

# 페레니얼 라이그라스의 품종에 따른 성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체 재분화

이기원\*,\*\* · 이종경\* · 김기용\* · 지희정\* · 박형수\* · 김경희\*\* · 이병현\*\* · 이상훈\*

## Plant Regeneration Capacity of Calluses Derived from Mature Seed of Perennial Ryegrass Cultivars

Ki-Won Lee\*,\*\*, Jung Kyong Lee\*, Ki-Yong Kim\*, Hee Chung Ji\*, Hyung Soo Park\*,  
Kyung-Hee Kim\*\*, Byung-Hyun Lee\*\* and Sang-Hoon Lee\*

### ABSTRACT

A suitable system for plant regeneration has been established for perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). In order to investigate the effects of genetic variations of perennial ryegrass in tissue culture response, calli were induced from mature seeds of five cultivars, 'Topgun', 'Accent', 'Renenge GLX', 'Tetrelite', 'Bison' and plant regeneration frequency was compared. Significant differences were observed among the cultivars in both callus induction and plant regeneration. Genotype 'Accent' consistently performed best in the callus formation and plant regeneration. These results can be used useful for molecular breeding of perennial ryegrass through genetic transformation.

(**Key words** : Callus, Plant regeneration, Cultivar, Molecular breeding, Perennial ryegrass)

### I. 서 론

페레니얼 라이그라스(*Lolium perenne* L.)는 다년생 화분과 목초로서 초기 생육이 왕성하고 사료가치가 높으며 그 용도가 다양하여 전 세계적으로 널리 재배되고 있는 초종 중의 하나이다 (Spangenberg 등, 1995). 그러나 페레니얼 라이그라스의 여러 가지 장점에도 불구하고 우리나라 여름철 고온 다습한 기후조건에서는 매우 약하여 고사되기 쉽다. 이러한 단점을 보완하기 위해 국내 기후환경에 적합한 새로운 품종 육성이 시급한 실정이다.

식물의 조직배양 효율은 초종에 따라 큰 차이를 보이며 동일한 초종에서도 품종, 배양 조직, 식물 성장조절제, 배양 배지에 첨가되는 물질의 종류와 농도에 따라 많은 차이가 있다 (Somers 등, 2003). 특히, 캘러스 유도과 식물체 재분화에는 식물 성장조절제인 옥신과 사이토키닌의 비율과 농도에 따라 많은 영향을 받는다 (Lee 등, 2003; Lee 등, 2005). 따라서 최적의 조직배양 조건 확립은 유용유전자를 직접 도입하여 형질전환 식물체 개발함에 있어 선행되어야 핵심기술이라고 할 수 있다 (Forster와 Spangenberg, 1999).

\* 농촌진흥청 국립축산과학원 (National Institute of Animal Science, RDA)

\*\* 경상대학교 응용생명과학부 (Division of Applied Life Science (BK21 program), Gyeongsang National University)

Corresponding author: Sang-Hoon Lee, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 330-801, Korea.

Tel: +82-41-580-6754, Fax: +82-41-580-6779, E-mail: sanghoon@korea.kr

최근에는 생명공학 기술을 이용한 목초 및 사료작물의 신품종 개발에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있으며 (Spangenberg 등, 1998), 페레니얼 라이그라스의 형질전환에 관한 많은 연구 결과 (Sato와 Takamizo, 2006; Wu 등, 2005)가 보고된 바 있다.

그러나 화분과 목초의 경우 품종에 따라 조직배양과 형질전환 효율에 상당한 차이를 나타내어 형질전환 기술을 이용한 신품종 육성의 식물재료 사용하기에는 많은 제약이 있다.

따라서 본 연구에서는 페레니얼 라이그라스의 5가지 품종의 성숙종자로부터 재분화율이 우수한 품종을 선발하여 형질전환 기술을 이용한 신품종 개발에 적합한 재료로 활용하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 식물재료 및 종자소독

식물재료로는 페레니얼 라이그라스 (*Lolium perenne* L.)의 5가지 품종 (Topgun, Accent, Renenge GLX, Tetrellite 및 Bison)을 사용하였다. 성숙종자의 종피를 제거하기 위해 50% sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)에서 30 분간 처리한 다음 70% ethanol에 5분간 살균한 후, 10% (v/v) sodium hypochlorite 용액에서 30분간 교반하면서 표면살균 하였다. 살균된 종자는 멸균수로 3회 이상 세정한 다음 멸균된 filter paper로 옮겨 물기를 완전히 제거한 후, 캘러스 유도배지에 치상하였다.

