methods and prospects. In: Setlow, J. K.(Ed.), Genetic engineering: principles and methods, Vol. 21, Kluwer Academic Publishers, New York, p. 191.
- Griffin, J. D. and Dibble, M. S. 1995. High frequency plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass(*Poa pratensis* L.). Plant Cell Rep. 14:721-724.
- Hides, D. H., Kute, C. A. and Marshall, A. H. 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. and 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, H. S., Kang, K. M. and 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.
- McKersie, B. D. 1997. Improving forage production systems using biotechnology. In: McKersie, B. D. and Brown, D. C. W.(Eds), Biotechnology in Agriculture Series, No. 17, CAB International, Wallingford, p. 3.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revise medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Park, B. H., Park, B. S. and Kang, J. H. 1987. A comparison between diploid and tetraploid cultivars of *Lolium multiflorum* Lam. J. Kor. Grassland Sci. 7:135-139.
- Rim, Y. W., Kim, K. Y., Choi, K. J., Sung, B. R. and Shin, J. S. 2000. Callus induction from seeds of Italian ryegrass and plant regeneration. J. Kor. Grassland Sci. 20:25-30.
- Spangenberg, G., Wang, Z. Y. and 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, p. 192.
- Van Wijk, A. J. P., Boonman, J. G. and Rumball, W. 1993. Achievements and perspectives in the breeding of forage grasses and legumes. In: Baker, M. J.(Eds), Grasslands for our world, SIR, Wellington, p. 116.
- Ye, X., Wang, Z. Y., Wu, X., Potrykus, I. and Spangenberg, G. 1997. Transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. Plant Cell Rep. 16:379-384.
- Zale, J. M., Borchardt-Wier, H., Kidwell, K. K. and Steber, C. M., 2004. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 76:277-281.
- Zhong, H., Srinivasan, C. and Sticklen, M. B. 1991. Plant regeneration via somatic embryogenesis in creeping bentgrass. Plant Cell Rep. 10:453-456.

(접수일자 : 2004. 2. 16. / 채택일자 : 2004. 3. 25.)