

버즈풋 트레포일 및 이탈리아 라이그라스의 치사온도 결정

김기용 · 최영진 · 임용우 · 성병렬 · 이상진 · 양주성* · 한범수** · 김종범** · 이병현***

Determination of Heat Killing Temperature of Birdsfoot trefoil and Italian ryegrass

Ki-Yong Kim, Young Jin Choi, Yong Woo Rim, Byung Ryul Seong, Sang Jin Lee,
Joo-Sung Yang*, Bumsoo Hahn**, Jongbum Kim** and Byung-Hyun Lee***

ABSTRACT

To determine lethal temperature of birdsfoot trefoil(BFT) and italian ryegrass(IRG) at heat-stressed conditions, seedlings grown in a small pots for 4 weeks were subjected to different temperature regimes of heat treatment. No apparent damage was observed BFT and IRG were treated at 45, 50 or 60°C for 1 h. And also heat treatments at 60, 65 and 70°C for 1 h, both of them were withered and showed damage symptom on their leaves but it was not lethal conditions for the whole plants. By contrast, most of plants were prominently withered within one day after heat treatment at 80°C/60min. When BFT was exposed to 80°C/60 min, they were died within 6 days but there was found that new shoots were regenerated from the plants that had been treated at 80°C within 55 min. IRG was also died within 2 days that exposed to 80°C/20 min but there was found that new shoots were regenerated from the plants that had been treated at 80°C within 15 min. These results indicate that heat killing temperatures of BFT and IRG plants are 80°C/60 min an 80°C/20 min respectively. Simple viability assay system established in this study will be useful for selection and characterization of heat-tolerant transgenic BFT and IRG plants.

(Key words : Birdsfoot trefoil, Italian ryegrass, Thermotolerance, Heat killing temperature)

I. 서 론

우리나라에서 사료작물의 생명공학 관련 연구들은 2000년대 이전에는 거의 전무하였으나, 2000년대에 접어들면서 매우 활발하게 진행되고 있다(Lee 등, 2000; Kim 등, 2001d; Kim 등, 2002a; Kim 등, 2003a; Kim 등, 2003b). 버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.)의 경우,

생명공학 관련 연구로는 Kim 등(1999), Kim 등(2001b) 및 Kim 등(2001c)의 논문이 발표되었으며, 국외에서 발표된 논문으로는 Robbins 등(1998)이 버즈풋 트레포일에 dihydroflavonol reductase의 역서열 (antisense sequences)을 도입한 연구가 있다. 이탈리아 라이그라스 (*Lolium multiflorum* Lam.)의 연구는 대부분 합성육종 및 선발육종 방법으로 수행되어 왔다. 그 결과,

“이 논문은 농촌진흥청 바이오그린21사업 연구비 지원에 의하여 수행된 결과임.”

축산연구소 (National Livestock Research Institute, Suwon 441-350, Korea).

* 성균관대학교 (Dept. of Genetic Engineering, Sung Kyun Kwan Univ., Suwon 440-746, Korea)

** 농업생명공학연구원 (National Institute of Agricultural Biotechnology, Suwon 441-707, Korea).

*** 경상대학교 동물자원과학부 (Division of Animal Sci. & Tech., Gyeongsang Natl. Univ., Jinju 660-701, Korea).

Corresponding author : Ph.D. Ki-Yong Kim, Tel: +82-31-290-1756, Fax: +82-31-290-1775, E-mail: kimky77@rda.go.kr

국내에서는 내한성에 강한 화산 101호 (Choi 등, 2000)을 비롯해 화산 102호 (Choi 등, 2001a), 화산 103호 (Choi 등, 2001b) 등이 개발되었고, 조숙성 이탈리아 라이그라스의 품종출원이 임박해 있다. 이탈리아 라이그라스의 생명공학 관련 연구로는 Rim 등 (2000); Kim 등 (2001a); Kim 등 (2002b); Kim 등 (2002c)의 논문이 발표되었다.