### 2. 성숙종자로부터 캘러스 유도

성숙종자로부터 캘러스를 유도하기 위하여 MS (Murashige와 Skoog, 1962) 기본배지에 9 mg/L 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 0.1 mg/L BA (6-benzyladenine), 2 mg/L copper sulfate, 1 mg/L thiamin-HCl, 250 mg/L myo-

inositol, 250 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose 및 4 g/L Gelrite를 첨가한 배지 (Lee 등, 2007)를 사용하였다. 배지에 살균된 종자를 치상한 다음, 24±2°C의 생장실에서 암상태 및 약광 조건으로 각각 4주간 배양하여 치상한 종자에 대한 유도된 캘러스의 수를 백분율로 조사하여 비교하였다.

### 3. 식물체 재분화

품종에 따른 식물체 재분화 효율을 조사하기 위하여 4주령의 배발생 캘러스 중 종자로부터 발아된 shoot을 제거하고, 캘러스만을 취하여 MS 또는 N6 기본배지 (Chu 등, 1975)에 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamin-HCl, 250 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose 및 4 g/L Gelrite가 각각 첨가된 배지 (Lee 등, 2007)에 100개의 캘러스를 이식하여 24±2°C, 16 h light / 8 h dark 조건에서 3주간 배양한 후 동일한 새 배지에서 1회 계대배양하여, 총 6주 동안 배양하여 각각의 처리구에서 1 cm 이상으로 자란 신초를 재분화개체로 조사하였다.

식물체 재분화율은 이식된 캘러스에 대한 식물체가 유도된 캘러스의 수를 백분율로 나타내었다. 재분화 된 신초는 1/2 MS 배지에 이식하여 뿌리발생을 유도하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 품종에 따른 캘러스 유도효율

페레니얼 라이그라스의 품종별 배양효율의 차이를 조사하기 위하여 Topgun 외 4품종의 성숙종자를 사용하여 배발생 캘러스의 유도율을 비교한 결과 Table 1과 같이 나타났다. 4주 동안 배양한 성숙종자로부터 캘러스 유도율은

Table 1. Callus induction ability of different perennial ryegrass cultivars

Cultivars	No. of seeds transferred <sup>a</sup>	Callus formation (%)
Topgun	100	30.7 ± 2.9
Accent	100	38.7 ± 3.1
Renenge GLX	100	27.3 ± 1.2
Tetrelite	100	14.3 ± 1.5
Bison	100	24.7 ± 4.2

<sup>a</sup> Dehusked mature seeds were placed on MS medium containing 9 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BA, 2 mg/L copper, 1 mg/L thiamin-HCl, 250 mg/L myo-inositol, 250 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 4 g/L Gelrite, and cultured for 4 weeks.

Accent, Topgun, Renenge GLX, Bison, Tetrelite 순으로 높은 경향을 보였다. Accent와 Topgun 품종이 각각 38.7% 및 30.7%의 높은 캘러스 유도율을 보였고, Tetrelite 품종의 경우 14.3%로 가장 낮은 효율을 보여 페레니얼 라이그라스 품종 간에 상당한 차이를 나타내었다.

## 2. 배양조건에 따른 배양 효율

페레니얼 라이그라스의 성숙종자로부터 캘러스 유도 및 식물체 재분화에 있어 광조건에 따른 배양효율을 조사하기 위하여 캘러스 유도와 재분화 배지에 각각 소독한 종자를 치상하여 캘러스 유도율과 식물체 재분화율을 조사한 결과 Table 2와 같았다. 성숙종자로부터 캘러스 유도시에는 5가지 품종 모두 암상태에서 배양하는 것이 광상태에서 배양하는 것보다 캘러스 유도율이 높게 나타났으며 종자 1립당 캘러스의 생체중 역시 높게 나타났다(결과미제시). 또한, 암상태에서 배양한 캘러스는 경우 치밀한 조직의 재분화능이 높은 캘러스의 형성율이 높았으나(Fig. 2C), 광상태에서 배양한 성숙종자의 경우 종자로부터 정상적으로 발아되어 유식물로 분화되는 개체가 많이 관찰되었다. 반면 이들 각각의 캘러스를 재분화배지에 계대배양했을 때 식물체 재분화율은 광상태에서 배양한 캘러스가 암상태에서 배양한 것보다 높은 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 광조건에

Table 2. Effect of light on callus induction from mature seed and plant regeneration in Perennial ryegrass

Cultivars	Light condition	Callus formation (%)	Plant regeneration (%) <sup>a</sup>
Topgun	Light	27.7 ± 3.2	32
	Dark	30.7 ± 2.5	28
Accent	Light	27.0 ± 2.6	37
	Dark	40.3 ± 3.2	30
Renenge GLX	Light	23.0 ± 3.0	25
	Dark	26.0 ± 3.6	23
Tetrelite	Light	16.3 ± 1.5	16
	Dark	18.3 ± 2.1	15
Bison	Light	26.0 ± 3.6	23
	Dark	26.7 ± 3.5	20

<sup>a</sup> Calli were transferred to the regeneration medium(N6 medium, 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamin-HCl, 250 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 4 g/L Gelrite and cultured for 6 weeks.

