

식물생장조절물질이 페레니얼 라이그래스 (*Lolium perenne* L.)의 캘러스 유도과 식물체 재분화에 미치는 영향

이기원 · 이동기 · Nagib Ahsan · 원성혜 · 이상훈* · 김기용* · 최기준* · 서 성* · 이병현

Effect of Plant Growth Regulators on Callus Induction and Plant Regeneration of Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.)

Ki-Won Lee, Dong-Gi Lee, Nagib Ahsan, Sung-Hye Won, Sang-Hoon Lee*, Ki-Yong Kim*,
Gi Jun Choi*, Sung Seo* and Byung-Hyun Lee

ABSTRACT

Optimum tissue culture conditions for an efficient induction of embryogenic callus from mature seeds of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and regeneration of plants from callus tissues were investigated. MS medium containing 3 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L BA was optimal for embryogenic callus induction from mature seeds. The highest plant regeneration frequency (58.3%) was observed when the embryogenic callus tissues were cultured on N6 medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D and 3 mg/L BA. Regenerated plants were grown normally when shoots transplanted to the soil. A short tissue culture period and high-frequency regeneration system would be helpful for molecular breeding of perennial ryegrass through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation.

(Key words : Callus, Perennial ryegrass, Plant regeneration)

I. 서 론

페레니얼 라이그래스 (*Lolium perenne* L.)는 아시아, 북부 아프리카, 지중해 연안이 원산지이며 초기생육이 빠르고 정착 및 분얼력이 강하여 이른 봄부터 이용할 수 있으며, 내한성이 강한 화분과 목초로써 사료작물, 토양 보존용으로 이용되며 최근에는 잔디로도 널리 이용되고 있다. 그러나 고온과 건조에 대한 저항성이 낮아 건조지대나 더운 지방에서는 재배하기 어렵고 특히 여름철 기온이 25℃ 이상의 고온이 장기간 지속될 때에는 생육이 정지하는 하

고현상(summer depression)을 일으켜 사료의 품질저하와 생산성이 감소되는 것으로 알려져 있다. 또한 여름철의 고온 경작지에서 엽부병의 발생이 많아 수량 감소에 많은 영향을 주기도 한다(Won 등, 2000).

최근에는 외부의 유용유전자 도입을 통한 사료작물의 신품종 개발을 위한 많은 연구가 시도되고 있는 실정이다(McKersie, 1997; Spangenberg 등, 1998). 그러나 이러한 유용유전자의 형질전환에 의한 신품종 사료작물의 분자유종을 위해서는 먼저 단기간 내에 높은 재분화율을 나타낼 수 있는 효율적인 조직배양 기술체계가

경상대학교 응용생명과학부 낙농학전공(Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea)

*축산과학원(National Institute of Animal Sciences, Suwon 441-706, Korea)

Corresponding author: Byung-Hyun Lee, Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea Tel: +82-55-751-5418, Fax: +82-55-751-5410, E-mail: hyun@gsnu.ac.kr

확립되어 있어야만 한다 (Forster와 Spangenberg, 1999). 우리나라에서 목초 및 사료작물의 조직 배양에 대한 연구는 외국에 비해 절대적으로 부족한 실정이며, 특히 페레니얼 라이그래스의 조직배양에 대한 연구 보고는 전무한 실정이다. 페레니얼 라이그래스의 식물체 재분화에 대한 연구는 원형질체 배양 연구 (Dalton, 1988; Creemers-Molenaar 등, 1989; Zaghmout와 Torello, 1992), 캘러스 배양 연구 (Torello와 Symington, 1986; Won 등, 2000) 및 현탁배양세포 (Zaghmout와 Torello, 1990)에 관한 연구 등에서 보고된 바 있다. 그러나 이러한 조직들로부터 식물체 재분화 조건은 유전적 요인이나 배양조건에 따라 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있어서 재분화 능력이 우수한 품종의 선발뿐만 아니라 각 품종에 대한 최적 배양조건의 확립은 매우 중요한 단계 중에 하나라고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체 재분화에 있어서 최적조건을 찾고자 하였다. 성숙종자는 배양재료의 연중 안정적인 공급이라는 측면에서 매우 중요한 의의를 가진다. 최근에는 형질전환 기술의 발달로 화분과 작물에 외래 유전자를 도입함으로써 신품종의 개발 및 유용 작물의 창출에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다 (Wang 등, 1997; van der Mass 등, 1994; Denchev 등, 1997; Cheng 등, 1997).