한국에서는 국가 주도의 ‘바이오그린21사업’을 추진하면서 벼, 발작물, 사료작물 및 동물 등의 생명공학분야 연구에 막대한 예산을 투입하고 있다. 작물 분야의 연구에서 가장 많은 연구비가 투입되고 있는 것은 재해내성 및 질병 저항성 품종 육성 분야이다. 또한 2003년부터 두과목초에서 가축질병 예방백신을 생산하기 위한 연구가 본격화되고 있다 (김 등, 2004). 이러한 형질전환 작물들이 개발되기 위해서는 DNA 수준의 확인뿐만 아니라 실질적인 포장 재배시험에서 확인 작업이 수행되어야 한다.

본 연구팀은 고온내성 유전자 등을 도입한 신품종 형질전환 사료작물이 개발되었을 경우를 대비하여, 실험실 조건에서 사료작물의 고온내성 정도를 유식물체를 이용하여 간편히 검정할 수 있는 효율적인 검정체계를 확립하고자, 국내에서 많이 재배 이용되고 있는 여러 가지 종류의 식물체 및 사료작물에 대해 치사온도를 결정하는 실험들을 진행하여 왔다. 알팔파 (Kim 등, 2004a) 및 오차드그라스 (Kim 등, 2004b)의 치사온도 결정은 이미 논문으로 발표되었다. 본 연구에서는 버즈풋 트레포일과 이탈리아 라이그라스를 어느 정도의 고온에서 얼마간 처리했을 때 죽게 되는지를 조사하여 정확한 치사온도를 결정하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시품종 및 재배

버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.)은 “Au

Dewey” 품종을, 이탈리아 라이그라스 (*Lolium multiflorum* Lam.)는 국내 육성품종인 화산 101호 (Choi 등, 2000)를 시험재료로 공시하였다. 종자를 Petri dish에서 발아시켜 작은 화분에 10 개체씩 이식 후 생장실에서 4주 동안 재배하였다. 생장실의 온도는 20℃로 고정하고, 16시간의 광주조와 8시간의 암 조건이 되도록 조절하였다.

2. 열처리 조건

고온처리에 따른 치사온도를 결정하기 위해, 파종 후 4주령 된 버즈풋 트레포일 (BFT) 및 이탈리아 라이그라스 (IRG) 식물체를 준비하였다. 열처리 온도는 45, 50, 55, 60, 65, 70 및 80℃로 7처리를 두었으며, 열처리 시간은 5분부터 60분까지 5분 간격으로 12처리를 두었다. 열처리는 각 온도별로 설정한 배양기에서 처리 시간에 맞추어 실시하였다.

3. 생육조사

각 온도 및 시간별로 열처리한 식물체를 생장실 (26~28℃)에서 배양하면서 일주일 동안 매일 생육조사를 실시하였다. 각각의 처리에 따른 식물체의 상태는 육안으로 관찰하였으며, 식물체 상태에 따라 DI (Damage index)를 1~9로 표시하였다 (1, 영향을 거의 받지 않은 정상인 상태; 3, 잎과 줄기가 시들어 처진 상태; 5, 줄기 끝 부분부터 줄기와 잎이 1/3~1/2 정도 고사한 상태; 7, 줄기와 잎이 1/2 이상 고사하고 나머지 부분도 심하게 시든 상태; 9, 열처리에 의해 식물체가 죽은 상태).

III. 결과 및 고찰

1. 45, 50 및 55℃에서 처리시간별 생육상태

버즈풋 트레포일 (BFT) 및 이탈리아 라이그

라스 (IRG)를 45, 50 및 55°C에서 5분 간격으로 60분까지 처리한 결과, 온도 및 시간에 따른 외관상의 식물체 손상은 거의 없었다 (Table 1). 지금까지 보고 된 치사온도 관련 자료로는 담배 (*Nicotiana tabacum* L.)는 50°C/15분 (Kim 등, 1997), 알팔파 (*Medicago sativa* L.)는 80°C/50분 (Kim 등, 2004a), 오차드그라스 (*Dactylis glomerata* L.)는 80°C/55분 (Kim 등, 2004b)이었다. 오차드그라스의 경우에 55°C/60분 처리에서 외관상으로 영향을 거의 받지 않았는데 (Kim 등 2004b), BFT 및 IRG에서도 유사한 결과를 나타내었다. 45, 50 및 55°C의 온도조건에서 60분까지 처리한 1차 실험에서 치사온도를 결정할 수 없었으므로, 온도를 더 높여 2차 실험을 실시하였으며, 각 처리온도에서 60분미만으로 처리한 데이터는 생략하였다.

