

# 티모시의 품종에 따른 성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체 재분화

이기원<sup>1</sup> · 최기준<sup>1</sup> · 김기용<sup>1</sup> · 지희정<sup>1</sup> · 정민웅<sup>1</sup> · 김경희<sup>2</sup> · 이병현<sup>2</sup> · 이상훈<sup>1</sup>

## Plant Regeneration from Seed Derived Callus of four Cultivars of Timothy

Ki-Won Lee<sup>1</sup>, Gi Jun Choi<sup>1</sup>, Ki-Yong Kim<sup>1</sup>, Hee Chung Ji<sup>1</sup>, Min Wong Jung<sup>1</sup>,  
Kyung-Hee Kim<sup>2</sup>, Byung-Hyun Lee<sup>2</sup> and Sang-Hoon Lee<sup>1</sup>

### ABSTRACT

The present study was conducted to determine the optimum *in vitro* conditions for callus induction and plant regeneration from mature seed derived callus of four cultivars of Timothy. In order to investigate the effects of genetic variations of timothy in tissue culture, calli were induced from mature seeds of four varieties, ‘Colt’, ‘Chair’, ‘Richmond’ and ‘Hokuo’ and plant regeneration frequency was compared. Significant differences were observed among the cultivars in both callus induction and plant regeneration. Genotype ‘Colt’ consistently performed best in the callus subculture and plant regeneration. The complete plantlets were thereafter transplanted to grow under greenhouse condition. Regenerated timothy plants were morphologically uniform with normal leaf and growth pattern.

(Key words : Callus, Plant regeneration, Timothy, *Phleum pratense* L.)

### I. 서 론

티모시 (*Phleum pratense* L.)는 유럽이 원산지인 다년생 화본과 목초로서 유럽과 아시아 지역 및 북미에 이르기까지 널리 재배되고 있는 목초종의 하나이다. 또한 티모시는 가축의 기호성과 사료가치가 우수하며 출수 직후 수확하여 건초를 만들면 매우 우수한 건초로 이용할 수 있는 큰 장점이 있다. 그러나 티모시는 고온 및 건조한 지역에서는 생육이 불량하며 고사하는 특성으로 인해 국내에서 재배 이용하기에는 많은 제약이 있다(이와 김, 2003). 국내에

서는 1970년대부터 시작된 목초 품종개발에 대해 축적된 전통육종 기반기술 정보를 활용하여 유전자원 수집 및 다양한 특성의 우량 육종모재 개발을 통해 국내기후에 적합하고 영속성과 사료가치가 우수한 목초 신품종 개발에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(최 등, 2010; 김 등, 2010). 그러나 이러한 전통육종법에 의한 신품종 개발에는 오랜 시간과 노동력이 필요하며 도입 가능한 유전형질의 제한 등으로 많은 제약이 따르는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 환경스트레스 내성 증진(Lee 등, 2007; Wang 등, 2001), 사료작물의 생

<sup>1</sup> 농촌진흥청 국립축산과학원 (National Institute of Animal Science, RDA)

<sup>2</sup> 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

장시기 조절관련 유전자 및 품질관련 향상 (Chen 등, 2003; 2004) 등 작물형질개량을 목적으로 하는 유용유전자 직접도입에 의한 품종개발 연구가 활발하게 진행되고 있다 (Forster와 Spangenberg, 1999). 이러한 유용유전자의 직접도입을 통한 신품종 육종을 위해서는 우선 효율적인 분자유종 기반기술의 체계가 확립되어야 한다.

지금까지 티모시의 조직배양에 관한 보고는 현탁배양 세포로부터 식물체 재분화에 관한 연구 (Guo와 Pulli, 2001), 성숙종자를 이용한 식물체의 재분화에 관한 연구 (Plazek 등, 1999) 등이 보고된 바 있다.

그러나 페레니얼 라이그라스 (Lee 등, 2009a) 및 이탈리아 라이그라스 (Lee 등, 2009b) 등 화본과 목초의 경우 품종에 따라서 배양효율에 많은 차이가 나타나는 경향을 보여 품종에 따른 최적의 배양조건 확립이 우선적으로 선행되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 티모시의 4가지 품종의 성숙종자로부터 높은 재분화율을 나타내는 품종을 선발하고 이를 바탕으로 유용유전자의 도입을 통한 신품종 개발을 목적으로 효율적인 기내배양 시스템을 확립하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 식물재료 및 종자소독

식물재료로는 티모시의 4가지 품종 (Colt, Chair, Richmond 및 Hokuo)을 사용하였다. 켈러스 유도율을 위한 종자의 살균은 Lee 등 (2008)의 방법에 준하여 실시하였다. 종피를 제거한 성숙종자를 70% ethanol에서 30초간 표면 살균하고 멸균수로 3회 세정한 후, 다시 5% (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,

켈러스 유도배지에 치상하였다.