본 연구에서는 *Agrobacterium* 형질전환법에 의한 유용유전자 도입을 통한 신품종 페레니얼 라이그래스를 개발할 목적으로, 우선 연중 이용이 가능한 성숙종자로부터 캘러스를 유도하여 단기간 내에 완전한 식물체로 재분화시킬 수 있는 효율적인 재분화 시스템을 확립하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 종자살균

식물재료로는 페레니얼 라이그래스 (*Lolium*

perenne L.)의 Reveille 품종을 사용하였다. 캘러스 유도를 위한 종자의 살균은 Lee 등 (2004)의 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 성숙종자의 종피를 제거한 다음 70% ethanol에서 30초간 표면살균하고 멸균수로 3회 세정한 후, 다시 30% (v/v) sodium hypochlorite 용액을 첨가하여 30분간 교반하면서 표면살균 하였다. 살균된 종자는 멸균수로 3회 이상 세정한 다음 멸균된 filter paper로 옮겨 물기를 완전히 제거한 후, 캘러스 유도배지에 치상하였다.

2. 배발생 캘러스의 유도 및 증식

성숙종자로부터 캘러스를 유도하기 위한 기본적인 캘러스 유도배지는 MS 기본배지 (Murashige와 Skoog, 1962)에 1 mg/L thiamin-HCl, 2 mg/L copper, 250 mg/L myo-inositol, 250 mg/L prolin, 30 g/L sucrose 및 4 g/L Gelrite가 첨가된 배지를 사용하였다. 성숙종자로부터 캘러스를 유도하기 위한 캘러스 유도배지에 첨가되는 성장조절물질의 종류와 농도에 따른 배양효과를 규명하기 위하여 auxin으로서 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)와 NAA (α -naphthalene acetic acid), cytokinin으로서 BA (6-benzyladenine)와 Kinetin을 다양한 농도와 조합으로 단용 또는 혼용 첨가한 배지를 사용하여 4주간 암상태에서 배양한 다음, 종자로부터 유도된 캘러스를 동일성분의 새 배지에 대체한 후 2주간 배양하여 캘러스를 증식시켰다. 캘러스 유도효율은 치상한 종자에 대한 유도된 캘러스의 수를 백분율로 나타내었다.

3. 캘러스로부터 식물체 재분화

성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체를 재분화시키기 위한 최적조건을 규명하기 위하여 6주령의 배발생 캘러스를 N6 기본배지 (Chu 등, 1975)에 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamin-HCl, 250 mg/L myo-inositol, 500 mg/L

proline, 30 g/L sucrose 및 5 g/L Gelrite가 첨가된 배지를 사용하였다.

캘러스로부터 식물체 재분화배지에 첨가되는 성장조절물질의 종류와 농도에 따른 배양효과를 규명하기 위하여 auxin류로 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)와 NAA (α -naphthalene acetic acid), cytokinin류로 BA (6-benzyladenine)와 kinetin을 다양한 농도와 조합으로 혼용 첨가한 배지에 배발생 캘러스를 치상하여 24±2℃, 16 h light/8 h dark 조건에서 3주간 배양하고 동일성분의 새 배지에 계대한 후 3주간 더 배양하여 각각의 처리구에서 형성된 1 cm 이상으로 자란 shoot을 재분화개체로 조사하였다. 재분화된 싹은 1/2 MS 배지에 이식하여 뿌리발생을 유도하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 성장조절물질의 종류와 농도에 따른 배양 효율

페레니얼 라이그래스의 종자배양에 있어서 캘러스 유도배지에 첨가되는 성장조절물질의 종류와 농도에 따른 효과를 규명하기 위하여 2,4-D와 BA를 단용 또는 혼용 처리하여 본 결과 Table 1과 같았다. 종자로부터의 캘러스 유도는 9 mg/L 2,4-D 단용 처리구에서 20%로

가장 높게 나타났으며 형성된 캘러스는 형태적으로도 조직이 치밀하고 유백색을 나타내는 배발생 캘러스가 가장 많이 형성되었으며, 이보다 높거나 낮은 농도에서는 감소하는 추세를 보였다.