2. 60, 65 및 70°C에서 처리시간별 생육상태

BFT 및 IRG를 60, 65 및 70°C에서 5분 간격으로 60분까지 처리한 결과 (Table 1), 60°C/60분 처리에서 잎이 약간 시든 현상이 있었으나, 식물체 손상은 거의 없는 상태였다. 65°C/60분 처리에서 BFT는 60°C/60분 처리보다 약간 더 시들었으며 (DI = 3), IRG는 잎 끝 부분부터 1/3~1/2 정도 고사하였다 (DI = 4). 70°C/60분

처리에서 BFT는 줄기 끝 부분부터 줄기와 잎이 1/3 ~ 1/2 정도 고사하는 현상이 나타났으며 (DI = 5), IRG는 줄기 이외의 잎 부분이 거의 고사한 상태였다 (DI = 8).

하지만 60, 65 및 70°C의 온도조건에서 60분까지 처리한 2차 실험에서도 BFT 및 IRG의 치사온도는 결정할 수 없었으므로, 온도를 10°C 더 높여 3차 실험을 실시하였으며, 역시 각 처리온도에서 60분미만으로 처리한 데이터는 생략하였다.

3. 80°C에서 처리시간별 생육상태

열처리 온도를 10°C 더 높여 80°C에서 5분부터 60분까지 5분 간격으로 BFT 및 IRG를 처리한 결과 (Table 2), BFT는 처리 후 1일 이내에 80°C/60분 및 55분 처리에서 잎이 심하게 시든 현상이 나타났다 (DI = 7). 처리 후 4일에는 40분 및 45분 처리에서 심하게 시들었으며 (DI = 7), 처리 후 6일 이후부터 60분 처리에서 모두 죽었고 (DI = 9), 처리 후 7일부터는 완전히 죽지 않은 식물체의 경우 새로운 shoot가 재생됨을 확인하였다.

IRG는 처리 후 1일 이내에 80°C/20분 처리에서 거의 죽어가는 현상이 나타났다 (DI = 8). 처리 후 2일에는 80°C/25분 처리에서 모두 죽

Table 1. Effects of high temperature on heat damage of birdsfoot trefoil and italian ryegrass

Observation (1~9)*	Treatment		Temperature of heat treatment for 60 min (°C)													
			45		50		55		60		65		70		80	
	BFT	IRG	BFT	IRG	BFT	IRG	BFT	IRG	BFT	IRG	BFT	IRG	BFT	IRG	BFT	IRG
1 day later	1	1	1	1	1	2	2	3	2	3	3	5	7	9		
2 days later	1	1	1	1	1	2	2	3	2	3	3	5	7	9		
3 days later	1	1	1	1	1	2	2	3	2	3	3	6	8	9		
4 days later	1	1	1	2	1	2	2	3	2	3	4	6	8	9		
5 days later	1	1	1	2	2	2	2	3	2	4	4	7	8	9		
6 days later	1	1	1	2	2	2	2	3	3	4	5	8	9	9		
7 days later	1	1	1	2	2	2	2	3	3	4	5	8	9	9		

* Damage index: 1, normal; 9, death; BFT, Birdsfoot trefoil; IRG, Italian ryegrass.

Table 2. Determination of heat killing temperature of italian ryegrass and birdsfoot trefoil

Observation (1~9)*	Treatment		Heat treated time at 80°C (min)									
	Italian ryegrass					Birdsfoot trefoil						
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
1 day later	2	3	2	3	8	4	5	5	6	6	7	7
2 days later	2	3	2	3	9	4	5	6	6	6	7	7
3 days later	2	3	2	4	9	4	6	6	6	7	7	8
4 days later	3	4	2	4	9	5	6	7	7	7	8	8
5 days later	3	4	2	4	9	5	6	7	7	7	8	8
6 days later	3	4	2	4	9	5	6	7	7	7	8	9
7 days later	3	4	2	4	9	5	6	7	7	7	8	9

* Damage index: 1, normal; 9, death.

