

양초 (*Leymus chinensis* Trin.)의 체세포배발생에 의한 식물체 재분화

김명덕¹, 김 화^{1,3}, 박은준¹, 권석윤¹, 이행순², 곽상수^{1*}

한국생명공학연구원¹ 환경생명공학연구실, ²식물세포공학연구실, ³중국 대련민족대학 생물자원환경연구소

Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis of *Leymus chinensis* Trin.

Myoung Duck Kim¹, Hua Jin^{1,3}, Eun-Joon Park¹, Suk-Yoon Kwon¹, Haeng-Soon Lee², Sang-Soo Kwak¹

¹Laboratory of Environmental Biotechnology, ²Laboratory of Plant Cell Biotechnology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Eoeun-dong 52, Yusong, Daejeon 305-806, Korea

³Institute of Biological Resources and Environment Research, Dalian Nationalities University, China

ABSTRACT Chinese leymus (*Leymus chinensis* Trin.) is a perennial grass that is widely distributed at high pH sodic and arid soil in the northeastern Asia. An efficient regeneration system was established through somatic embryogenesis of mature seeds to understand its high adaptability to harsh environmental conditions on the basis of molecular biology. The calli were efficiently induced (about 70%) from mature seeds on MS medium supplemented with 1.5 mg/L 2,4-D. Somatic embryos were formed from the surface of embryogenic callus on MS medium supplemented with 2.0 mg/L kinetin and 0.5 mg/L NAA after 3 weeks of culture. Roots were induced from the shoot when transferred to MS medium without plant growth regulator for 1 week. Plant regeneration rate was 36% and regenerated plantlets were grown to normal mature plants in pot. An efficient plant regeneration system in this study will be useful for molecular breeding of *L. chinensis*.

Key words: Embryogenic callus, *Leymus chinensis*, plant regeneration, somatic embryo

서 론

급속한 산업화와 인구증가에 의한 지구규모의 생태계 파괴는 21세기 인류생존의 최대 사회문제로 대두되고 있다. 특히 무리한 개간과 가축의 방목 등에 의한 중국 사막화는 심각한 속도로 전개되고 있으며, 우리나라에 막대한 산업적 피해를 가져다주고 있어 이에 대한 다각적인 대응책이 시급히 요구되고 있다.

양초 (*Leymus chinensis* Trin.)는 중국, 시베리아, 몽골을 포함한 동북아시아의 건조 및 알칼리토양 (pH 8.5~11.5)에 널리 자생하는 다년생 화분과 식물이다. 특히 양초는 척박

한 환경에 비교적 잘 적응하며 사막화가 진전되고 있는 지역의 토양유실 및 황사발생을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 높은 단백질 함유 양질의 건조로 이용되고 있는 중요한 사료작물이다 (Jia 1987). 양 등 가축이 좋아하는 풀이라는 뜻의 양초는 사막화가 진전되는 지역에서 자생식물의 분포는 대규모 개간과 가축의 방목 등으로 크게 감소하는 추세이다 (Liu and Wang 1999). 특히 중국 길림성 서북지역으로 들어갈수록 토양의 알칼리화로 인한 사막화 현상이 매우 심각하여 초본식물도 생존할 수 없을 정도로 토양이 극심하게 황폐화되고 있다. 따라서 높은 알칼리토양과 건조지역에 잘 적응하는 양초의 우수한 환경적응성을 분자수준에서 규명하고 환경스트레스에 보다 잘 견디는 양초를 개발하는 일은 동북아시아의 생태계 보전 및 복원을 위해서 매우 중요한 일이다.

*Corresponding author Tel 042-860-4432 Fax 042-860-4608

E-mail sskwak@kribb.re.kr

최근 Jin (2004)은 양초에 높은 알칼리처리에서 약 1,500종의 EST를 분리하여 형질전환기술을 이용하여 개별 유전자의 기능을 규명하고 있다. 양초가 지닌 환경내성 유전자의 기능을 직접적으로 규명하기 위해서는 양초의 형질전환체계 구축이 무엇보다 중요하나, 아직까지 양초의 형질전환에 대한 연구는 보고된 바 없다. 양초의 형질전환 체계를 구축하기 위해서는 효율적인 재분화체계 확립이 요구된다. 양초의 조직배양에 대한 연구는 미성숙 배를 통한 식물체 재분화 (Liu et al. 2002), 미성숙 화서를 이용한 캘러스 형성 및 기관분화에 의한 식물체 재분화 (Liu et al. 2004)가 있다. 그러나 형질전환에 유용한 양초의 체세포배발생에 의한 식물체 재분화연구에 대한 보고는 없다. 국내에서는 최근 다년생 화분과 사료작물인 오차드그래스와 이탈리아인 라이그래스의 종자로부터 캘러스 유도 및 식물체 재분화에 관한 연구가 있으며 이를 이용하여 재해내성 형질전환 식물체 개발을 수행하고 있다 (Lee et al. 2003; Woo et al. 2004).