한편 가장 높은 캘러스 유도율을 보였던 9 mg/L 2,4-D와 BA를 혼용처리하였을 때의 배양효과를 조사한 결과, 전체적으로는 2,4-D 단용 처리구에 비해 캘러스 유도율은 약간 감소하였으나 재분화능이 높을 것으로 추정되는 배발생 캘러스의 비율이 높게 관찰되었다. 또한 NAA와 Kinetin를 단용 또는 혼용처리 했을 경우 캘러스 배양효율을 조사해 본 결과 전체적으로 2,4-D와 BA 처리구에 비해 낮은 효율을 나타내었다 (Table 2). 즉 2,4-D와 BA 혼용처리구는 배발생 캘러스 유도율과 증식속도가 빨랐으나, NAA와 kinetin 혼용처리구의 경우 캘러스의 캘러스 유도율과 증식속도가 느릴 뿐만 아니라 배양기간이 경과됨에 따라 갈변되는 현상도 많이 나타났다. 따라서 식물체 재분화를 위한 배발생 캘러스는 9 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA를 혼용처리한 배지에서 유도한 캘러스를 이용하였다.

2. 캘러스로부터 식물체 재분화

성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체 재분화시에 배지에 첨가되는 성장조절제의 종류와

Table 1. Effect of 2,4-D and BA on callus formation from mature seed culture of Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L. cv. Reville)

Growth regulators (mg/L)		No. of seeds transferred	Callus formation (%) ^a
2,4-D	BA		
6	0	120	8.3
9	0	120	20.0
12	0	120	1.6
6	0.1	120	8.3
9	0.1	120	16.6
12	0.1	120	5.0

^a Dehusked mature seeds were placed on the callus induction medium and cultured for 6 weeks.

Table 2. Effect of NAA and Kinetin on callus formation from mature seed culture of Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L. cv. Reville)

Growth regulators (mg/L)		No. of seeds transferred	Callus formation (%) ^a
NAA	Kin		
6	0	120	21.6
9	0	120	11.6
12	0	120	10.0
6	0.1	120	10.0
9	0.1	120	11.6
12	0.1	120	16.6

^a Dehusked mature seeds were placed on the callus induction medium and cultured for 6 weeks.

적정농도를 조사하기 위하여 캘러스 유도배지에서 형성된 캘러스를 우선 2,4-D와 BA가 첨가된 N6 배지를 기본으로 하는 재분화배지에 옮겨 배양한 후, 식물체 재분화율을 조사한 결과 Table 3와 같이 나타났다. 캘러스로부터 식물체 재분화에는 1 mg/L 2,4-D와 5 mg/L BA 혼용처리구가 재분화율 58.3%로서 가장 높게 나타났으며, 5 mg/L 이상의 BA 처리구에서는 재분화율이 오히려 감소하는 경향을 나타내었다 (Table 3).

한편 NAA와 kinetin을 혼용처리한 재분화 배지에서의 식물체 재분화율에 미치는 영향을 조사한 결과, 1 mg/L NAA와 5 mg/L kinetin을 첨가해 주었을 때 31.7%의 비교적 높은 재분화

율을 나타내었으나, 전체적으로는 2,4-D와 BA 혼용처리구에 비해 월등히 낮은 식물체 재분화율을 나타내었다 (결과 미제시). 따라서 페레니얼 라이그래스의 효율적인 재분화를 위한 적정 식물생장조절물질의 처리는 캘러스 유도시에는 9 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA를 첨가해주어 재분화효율이 우수한 배발생 캘러스를 형성시키고, 이 캘러스를 1 mg/L 2,4-D와 5 mg/L BA가 첨가된 배지에서 배양함으로써 58% 이상의 높은 재분화율을 얻을 수 있을 것으로 판단된다. 이러한 경향은 화본과 목초인 오차드그래스 (Lee 등, 2003)의 경우에도 보고된 바 있어서 이들 화본과 목초들의 경우, 고농도의 2,4-D와 저농도의 BA를 첨가한 배지에서 배발생 캘러

Table 3. Effect of 2,4-D and BAP on plant regeneration from mature seed culture of perennial ryegrass

Growth regulators (mg/L)		No. of calli transferred ^a	Plant regeneration (%)
2,4-D	BA		
1	1	60	25.0
	3	60	45.0
	5	60	58.3
2	1	60	21.7
	3	60	18.3
	5	60	16.7