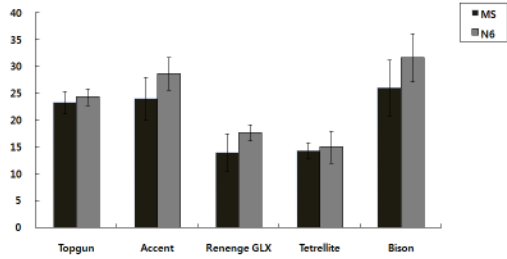


Fig. 1. Regeneration ability of different perennial ryegrass cultivars. Calli were induced on MS and N6 basic medium separately.

다른 분화양상의 차이가 캘러스 유도율과 재분화율에 영향을 미친 것으로 판단된다.

### 3. 품종에 따른 식물체의 재분화 효율

페레니얼 라이그라스 성숙종자로 유도된 캘러스를 4주간 배양하여 재분화 배지에 옮겨 24±2°C, 16 h light / 8 h dark 조건에서 6주간 배양한 다음 품종에 따른 재분화율을 조사한 결과 Fig. 1과 같이 나타났다. 식물체로의 재분화율은 모든 품종에서 MS 보다 N6 배지에서 Bison, Accent, Topgun, Renenge GLX, Tetrelite 순으로 높게 나타났다. 따라서 페레니얼 라이그라스의 식물체 재분화에는 N6 배지가 적합한 것으로 판단된다.

품종 간의 배양에 따른 재분화효율의 차이는 Wang 등 (1993)에 의해 보고된 바 있으며 본 실험에 사용한 품종에서도 동일한 결과가 나타났다. 또한 이러한 유사한 결과가 대표적인 화본과 목초인 이탈리아인 라이그라스 (Rim 등, 2000)와 레드 페스큐 (Altpeter와 Xu, 2000) 등에서도 보고된 바 있다.

이러한 품종 간 차이는 모식물체의 genotype 이나 기내배양시 세포의 활력 등에 따른 배양 효율의 차이 때문일 것으로 추측 된다 (Vasil과 Vasil, 1984).

화본과 목초의 조직배양 과정에서 알비노 현상이 종종 일어나며 정상적인 식물체로 발달이

Table 3. Comparison between regeneration ability of different perennial ryegrass cultivars

Cultivars	No. of calli transferred	Regenerated plantlets <sup>a</sup>	
		Green plantlets	Albino plantlets
Topgun	100	23	1
Accent	100	26	0
Renenge GLX	100	15	1
Tetrelite	100	15	0
Bison	100	30	1

<sup>a</sup> Calli were transferred to the regeneration medium (N6 medium, 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamin-HCl, 250 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose, 4 g/L Gelrite and cultured for 6 weeks.

거의 불가능한 것으로 보고되어지고 있다. 페레니얼 라이그라스의 재분화 유도시 품종에 따른 알비노 식물체를 조사한 결과 Table 3과 같았다. 품종에 따라 차이는 약간 있으나 알비노 출현율은 거의 모든 처리구에서 1% 이하로 낮게 나타났다.

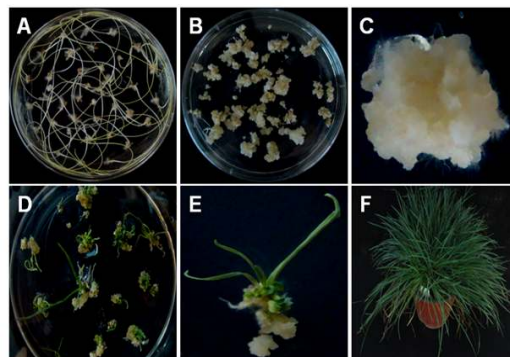


Fig. 2. Plant regeneration from seed-derived callus of perennial ryegrass. A-C, callus induced from mature seeds cultured on the callus induction medium; D-E, Plant regeneration from embryogenic calli in the regeneration medium; F Whole plant grown in pot.