었으며 (DI = 9), 처리 후 3일에는 20분 처리에서 모두 죽었으나, 15분 이하의 처리에서는 7일까지 죽은 개체를 발견할 수 없었다. 이탈리아 라이그라스에서도 처리 후 7일부터는 완전히 죽지 않은 식물체의 경우 새로운 shoot가 재생됨을 관찰할 수 있었다. 또한 80°C/15분 처리와 80°C/20분 처리를 비교해 보면, 5분을 더 처리한 80°C/20분 처리에서는 급격하게 심한 영향을 받는 것으로 나타났다.

결론적으로 BFT 및 IRG의 치사온도는 각각 80°C/60분 및 80°C/25분으로 결정되었다. 앞으로 고온내성 및 재해저항성 유전자를 도입한 형질전환 BFT 및 IRG가 개발될 경우, 1차적으로 실험실 조건에서 고온내성 정도를 조사할 수가 있게 되었으며, 이 때 각각의 치사온도 (BFT, 80°C/60분; IRG, 80°C/20분)의 열처리 시간보다 짧은 조건에서 (BFT, 80°C/40분~50분; IRG 80°C/15분) 고온내성 정도를 조사할 수 있

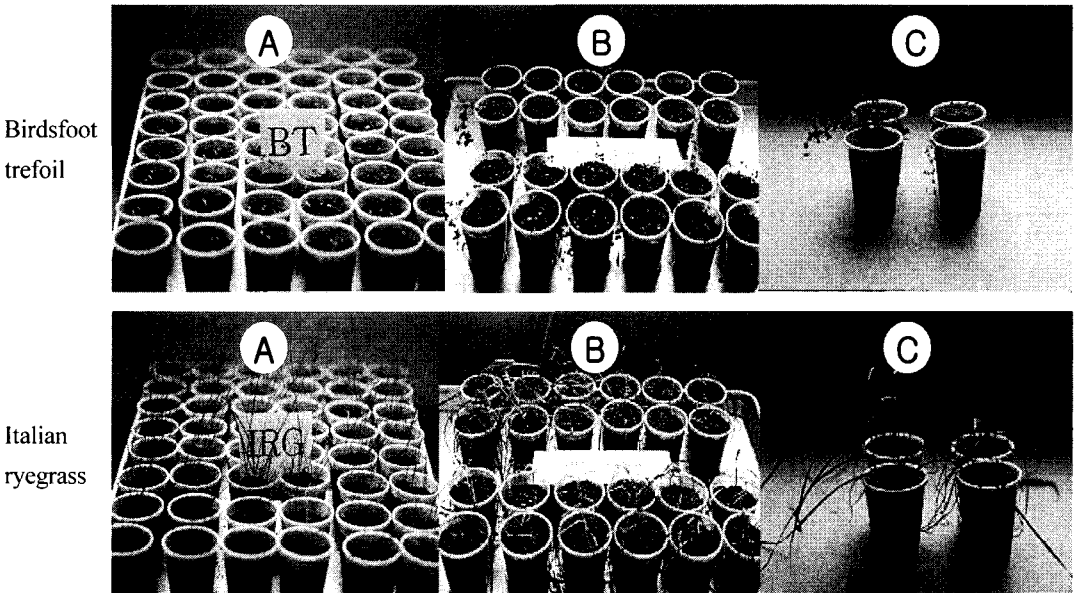


Fig. 1. Determination of heat killing temperature of birdsfoot trefoil and italian ryegrass.

을 것으로 판단된다.

두과 목초인 알팔파 (80°C/50분; Kim 등, 2004a)와 버즈풋 트레포일 (80°C/60분)의 치사 온도, 화분과 목초인 오차드그라스 (80°C/55분; Kim 등, 2004b)와 이탈리아 라이그라스 (80°C/25분)의 치사온도를 비교해 보았을 때, 이탈리아 라이그라스의 고온내성이 가장 약한 것으로 나타났다. 이 4초종의 추위에 대한 내성에서도 이탈리아 라이그라스가 가장 약한 것은 흥미있는 점이라 할 수 있다.