최근 분자유종에 의한 작물의 신종 개발이 전 세계적으로 확산되고 있으며 (Mckersie 1997; Spangenberg et al. 1998), 사료작물 및 목초에 도입하는 유전자로는 품질, 내병성, 환경스트레스 내성, 생장시기 조절관련 유전자 등이 이용되고 있다 (Forster and Spangenberg 1999). 저자의 연구팀에서는 복합 환경스트레스에 강한 농작물을 개발하기 위하여 산화스트레스 유도성 *SWPA2* promoter (Kim et al. 2003)를 개발하여 엽록체 항산화기구 대사조절에 관한 연구를 추진하고 있다 (Kwon et al. 2002). 최근 산화스트레스 유도성 *SWPA2* promoter 조절하에 CuZn superoxide dismutase와 ascorbate peroxidase를 엽록체에 모두 발현시킨 감자와 고구마를 개발하여 산화스트레스 및 온도스트레스에 강한 내성이 있음을 확인하였다 (Lim et al. 2004; Tang 2005).

따라서 본 연구에서는 양초의 환경적응성 규명 및 복합 환경스트레스 내성을 지닌 형질전환 양초를 개발하기 위하여 일차적으로 체세포배발생에 의한 효과적인 식물체 재분화 체계를 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 종자살균

실험에 사용한 양초 (*Leymus chinensis* Trin.) 종자는 2003년 중국 흑룡강성 Anda에서 채종한 것이다. 종자살균은 Liu 등 (2002)의 방법에 준하여 종피를 제거하고 70% ethanol에서 1분간 교반하면서 살균한 후, 5% sodium hypochlorite 용액에서 30분간 교반하면서 표면살균 하였다. 살균한 종자는 멸균

수로 5회 세정한 후, 멸균된 filter paper에 옮겨 물기를 제거하고 성숙배를 분리하여 실험재료로 사용하였다.

캘러스 유도

캘러스 유도는 다양한 농도의 2,4-D (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/L), 1.0 mg/L thiamine-HCl, 2.0 mg/L glycine, 100 mg/L myo-inositol, 30 g/L sucrose 및 4 g/L gelrite가 함유된 MS배지 (Murashige and Skoog 1962)를 사용하였다. 기내에서 10일 동안 발아시킨 잎절편 (1 cm), 살균된 종자와 종자로부터 분리된 성숙배를 각각 12개씩 3반복으로 24±2°C의 생장실에서 암조건으로 6주간 배양하였다.

체세포배발생

체세포배는 해부현미경으로 외부형태적인 관찰을 통해 선발된 배발생 캘러스를 1.0 mg/L 2,4-D가 포함된 MS배지에서 4주 간격으로 2회 이상 계대배양하여 체세포배를 유도하였다. 배양은 24±2°C의 생장실에서 암조건으로 실시하였다.

식물체 재분화

성숙종자 유래의 배발생 캘러스로부터 식물체 재분화를 위한 생장조절물질의 종류와 농도를 조사하기 위한 재분화배지는 kinetin (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L)과 NAA (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L)가 혼용하여 첨가된 MS배지를 사용하였다. 24±2°C의 생장실에서 16 h light/8 h dark 조건에서 4주간 배양한 다음 동일한 새 배지에 계대하여 4주간 배양하여 각각의 처리구에서 형성된 1 cm 이상으로 자란 shoot를 재분화 개체로 조사하였다. 재분화된 shoot는 1/2 MS배지에 이식하여 뿌리발생을 유도하여 완전한 식물체로 분화시킨 후, 원예용상토 (Bio-media Co., Ltd)에 이식하여 온실에서 재배하였다.