본 실험을 통하여 5가지 페레니얼 라이그라스 품종을 사용하여 캘러스유도와 식물체 재분화 효율에 미치는 영향을 조사하였다. 식물체 재분화 효율이 우수한 'Accent' 품종의 성숙종자를 배양했을 때 캘러스 유도배지에서 배양 5일째부터 캘러스가 형성되기 시작하여 4주 후에는 30% 이상이 형성되었다(Fig. 2A-C). 이들을 식물체 재분화 배지에 이식했을 때 배양 6주 후에는 높은 빈도로 신초가 재분화되었다(Fig. 2D, E). 재분화된 신초는 1/2MS로 구성된 rooting 배지에서 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후, pot에 이식하여 순화시킨 다음 포장에 이식하여 재배하였다(Fig. 2F). 본 실험을 통하여 밝혀진 품종 간의 배양효율에 대한 결과는 유용유전자 도입을 통한 형질전환 페레니얼 라이그라스 개발에 있어서 유용한 자료로 활용될 수 있을 것이다.

#### IV. 요약

페레니얼 라이그라스의 5가지 품종을 이용하여 성숙종자로부터 배발생 캘러스 유도 및 캘러스로부터의 식물체 재분화 효율을 조사하였다. 성숙종자로부터 4주 동안 배양한 캘러스 유도율은 'Accent', 'Topgun', 'Renenge GLX', 'Bison', 'Tetrelite' 순으로 높은 캘러스 유도율을 보였고 암상태에서 배양한 캘러스가 광상태에서 배양한 것보다 7~9% 정도 높은 효율을 나타내었다. 식물체로의 재분화에 적합한 배지는 MS 배지보다 N6 배지에서 식물체 재분화율이 우수하였다. 품종간의 재분화율은 'Bison', 'Accent', 'Topgun', 'Renenge GLX', 'Tetrelite' 순으로 높게 나타났으며 광상태에서 유식물로 분화되는 개체가 1~7% 정도 많이 관찰되었다. 본 연구를 통하여 밝혀진 캘러스 유도율과 식물체 재분화율이 우수한 품종은 분자육종을 통한 신품종 페레니얼 라이그라스의 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

#### V. 인용문헌

1. Altpeter, F. and J. Xu. 2000. Rapid production of transgenic turfgrass (*Festuca rubra* L.) plants. *Plant Physiol.* 157:441-448.
2. Chen, L., C.K. Auh, P. Dowling, J. Bell, F. Chen, A. Hopkins, R.A. Dixon and Z.Y. Wang. 2003. Improved forage digestibility of tall fescue (*Festuca arundinacea*) by transgenic down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant Biotechnol. J.* 1:437-449.
3. 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.* 18:659-668.
4. 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.
5. Lee, K.-W., D.-G. Lee, N. Ahsan, S.-H. Won, S.-H. Lee, K.-Y. Kim, G.J. Choi, S. Seo and B.-H. Lee. 2007. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *J. Korean Grassl. Sci.* 27:235-240.
6. Lee, K.-W., S.-H. Lee, D.-G. Lee, H.-S. Lee, M. S. Choi, K.Y. Kim, H.S. Lee and B.H. Lee. 2005. Effect of plant growth regulators and antioxidants on callus induction and plant regeneration from seed culture of orchardgrass. *J. Korean Grassl. Sci.* 25:191-198.
7. 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.
8. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15:473-497.
9. 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. Kor Grassland Sci.* 20:25-30.
10. Sato, H. and T. Takamizo. 2006. *Agrobacterium*

- tumefaciens*-mediated transformation of forage-type perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Grassland Sci. 52:95-98.
11. Somers, D. A., D. A. Samac and P.M. Olhoft. 2003. Recent advances in legume transformation. Plant Physiol. 131:892-899.
  12. Spangenberg, G., Z.Y. Wang and I. 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, p. 192.
  13. Spangenberg, G., Z.Y. Wang, X.L. Wu, J. Nagel and I Potrykus. 1995. Transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne*) plants from micro-projectile bombardment of embryogenic suspension cells, Plant Sci. 108:pp. 209-217.
  14. Vasil, V. and I.K. Vasil. 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.
  15. Wang, Z.Y., J. Nagel, I. Potrykus and G. Spangenberg. 1993. Plants from cell suspension-derived protoplasts in *Lolium* species. Plant Sci. 94:179-193.
  16. Wu, Y.-Y., Q.-J. Chen, M. Chen, J. Chen and X.-C. Wang. 2005. Salt-tolerant transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene. Plant Sci. 169:165-173.
- (접수일: 2009년 9월 7일, 수정일 1차: 2009년 9월 21일, 수정일 2차: 2009년 11월 5일, 게재확정일: 2009년 11월 25일)