### 2. 성숙종자로부터 켈러스 유도

티모시 4가지 품종의 성숙종자로부터 켈러스를 유도하기 위한 켈러스 유도배지는 MS (Murashige와 Skoog, 1962) 기본배지에 3 mg/L 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 0.1 mg/L BA (6-benzyladenine), 30 g/L sucrose 및 3 g/L Gelrite를 첨가한 배지를 사용하였다. 배지에 살균된 종자를 치상한 다음, 24±2°C의 생장실에서 암상태 및 약광조건으로 각각 4주간 배양하였다. 티모시 품종간 켈러스 유도효율은 치상한 종자에 대한 유도된 켈러스의 수를 백분율로 조사하여 비교하였다.

### 3. 식물체 재분화

티모시의 품종에 따른 식물체 재분화 효율을 조사하기 위하여 4주령의 켈러스로부터 발아된 종자의 shoot을 제거하고, 켈러스만을 취하여 N6 기본배지 (Chu 등, 1975)에 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA, 30 g/L sucrose 및 5 g/L Gelrite가 각각 첨가된 배지 (Lee 등, 2008)에 각각 총 120개의 켈러스를 이식하여 24±2°C, 16 h light/ 8 h dark 조건에서 3주간 배양한 다음 동일한 새 배지에 1회 계대배양하여, 총 6주간 배양하였다.

식물체 재분화율은 이식된 켈러스로부터 형성된 싹의 신장이 1cm 이상 자란 식물체의 수를 백분율로 나타내었다. 재분화 된 싹은 1/2 MS 배지에 이식하여 뿌리발생을 유도하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

### 4. 품종별 기본배지에 따른 배양효율

성숙종자로부터 켈러스 유도와 식물체 재분화를 위한 적정 기본배지의 종류에 따른 배양

효과를 규명하기 위하여 MS, N6 및 SH (Schenk와 Hildebrandt, 1972) 배지에 상기와 동일한 방법으로 살균된 종자 및 캘러스를 배양하여 기본배지종류에 따른 캘러스 유도 효율과 식물체 재분화율을 각각 조사하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 품종에 따른 캘러스 유도 효율

티모시 품종간의 캘러스 유도 효율을 조사하기 위하여 Colt, Chair, Richmond 및 Hokuo 품종 각각의 성숙종자를 사용하여 배발생 캘러스의 유도율을 비교한 결과 Table 1과 같이 나타났다. 4주 동안 배양한 성숙종자로부터 캘러스 유도 효율은 Colt > Chair > Richmond > Hokuo 순으로 나타났다. Colt 품종이 가장 높은 75.8%의 캘러스 유도 효율을 보였고, Chair 품종도 50% 이상의 비교적 높은 효율을 보였다. 반면 Hokuo 품종의 경우 28.3%의 가장 낮은 효율을 보였다. 이러한 품종 간의 캘러스 배양효율의 차이는 품종 자체의 genotype의 차이에 의한 효과이거나, 종자 자체의 활력의 차이 등에 기인한 결과로 추측된다.

Table 1. Effect of cultivars on callus formation from mature seed culture of Timothy

Cultivars	No. of seeds transferred <sup>a</sup>	Callus formation (%)
Colt	120	75.8±1.5
Chair	120	53.3±3.1
Richmond	120	41.7±3.1
Hokuo	120	28.3±1.2

<sup>a</sup> Dehusked mature seeds were placed on the callus induction medium and cultured for 4 weeks.

#### 2. 품종에 따른 식물체의 재분화 효율

성숙종자로 유도된 캘러스를 4주간 배양하여

재분화 배지에 옮겨 24±2℃, 16 h light/8 h dark 조건에서 6주간 배양한 다음 품종에 따른 재분화율을 조사한 결과 Table 2와 같이 나타났다. 식물체로의 재분화율은 Colt 품종이 35.8%로 가장 높은 식물체 재분화 효율을 보였고, 그의 Chair, Richmond 및 Hokuo 품종은 16.7~19.2%로 대체적으로 식물체 재분화율이 낮게 나타났다. 식물체 재분화율 또한 캘러스 유도와 마찬가지로 티모시 품종 간에 상당한 차이가 나타났으며 유도율이 높은 품종이 식물체 재분화율도 대체적으로 높은 경향을 나타내었다.

Table 2. Effect of cultivars on plant regeneration from mature seed-derived callus culture of Timothy

Cultivars	No. of calli transferred <sup>a</sup>	Plant regeneration (%)
Colt	120	35.8 ± 2.1
Chair	120	19.2 ± 0.6
Richmond	120	18.3 ± 1.2
Hokuo	120	16.7 ± 0.6

<sup>a</sup> Calli were transferred to the plant regeneration medium and cultured for 6 weeks.