결과 및 고찰

캘러스 유도 및 배발생 캘러스 선발

기내 배양을 통한 캘러스의 유도는 식물의 종에 따라, 또는 식물체 내에서도 배양에 이용되는 조직부위 및 배양조건과 방법에 따라 캘러스 유도 양상이 크게 다른 것으로 알려지고 있다 (Binh and Heszky 1990; Data et al. 1990). 본 실험에서는 양초의 잎 절편체와 종자 그리고 성숙배로부터 캘러스

형성에 미치는 성장조절제의 효과를 배양 6주 후에 조사하였다. 캘러스 형성은 1.5 mg/L 2,4-D가 단독 첨가된 암 조건에서 70%로 가장 높았다 (Figure 1). 낮은 농도의 2,4-D (0.5, 1.0 mg/L)가 첨가된 배지에서 형성된 캘러스는 수분이 많고 투명하며 구성세포간 부착력이 적어 쉽게 부서지는 비배발생 캘러스가 많이 형성되었다. 높은 농도의 2,4-D (1.5, 2.0, 2.5 mg/L)가 첨가된 배지에서는 처음에는 우유빛 캘러스가 발생되기 시작하여 배양 4주 후부터는 연한 노란빛의 표면이 단단하고 광택이 있으면서 nodular한 배발생 캘러스 (Figure 2A)가 증식되어 외부형태적인 측면에서 구별되는 특징을 가지고 있었다 (Liu et al. 2000; 2004). 선발된 배발생 캘러스와 비배발생 캘러스를 재분화배지로 옮겼을 때 비배발생 캘러스의 경우 뿌리의 형성을 보여 주었다. 이와 같은 결과는 두 가지 세포군의 외적인 특성과 재분화율에 있어서의 차이, 그리고 비배발생 캘러스의 기관분화와 같은 재분화 특성에 관한 보고들과 일치하였다 (Sato et al. 1986; Feirer and Simon 1991; Liu et al. 2002). 또한, 유럽 및 아시아의 온대지역에 분포하는 사료작물인 이탈리아 라이그래스의 조직배양에 있어서 2,4-D의 첨가가 다른 종류의 auxin 첨가에 비해 배발생 캘러스 유도에 있어서 보다 효과적이라는 결과가 본 연구결과와 유사하였다 (Creemers-Molenaar et al. 1988; Kumlehn and Nitzsche 1995; Rim et al. 2000; Lee et al. 2001; Woo et al. 2004).

체세포배발생과 식물체 재분화

외부형태적인 관찰을 통해 선발된 배발생 캘러스는 24 ± 2°C의 생장실에서 암조건으로 1.0 mg/L 2,4-D가 포함된 MS 배지에서 4주 간격으로 2회 이상 계대배양함으로써 체세포배를 유도할 수 있었다. 식물조직배양에서 체세포배는 절편체

에서 캘러스가 형성된 다음에 발생되거나 절편체의 조직에서 직접 발생된다. 절편체의 조직에서 직접 발생된 경우는 배양체가 배형성능을 이미 지니고 있는 것으로 알려져 있고, 이러한 배형성능은 절편체의 성장단계나 부위 등에 따라 영향을 받는 것으로 보고되어 있다 (Lu and Vasil 1982; Conger et al. 1983; Wang et al. 1984). 종자유래 형성된 배발생 캘러스를 NAA와 kinetin의 농도를 각각 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L로 하여 24 ± 2°C의 생장실에서 16 h light/8 h dark 조건에서 배양하여 이들의 식물성장조절제의 농도에 따른 식물체 재분화율을 비교하였다. 식물체 재분화는 0.5 mg/L NAA와 2.0 mg/L kinetin이 첨가된 배지에서 체세포배발생 단계를 거쳐 36%의 빈도를 나타내었으며 NAA 농도가 높아질수록 식물체 재분화율은 감소하였다 (Table 1). 또한, 다른 혼용처리 배지에서는 10% 미만의 재분화율을 나타내어 (결과미제시) 성장조절제 종류 및 농도별 반응이 다른 것을 보였다. 배발생 캘러스로부터 유도된 체세포배발생은 초기세포분열중 세포내 극성의 변화로 세포형태가 재결정되고 유전자발현의 선택적변화가 일어나는 직접적인 유도 (direct induction) 과정으로 생각된다.