Fig. 1은 BFT 및 IRG의 치사온도를 결정하는 사진으로서, A는 BFT 및 IRG를 파종하여 생장실에서 4주 동안 재배한 상태이며, B는 A 식물체를 80°C에서 5분 간격으로 60분까지 처리한 상태에서 7일째 생육상태를 보여주고 있다. 시간별로 2 pot씩 처리하였으며, 사진 B의 좌후방이 5분 처리, 우후방이 30분 처리, 좌전방이 35분 처리, 우전방이 60분 처리한 것이다. 처리시간이 증가함에 따라 열처리에 따른 영향을 많이 받았음을 알 수 있다. BFT 사진 C의 우측은 BFT 치사온도인 80°C/60분 처리한 7일째의 식물체를 좌측의 열처리하지 않은 식물체와 비교한 사진이다. IRG 사진 C도 마찬가지로 우측은 IRG 치사온도인 80°C/20분 처리한 7일째의 식물체를 좌측의 열처리하지 않은 식물체와 비교한 사진이다.

IV. 적 요

버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.) 및 이탈리아 라이그라스 (*Lolium multiflorum* Lam.)의 치사온도를 결정하기 위하여, 각각 “Au Dewey”와 국내 육성품종인 “화산 101호” 품종을 시험재료로 하여 종자를 Petri dish에서 발아시켜 작은 화분에 10 개체씩 이식, 생장실에서 4주간 재배하였다. 45, 50 및 55°C에서 처리한 경우에는 60분간 처리했을 때에도 거의 식물체 손상이 없었다. 60°C/60분 처리에서는 잎이 약간 시든 듯한 현상이 있었으며, 65°C/60분 처리

에서도 식물체의 심한 손상은 나타나지 않았다. 70°C/60분 처리에서 BFT의 일부에서 잎이 조금 마른 현상이 나타났고, IRG는 줄기 이외의 잎 부분이 거의 마른 상태가 되었지만 치사 온도에는 도달하지 않았다. 80°C에서 처리한 BFT는 처리 후 1일 이내에 60분 처리에서 잎이 심하게 시든 현상이 나타났다. 처리 후 6일에는 60분 처리에서 모두 죽었으며, 55분 이하의 처리에서는 새로운 shoot가 재생됨을 확인하였다. 80°C에서 처리한 IRG는 처리 후 1일 이내에 20분 이상 처리에서 거의 죽어가는 현상이 나타났다. 처리 후 7일에는 20분 이상의 처리에서 모두 죽었으며, 15분 이하의 처리에서는 심한 영향을 받지 않았으며 새로운 shoot가 재생됨을 확인하였다.

결론적으로 버즈풋 트레포일의 치사온도는 80°C/60분, 이탈리아 라이그라스의 치사온도는 80°C/20분으로 결정되었다. 다른 연구에서 형질 전환 버즈풋 트레포일 및 이탈리아 라이그라스를 만들 경우, 형질전환체의 고온 내성을 간단하게 검정하는 방법으로 이상의 치사온도 결과를 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 인 용 문 헌

1. 김종범, 양주성, 성병렬, 김기용, 권준현. 2004. 가축 바이러스질병 예방백신 생산 사료작물 소재 개발. 2004년도 바이오그린21사업 연구개발계획요약. 농촌진흥청. p.801-807.
2. 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.
3. Choi, G.J., Y.W. Rim, Y.C. Lim, K.Y. Kim, B.R. Sung, M.J. Kim, G.J. Park and S.R. Kim. 2001a. Growth characters and productivity of new italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) variety “Hwasan 102”. J. Korean Grassl. Sci. 21(3):157-162.
4. Choi, G.J., Y.W. Rim, Y.C. Lim, K.Y. Kim, B.R. Sung, S.H. Choi and G.J. Park. 2001b. Growth