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

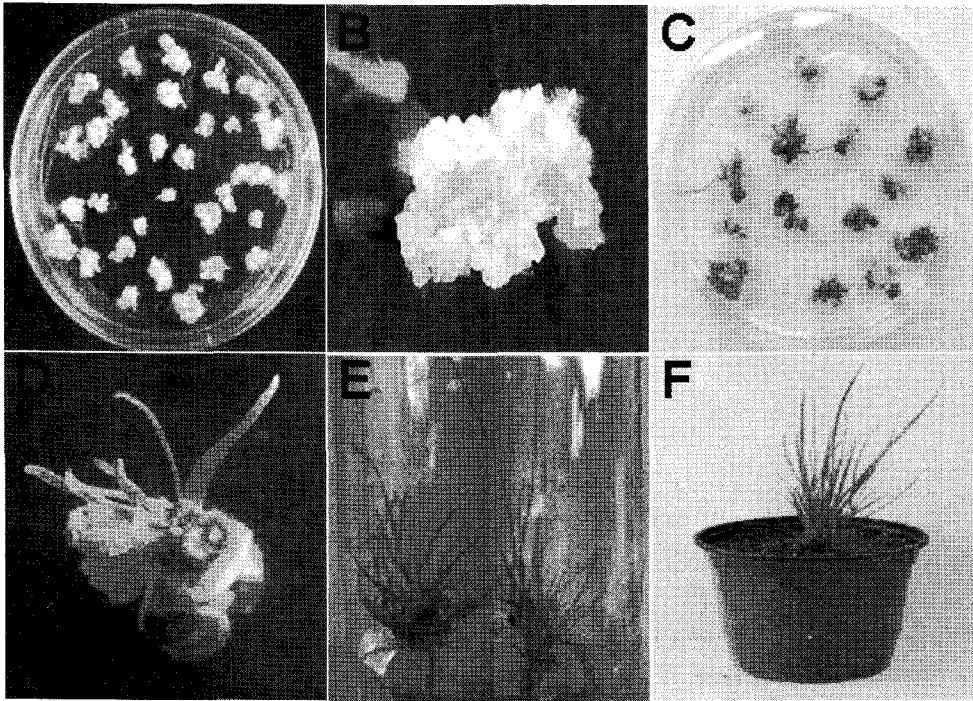


Fig. 1. Plant regeneration from seed-derived callus of perennial ryegrass.

스를 유도한 후, 식물체 재분화시에는 2,4-D의 농도를 감소시키고 BA를 고농도로 첨가시켜 줌으로서 높은 재분화효율을 나타내는 것으로 판단된다. Won 등(2000)은 2,4-D와 Kinetin을 첨가한 MS 배지에서 배양 했을 때 본 실험의 결과와 같은 정도의 재분화율을 보였다고 보고 하였다. 이러한 높은 재분화율은 효율적인 형질전환시스템 확립에 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

본 실험을 통하여 페레니얼 라이그래스에 있어서 식물생장조절물질의 종류가 캘러스유도와 식물체 재분화 효율에 미치는 영향을 체계적으로 조사하였다. 페레니얼 라이그래스의 성숙종자를 배양했을 때 캘러스 유도배지에서 배양 7 일째부터 캘러스가 형성되기 시작하여 6주 후에는 20% 이상이 형성되었으며 (Fig. 1. A, B), 이들을 식물체 재분화 배지에 이식했을 때 배양 6주 후에는 높은 빈도로 신초가 재분화 되었다 (Fig. 1. C, D). 재분화된 신초는 1/2 MS배

지로 구성된 rooting 배지에서 1주간 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 pot에 이식하여 재배할 수 있었다 (Fig. 1. E, F). 본 연구에서 개발한 페레니얼 라이그래스의 캘러스로부터 식물체를 재분화시킬 수 있는 효율적인 재분화 시스템은 장래에 유용유전자 도입을 통한 형질 전환 목초 개발을 위한 효율적인 형질전환시스템 확립에 있어서 유용한 자료로 활용될 수 있을 것이다. 이러한 형질전환목초를 이용한 기능성 목초 개발 및 초분류 바이오에너지 작물 자원으로서의 개발 등위 분자농업기술 개발에도 크게 이용될 수 있을 것이다.