Table 1. Effect of plant growth regulators on plant regeneration from mature seed-derived callus of *Leymus chinensis* Trin

Plant growth regulators (mg/L)		Plant regeneration (%)
Kinetin	NAA	
2	0.5	36 ± 1.4
2	1	20 ± 1.0
2	1.5	18 ± 2.1
2	2	22 ± 1.5

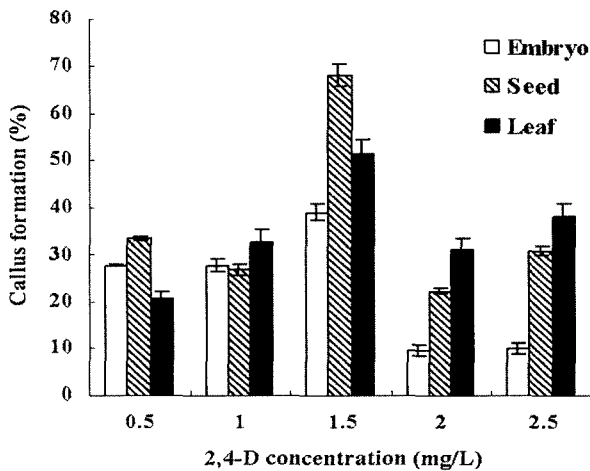


Figure 1. Callus formation frequency from different explants of *Leymus chinensis* on MS medium supplemented with various 2,4-D concentrations.

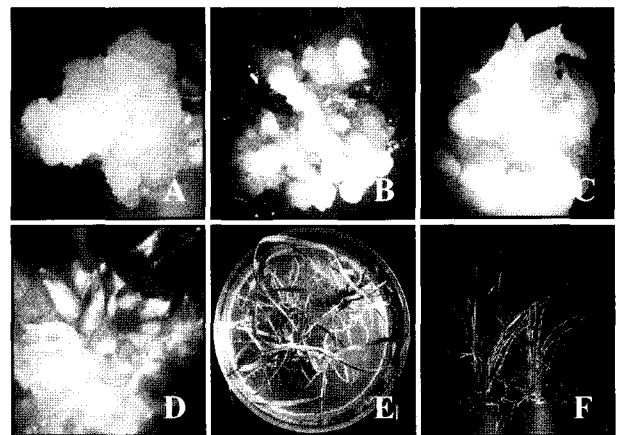


Figure 2. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic calli of *Leymus chinensis*. A, Embryogenic calli on MS medium supplemented with 1.5 mg/L 2,4-D; B and C, Various stages of somatic embryogenesis on MS medium supplemented with 2.0 mg/L kinetin and 0.5 mg/L NAA; D, Multiple shoot formation; E, Plantlets with roots and leaves on MS medium; F, Regenerants potted in soil.

체세포배발생 경로는 직접적인 유도나 이미 결정된 배발생의 잠재력 유도 (permissive induction)로 구분할 수 있다. 잠재력 유도는 조직내 배발생 능력을 가진 세포가 발현되지만 이들 세포들은 주위세포들에 의해 억제되어 있으며, 직접적인 유도는 Figure 2와 같이 최적 배양조건에서 빠른 세포분열을 유도하여 세포형태가 재결정되는 것이다 (Litz and Gray 1995). 체세포배발생 과정은 재분화배지에서 배양 3-4주 후부터 구형배 (Figure 2B)가 발생되기 시작하여 배양기간이 경과됨에 따라 초기 심장형배를 거쳐 어뢰형으로 발달한 후 정상적인 자엽을 가진 식물체로 발달하였으며 동일한 배발생 캘러스에서도 초기의 구형에서 배축이 신장된 자엽단계까지 다양한 시기의 배발생 단계가 관찰되었다 (Figure 2B, C and D). 체세포배는 배양기간이 지속되면서 다수의 소식물체로 분화되었으며, 소식물체를 1/2 MS배지에서 1주 동안 배양한 결과, 모든 개체가 뿌리가 발달한 완전한 식물체로 성장하였으며 (Figure 2E), pot에서 정상적인 식물체로 발달하였다 (Figure 2F).

본 연구에서 확립한 양초의 체세포배발생을 통한 재분화 시스템은 연구팀에서 확보하고 있는 복합 환경스트레스 내성 발현백터를 이용하여 양초 형질전환체의 개발에 이용될 것이다. Jin (2004)에 의해 양초에서 고알칼리 (Na_2CO_3) 처리에 의해 분리된 유전자의 기능을 본 연구의 재분화체계를 이용하여 양초의 형질전환으로 규명하면 양초의 뛰어난 환경적응성을 분자수준에서 이해할 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구에서 확립한 체세포배발생을 통한 양초의 재분화시스템은 향후 양초의 환경적응성을 분자수준에서 규명하는 일과 양초의 분자육종에 유용하게 활용될 것으로 기대된다.