티모시 품종에 따른 성숙종자로부터 캘러스 유도 및 식물체 재분화에 미치는 기본배지의 종류에 따른 배양효과를 조사하기 위하여 MS, N6 및 SH 기본배지를 사용하여 조사한 결과는 Table 3과 같이 나타났다. 캘러스 유도율은 모든 품종에서 MS 배지와 N6 배지가 SH 배지에 비해 효과적이었으며, 식물체 재분화 효율 또한 MS 배지와 N6 배지가 SH 배지에 비해 효과적인 것으로 나타났다. 특히 캘러스 유도율이 가장 높았던 Colt 품종에서는 N6 배지가 가장 높은 재분화 효율을 나타냈다.

이러한 품종 간의 배양효율의 차이는 화분과 목초인 이탈리아인 라이그라스(Lee 등, 2009b), 페레니얼 라이그라스(Lee 등, 2009a) 및 오차드그라스(Lee 등, 2006) 등에서도 보고된 바 있

Table 3. Effect of media on callus formation and plant regeneration in mature seeds cultures of Timothy

Cultivars	Culture media	No. of seeds transferred	Callus formation (%) <sup>a</sup>	No. of calli transferred	Plant regeneration (%) <sup>b</sup>
Colt	MS	120	71.7 ± 1.5	120	36.7 ± 1.2
	N6	120	68.3 ± 0.6	120	40.0 ± 1.0
	SH	120	44.2 ± 2.5	120	19.2 ± 0.6
Chair	MS	120	53.3 ± 2.1	120	17.5 ± 1.7
	N6	120	50.8 ± 2.1	120	17.5 ± 1.7
	SH	120	31.7 ± 1.2	120	10.8 ± 0.6
Richmond	MS	120	45.8 ± 1.2	120	16.7 ± 1.2
	N6	120	44.2 ± 1.5	120	15.8 ± 0.6
	SH	120	22.5 ± 1.0	120	9.2 ± 0.6
Hokuo	MS	120	24.2 ± 2.1	120	14.2 ± 0.6
	N6	120	25.8 ± 2.1	120	13.3 ± 1.5
	SH	120	17.5 ± 1.0	120	7.5 ± 1.0

<sup>a</sup> Calli cultured on the callus induction medium were used.

<sup>b</sup> Calli were transferred to the regeneration medium and cultured for 6 weeks.

다. 또한 식물체의 배양효율에 있어서 동일한 초종에서도 품종, 식물생장조절물질의 종류와 농도, 배양 배지에 첨가되는 물질에 따라 많은 차이가 나타난다 (Somers 등, 2003). 따라서, 본 실험에서 밝혀진 품종별 배양효율은 유용유전자를 이용한 형질전환 티모시 개발에 있어서 유용한 결과로 활용되어 질 수 있을 것이다.

본 실험을 통하여 4가지 티모시 품종을 사용하여 캘러스유도와 식물체 재분화 효율에 미치는 영향을 조사하였다. 식물체 재분화율이 우수한 'Colt' 품종의 성숙종자를 배양했을 때 캘러스 유도배지에서 배양 4일째부터 캘러스가 형성되기 시작하여 4주 후에는 70% 이상이 형성되었으며 (Fig. 1A), 이들을 식물체 재분화 배지에 이식했을 때 배양 6주 후에는 높은 빈도로 신태가 재분화 되었다 (Fig. 1B,C). 재분화된 신태는 1/2 MS로 구성된 rooting 배지 (Fig. 1D)에서 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후, pot에 이식하여 순화시킨 다음 포장에 이식하

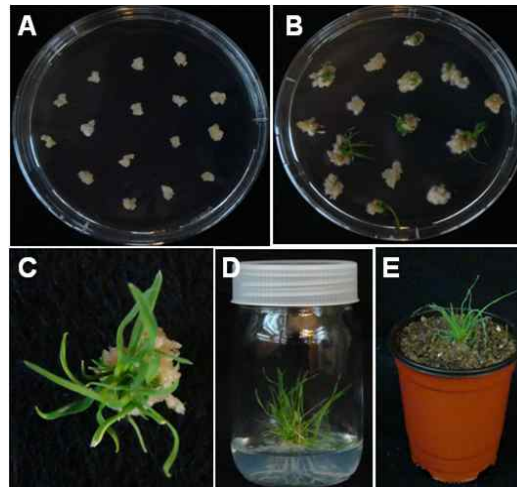


Fig. 1. Plant regeneration from seed-derived callus of Timothy. A, callus induced from mature seeds cultured on the callus induction medium; B-D, Plant regeneration from embryogenic calli in the regeneration medium; E Whole plants grown in pots under green house.

여 재배하였다 (Fig. 1E). 본 실험을 통하여 밝혀진 품종 간의 배양효율에 대한 결과는 유용 유전자 도입을 통한 형질전환 티모시 개발에 있어서 유용한 자료로 활용될 수 있을 것이다.