IV. 요 약

페레니얼 라이그래스의 최적 조직배양조건을 확립하기 위하여 성숙종자로부터 배발생 캘러스 유도 및 효율적인 식물체 재분화조건을 체계적으로 확립하였다. 배발생 캘러스 유도시

첨가되는 auxin으로는 2,4-D가 가장 효율적이었으며, 9 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L BA가 첨가된 MS 배지에서 배발생 캘러스가 가장 높은 빈도로 유도되었다. 식물체 재분화는 배발생 캘러스를 1 mg/L 2,4-D와 5 mg/L BA가 첨가된 N6 배지에서 배양했을 때 58.3%의 높은 재분화율을 나타내었다. 본 연구를 통하여 확립된 단기간의 효율적인 재분화 시스템은 분자육종을 통한 신품종 페레니얼 라이그래스 개발에 유용하게 응용되어질 수 있을 것이다.

V. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 연구비 지원 (과제번호 20050301-034466-007-01-00)에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

VI. 인용 문헌

- Cheng, M., J.E. Fry, S. Plang, H. Xhou, C.M. Hironaka, D.R. Duncan, T.W. Conner and Y. Wan. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 115:971-980.
- Chu, C.C., C.S. Wang, C.C. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu and F.Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinic.* 18:659-666.
- Creemers-Molenaar, J., P. van der Valk, J.P.M. Loeffen and M.A.C.M. Zaai. 1989. Plant regeneration from suspension cultures and protoplasts of *Lolium perenne* L. *Plant Sci.* 63:167-176.
- Dalton, S.J. 1998. Plant regeneration from cell suspension protoplasts of *Festuca arundinacea* Schreb. (tall fescue) and *Lolium perenne* L. *J. Plant Physiol.* 132:170-175.
- Dalton, S.J. 1998. Plant regeneration from cell suspension protoplasts of *Festuca arundinacea* Schreb. (tall fescue) and *Lolium Perenne* L. *J. Plant Physiol.* 132:170-175.
- Denchev, P.D., D.D. Songstad and J.K. McDaniel. 1997. Transgenic orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) plants by direct embryogenesis from micro-projectile mombarded leaf cells. *Plant Cell reports* 16:813-819.
- Forster, J.W. and G. Spangenberg. 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.
- Lee, S.-H., D.-G. Lee, J.-S. Kim and B.-H. Lee. 2003. High-frequency plant regeneration from mature seed-derived callus culture of orchardgrass. *J. Korean Plant Biotech.* 30:341-346.
- Lee, S.-H., D.-G. Lee and B.-H. Lee. 2004. Effects of medium supplements on seed-derived callus culture and regeneration of orchardgrass. *J. Korean Crop Sci.* 49:232-236.
- 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 F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15:473-497.
- Spangenberg, G., Z.Y. Wang and Potrykus. 1998. *Biotechnology in forage and turf grass improvement*. Frankel et al. *Monographs on theoretical and applied genetics*. Vol. 23. Springer Verlag, Heidelberg, pp.192-221.
- Torello, W.A and A.J. Symington. 1986. Rege-neration from perennial ryegrass callus tissue. *Hort science* 19:56-57.
- van der Maas, H.M., E.R. de jong, S. Rueb, L.A.M. Hensgens and F.A. Krens. 1994. Stable transformation and long-term expression of the *gusA* reporter gene in callus lines of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant Mol. Biol.* 24:401-405.
- Wang, G.R., H. Binding and U.K. Posselt. 1997. Fertile transgenic plants from direct gene transfer to protoplasts of *Lolium perenne* L. and *Lolium multiflorum* Lam. *J. Plant Physiol.* 151:83-90.
- Won, S.-H., B.-H. Lee and J. Jo. 2000. Plant regeneration from seed-derived callus in perennial ryegrass. *Kor. J. Grassland Sci.* 20:19-24.
- Zaghmout, O.M.F. and W.A. Torello. 1990. Isolation and culture of protoplasts from embryogenic suspension cultures of red fescue (*Festuca rubra* L.). *Plant Cell Reports* 9:340-343.
- Zaghmout, O.M.F. and W.A. Torello. 1992. Plant regeneration from callus and protoplasts of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *J. Plant Physiol.* 140:101-105.