- characters and productivity of new italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) variety "Hwasan 103". J. Korean Grassl. Sci. 21(3):163-168.
5. Kim, K.Y., M.S. Chung and J. Jo. 1997. Acquisition of thermotolerance in the transgenic plants with BcHSP17.6 cDNA. J. Korean Grassl. Sci. 17(4):379-386.
 6. Kim, K.Y., Y.W. Rim, K.J. Choi and B.R. Sung. 1999. Callus induction from seeds of birdsfoot trefoil and plant regeneration on BOi2Y medium. J. Korean Grassl. Sci. 19(4):303-308.
 7. Kim, K.Y., G.J. Choi, B.R. Sung, Y.W. Rim, G.J. Park, Y.S. Jang and J. Jo. 2001a. Root initiation in cut italian ryegrass stems by treatment of IBA. J. Korean Grassl. Sci. 21(1): 31-34.
 8. Kim, K.Y., G.J. Choi, B.R. Sung, Y.W. Rim, Y.C. Lim, Y.S. Jang and W.H. Kim. 2001b. Root initiation in cut birdsfoot trefoil stems by treatment of IBA. J. Korean Grassl. Sci. 21(1): 35-38.
 9. Kim, K.Y., B.R. Sung, Y.W. Rim, G.J. Choi, Y.C. Lim, Y.S. Jang, E.S. Chung, W.H. Kim and J.G. Kim. 2001c. Transformation of birdsfoot trefoil by *BcHSP17.6* gene using *Agrobacterium tumefaciens*. J. Korean Grassl. Sci. 21(3):145-150.
 10. Kim, K.Y., B.R. Sung, Y.W. Rim, G.J. Choi, Y.C. Lim, Y.S. Jang, S. Seo, S.H. Yoon, G.J. Park and J. Jo. 2001d. Transformation of alfalfa by *BcHSP17.6* gene using *Agrobacterium tumefaciens*. J. Korean Grassl. Sci. 21(3):151-156.
 11. Kim, K.Y., Y.S. Jang, G.J. Choi, Y.W. Rim, G.J. Park, B.H. Lee, D. Son and J. Jo. 2002a. Molecular cloning of a cDNA encoding 17.6-kilodalton heat shock protein from *Brassica campestris* and its expression in *E. coli*. Korean J. Genetics 24(4):383-388.
 12. Kim, K.Y., K.M. Kang, E.K. Bae, I.A. Lee, Y.W. Rim, G.J. Choi, G.J. Park, D. Son and J. Jo. 2003a. Callus formation ratio and regeneration efficiency of orchardgrass varieties developed in Korea. J. Korean Grassl. Sci. 23(1):59-64.
 13. Kim, K.Y., K.M. Kang, G.J. Park, E.K. Bae, I.A. Lee, B.H. Lee, S.S. Kwak and J. Jo. 2003b. Examination of root induction ratio for regeneration of alfalfa by medium component. J. Korean Grassl. Sci. 23(2):95-100.
 14. Kim, K.Y., K.M. Kang, G.J. Choi, Y.W. Rim, Y.S. Jang, B.R. Sung, D. Son, B.H. Lee and J. Jo. 2002b. Production of new regenerated plant by anther culture of italian ryegrass. J. Korean Grassl. Sci. 22(3): 209-212.
 15. Kim, K.Y., 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. 2002c. Production of new regenerated plants by anther culture of the hybrids of italian ryegrass \times tall fescue. J. Korean Grassl. Sci. 22 (4):273-278.
 16. Kim, K.Y., K.M. Kang, B.R. Sung, M.J. Kim, Y.W. Rim, W.H. Kim, G.J. Park and B.H. Lee. 2004a. Determination of heat killing temperature of alfalfa (*Medicago sativa* L.). J. Korean Grassl. Sci. 24(1):21-24.
 17. Kim, K.Y., K.M. Kang, Y.W. Rim, G.J. Park, Y.C. Lim, S. Seo, D. Son and J. Jo. 2004b. Determination of heat killing temperature of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). J. Korean Grassl. Sci. 24(1):25-28.
 18. Lee, B.H., S.H. Won, H. Lee, K.Y. Kim and J. Jo. 2000. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of alfalfa using secondary somatic embryogenic callus. J. Korean Grassl. Sci. 20(1): 13-18.
 19. 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.
 20. Robbins, M.P., A.D. Bavage, C. Strudwicke and P. Morris. 1998. Genetic manipulation of condensed tannins in higher plants. II. Analysis of birdsfoot trefoil plants harboring antisense dihydroflavonol reductase constructs. Plant Physiol. 116(3):1133-1144.