적 요

양초 (*Leymus chinensis* Trin.)의 성숙종자로부터 캘러스 유도조건 및 식물체 재분화 체계를 확립하였다. 성숙종자로부터 1.5 mg/L 2,4-D가 포함된 MS배지로부터 배양 6주 후, 캘러스가 높은 빈도 (약 70%)로 유도되었다. 배발생 캘러스는 2.0 mg/L kinetin과 0.5 mg/L NAA가 첨가된 MS배지에서 배양 3주 후부터 다양한 단계의 체세포배로 발달하였다. 식물생장조절제가 포함되지 않은 MS배지에서 배양 4주부터 소식물체로 재분화되었다 (재분화율 36%). 재분화된 소식물체를 1/2 MS배지에서 1주 동안 배양하여 뿌리가 발달한 완전한 식물체로 성장하였으며 토양에 이식하여 온실에서 정상적인 식물체로 재배할 수 있었다. 본 연구를 통하여 확립한 재분화 시스템은 분자육종을 통한 복합환경스트레스 양초의 개발에 유용하게 응용되어질 수 있을 것이다.

사 사

본 연구는 과학기술부 국제공동연구사업으로 수행되었다.

인용문헌

- Binh OQ, Heszky LE (1990) Restoration of the regeneration potential of long term cell culture in rice (*Oryza sativa*) by salt pretreatment. *Plant Physiol* 136: 336-340
- Conger BV, Hanning GE, Gray DJ, McDeniel JK (1983) Direct embryogenesis from mesophyll cell of orchardgrass. *Science* 221: 850-851
- 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
- Data SK, Data K, Potrycus I (1990) Embryogenesis and regeneration from microspores of both indica and japonica rice (*Oryza sativa*). *Plant Sci* 67: 83-88
- Feirer RP, Simon PW (1991) Biochemical differences between carrot inbreds differing plant regeneration potential. *Plant Cell Rep* 10: 152-155
- 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
- Jia SX (1987) Forage flora in people republic of sinica. Beijing, China Agricultural Press, pp 19-35
- Jin Hua (2004) Generation and characterization of ESTs in *Leymus chinensis* forage grass adapted to high pH sodic soil. PhD thesis, Chungnam National University, Daejeon
- Kim KY, Kwon SY, Lee HS, Hur Y, Bang JW, Kwak SS (2003) A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweetpotato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells. *Plant Mol Biol* 51: 831-838
- 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
- Kwon SY, Jeong YJ, Lee HS, Kim JS, Cho KY, Allen RD, Kwak SS (2002) Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant Cell Environ* 25: 873-882
- 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 cultures of orchardgrass. *Korean J Plant Biotechnol* 30: 341-346
- Lim S, Lee HS, Kwon SY, Kwak SS (2004) Development of transgenic sweetpotato plants with enhanced tolerance to environmental stress. *Proceedings of the International Workshop on Production, Utilization and Development of Sweetpotato*. Mokpo Experiment Station, Rural Development Administration. Muan, Korea, September 6-10, 2004. pp 31-39
- Litz RE, Gray DJ (1995) Somatic embryogenesis for agricultural improvement. *World Microbio Biotechnol* 11: 416-425
- Liu GS, Liu JS, Qi DM, Chu CC, Li HJ (2004) Factors affecting plant regeneration from tissue cultures of Chinese leymus (*Leymus chinensis*). *Plant Cell Tiss Org Cult* 76: 175-178
- Liu GS, Wang EH, Liu J, Qi DM, Li FF (2002) Plant regeneration of *Leymus chinensis* via in vitro culture. *Acta Agrestia Sin* 10: 198-202
- Liu GS, Wang ZY (1999) Symposia of continual development research in north agriculture and animal husbandry district. Beijing, China Science and Technology Press, pp 136-137
- Lu CY, Vasil IK (1982) Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of *Panicum maximum* Jacq. *Amer J Bot* 69: 77-81
- 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 bioassay with tobacco tissue culture. *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. *Kor J Grassland Sci* 20: 25-30
- Satoh S, Kamada H, Harada H, Fujii T (1986) Auxin-controlled protein release into the medium of embryogenic carrot cells. *Plant Physiol* 81: 931-933
- Spangenberg G, Wang ZY, Potrykus (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
- Tang L (2005) Development and characterization of transgenic potato plants with enhanced tolerance to environmental stress. Ph D thesis, Chungnam National University, Daejeon
- Wang D, Wergin WP, Zimmerman RH (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of strawberry. *HortSci* 19: 71-72
- Woo HS, Lee SH, Lee DG, Kim JS, Won SH, Lee BH (2004) Efficient plant regeneration from mature seed-derived callus of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Korean J Plant Biotechnol* 31: 43-48

(접수일자 2005년 2월 4일, 수리일자 2005년 2월 21일)