#### IV. 요약

티모시의 4가지 품종을 이용하여 성숙종자로부터 캘러스 유도 및 식물체 재분화 효율을 조사하였다.

4주 동안 배양한 종자로부터 캘러스 유도율은 Colt, Chair, Richmond, Hokuo 순으로 캘러스 유도율을 보였고, 식물체로의 재분화 또한 캘러스 유도율과 같은 Colt > Chair > Richmond > Hokuo 순으로 나타났다. 기본 배지의 종류에 따른 배양 효율의 차이는 품종별 차이는 있으나 MS 배지가, 식물체 재분화는 N6 배지와 MS 배지가 SH 배지에 비해 효과적이었다.

전체적으로는 캘러스 유도율이 높은 품종이 식물체 재분화율도 높은 경향을 나타내었다. 본 연구를 통하여 밝혀진 캘러스 유도와 식물체 재분화율이 우수한 Colt 품종은 유용유전자 도입을 통한 신품종 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

#### V. 사사

본 연구는 2011년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후 연수과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

#### VI. 인용문헌

1. 김기용, 지희정, 이상훈, 이기원, 김원호, 정민웅, 서성, 최기준. 2010. 이탈리아 라이그라스 춘파 재배에서 조·만성 품종간 생산성 비교. 초지조사료지. 30(2):97-102.
2. 이효원, 김동암. 2003. 초지학. 한국방송통신대학교출판부. pp. 117-119.
3. 최기준, 임영철, 지희정, 김기용, 박형수, 서성,

- 문정섭, 김대호, 이상훈. 2010. 내재해 다수성 톨페스큐 신품종 “그린마스터”의 품종 특성. 한국초지조사료지 30(3):199-204.
4. Chen, L., C. 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.
5. Chen, L., C. Auh, P. Dowling, J. Bell, D. Lehmann and Z.-Y. Wang. 2004. Transgenic down-regulation of caffeic acid O-methyltransferase (COMT) led to improved digestibility in tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Funct Plant Biol.* 31:235-245.
6. 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 Sinica.* 18:659-668.
7. Forster J.W. and G. Spangenberg. 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
8. Guo, Y.D. and S. Pulli. 2001. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of timothy (*Phleum pratense* L.). *Act Agr Scand B-S P.* 51:160-166.
9. Lee, K.-W., S.-H. Lee, D.-G. Lee, D.-H. Kim and B.-H. Lee. 2006. Effect of orchardgrass varieties on callus culture and plant regeneration. *J. Korean Grassl. Sci.* 26:191-198.
10. Lee, K.-W., K.-Y. Kim, G.J. Choi, Y.C. Lim, W.H. Kim, M.W. Jung, S. Seo, B.-H. Lee and S.-H. Lee. 2008. Callus Induction and plant regeneration from mature seeds of timothy. *J. Kor. Grassl. Forage Sci.* 28:165-170.
11. Lee, K.-W., J.K. Lee, K.-Y. Kim, H.C. Ji, H.S. Park, K.-H. Kim, B.-H. Lee and S.-H. Lee. 2009a. Plant regeneration capacity of calluses derived from mature seed of perennial ryegrass cultivars. *J. Kor. Grassl. Forage Sci.* 29:285-290.
12. Lee, K.-W., G.J. Choi, K.-Y. Kim, H.C. Ji, H.S. Park, S.H. Yoon. and S.-H. Lee. 2009b. High

- frequency plant regeneration from mature seed derived callus of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) cultivars. African Journal of Biotechnology. 8 (24), pp. 6828-6833.
13. Lee, S.-H., N. Ahsan, K.-W. Lee, D.-H. Kim, D.-G. Lee, S.S. Kwak, S.-Y. Kwon, T.H. Kim and B.-H. Lee. 2007. Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. J Plant Physiol. 164:1626-1638.
  14. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 15:473-497.
  15. Plazek, A., M. Filek and M. Wfdzony. 1999. Improvement of regeneration ability in *Phleum pratense* L. *in vitro* culture by dicamba. Acta Physiologiae Plantarum. 21:397-403.
  16. Schenk, R. U and A. C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot 50:199-204.
  17. Somers, D. A., D. A. Samac and P. M. Olhoft. 2003. Recent advances in legume transformation. Plant Physiol. 131:892-899.
  18. 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.
  19. Wang, Z.-Y., X.D. Ye, J. Nagel, I. Potrykus and G. Spangenberg. 2001. Expression of a sulphur-rich sunflower albumin gene in transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants. Plant Cell Rep. 20:213-219.
- (접수일: 2011년 4월 29일, 수정일 1차: 2011년 5월 23일, 수정일 2차: 2011년 6월 2일, 게재확정일: 2011년 7월 5일)