

Siberian Wildrye Grass의 성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체 재분화

이기원 · 오치르바트 친저르익 · 최기준 · 윤세형 · 김기용 · 지희정 · 이상훈

In Vitro Plant Regeneration of Siberian Wildrye Grass from Mature Seed-derived Callus

Ki-Won Lee, Ochirbat Chinzorig, Gi Jun Choi, Sei Hyung Yoon, Ki-Yong Kim,
Hee Chung Ji and Sang-Hoon Lee

ABSTRACT

Success in molecular breeding for better adapted varieties to environmental stresses depend upon the concerted efforts by various research including tissue culture, transformation, genetics and breeding. In order to optimize tissue culture conditions of Siberian wildrye grass, the effects of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration were investigated with mature seeds. The highest callus induction frequency was observed when the mature seeds were cultured on MS medium supplemented with 5 mg/L 2,4-D. The highest plant regeneration frequency was observed when callus was transferred to N6 medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D and 3 mg/L BA. Regenerated plants were grown normally when shoots were transplanted to the soil. A short tissue culture period and regeneration system would be beneficial for molecular breeding of Siberian wildrye grass by the production of transgenic plant.

(**Key words** : Siberian wildrye grass, Callus, Plant regeneration, Plant growth regulators)

I. 서 론

Siberian wildrye grass는 가뭄과 추위에 강한 특성이 있어 몽골지역 방목 초지에 넓게 분포하는 대표적인 초종중의 하나이다. Siberian wildrye grass는 단백질 함량이 높고 사료가치가 높고 장기간 이용 할 수 있는 장점 등으로 인해 야생 초자원의 유지와 이용확대를 위하여 그 중요성이 점차 증대되고 있는 추세이다(Li와 Bai, 1998; Wang 등, 2009).

그러나 최근 급격한 이상기후 변화와 가축의 과방목에 의해 몽골지역의 사막화가 급속하게

진행됨에 따라 그 식생 면적이 급격하게 줄어들고 있는 실정이다. 또한 몽골은 전통적으로 환경에 순응하는 목축경영법의 유목생활을 하기 때문에 초지의 면적은 지속적으로 감소하고 있으나 가축 사육두수는 계속 증가하고 있는 추세에 있다. 이러한 이유로 인해 급격한 사막화의 진행은 국제적인 환경 문제로 많은 관심이 집중되고 있다(Otgonjargal, 2008).

Siberian wildrye grass는 몽골지역에서 가축 방목을 위한 안정적인 풀사료 공급원 뿐만 아니라 토양보존용 등으로도 중요성이 강조되고 있다. 따라서 몽골지역의 극한 다양한 환경요

농촌진흥청 국립축산과학원 (National Institute of Animal Science, RDA)

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

인에 의한 수량저하를 방지하고 초지 식생대에서 생산성 유지와 향상을 위해서는 다양한 환경 재해내성 신품종 사료작물 개발이 필수 불가결한 조건이다.

지금까지 Siberian wildrye grass의 조직배양에 관한 연구는 Li 등 (2006)에 의해 mature embryo, mesocotyl 그리고 leaf tip을 이용한 재분화에 관한 보고는 있으나 아직 다른 작물에 비해 그 중요성이 부각되지 못한 탓으로 인해 분자유종 기술을 이용한 신품종 개발에 관한 연구는 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 사료작물 분자유종 기술을 이용한 신품종 Siberian wildrye grass 개발을 목적으로 Siberian wildrye grass의 성숙종자로부터 캘러스의 유도 조건과 최적의 조직배양 시스템을 확립하여 환경재해 저항성 유전자의 직접 도입을 통한 신품종 개발에 관한 기초자료로 활용하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 종자살균

식물재료로는 몽골에서 자생하고 있는 Siberian wildrye grass (*Elymus sibiricus* L.)의 생태형 수집 종자를 Mongolian Forage Seed Producer's Association로부터 분양받아 사용하였다. 성숙종자의 종피를 제거하기 위해 50% sulfuric acid (H₂SO₄)에서 30 분간 처리한 다음 멸균수로 5회 이상 세정하였다. 종피가 제거된 Siberian wildrye grass 종자는 다시 70% ethanol에 1분간 살균한 후, 30% (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. 성장조절 물질에 따른 캘러스 유도

성숙종자로부터 캘러스를 유도하기 위한 캘러스유도 배지는 MS (Murashige와 Skoog, 1962) 기본배지에 0.5 g/L L-proline, 0.5 g/L casamino acid, 30 g/L sucrose와 3 g/L gelrite를 첨가한 배지를 사용하였다. 캘러스 유도시의 성장조절제의 종류와 농도에 따른 캘러스유도 효율을 조사하기 위하여 캘러스유도 배지에 성장조절물질로는 auxin류의 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid), dicamba (3,6-dichloro-o-anisic acid), NAA (α -naphthalene acetic acid) 및 IAA (indole acetic acid)를 단용 첨가한 배지를 사용하였다. 배지에 살균된 종자를 치상한 다음, 24 \pm 2 $^{\circ}$ C의 성장실에서 암조건으로 4주간 배양한 후 동일한 조건의 배지에서 2주 간격으로 계대배양하여 실험재료로 사용하였다. 캘러스의 형성은 치상한 종자에 대한 유도된 캘러스의 수를 백분율로 나타내었다.

3. 캘러스로부터 식물체 재분화

성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체 재분화를 위한 적정 성장조절물질의 종류와 농도를 조사하기 위하여 배발생 캘러스를 직경 3~4 mm 크기로 잘라 auxin과 cytokinin이 각각 혼용 첨가된 N6 배지 (Chu 등, 1975)에 0.5 g/L L-proline, 0.5 g/L casamino acid, 3% sucrose 및 3 g/L gelrite가 첨가된 재분화 배지에 옮겨 24 \pm 2 $^{\circ}$ C, 16 h light/8 h dark 조건에서 3주간 배양한 다음 동일한 새 배지에 1회 계대배양한 후, 총 6주 동안 배양하였다. 식물체 재분화는 각각의 처리구에서 형성된 shoot을 재분화 된 개체로 조사하여 이식된 캘러스에 대한 재분화된 캘러스의 수를 백분율로 나타내었다. 재분화된 shoot은 1/2 MS 배지에 이식하여 뿌리발생을 유도하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

4. 기본배지의 종류에 따른 배양효과

성숙종자로부터 캘러스 유도과 식물체 재분화를 위한 적정 기본배지의 종류에 따른 배양 효과를 규명하기 위하여 MS, N6 및 SH (Schenk와 Hildebrandt, 1972) 배지에 확립된 최적의 성장조절물질을 첨가하여 상기와 동일한 방법으로 살균된 종자 및 캘러스를 배양하여 기본배지종류에 따른 캘러스 유도 효율과 식물체 재분화율을 각각 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 성장조절물질의 농도와 종류에 따른 캘러스 유도 효율

Siberian wildrye grass의 성숙종자로부터 캘러스 유도 배지에 첨가되는 성장조절물질의 종류

와 농도에 따른 배양효과를 조사하기 위하여 여러 가지 auxin을 종류별로 다양한 농도로 첨가한 배지에서 캘러스 유도효율을 조사한 결과 Fig. 1과 같이 나타났다.

캘러스의 유도율은 2,4-D와 dicamba 처리구가 NAA 또는 IAA 첨가구보다 전체적으로 높은 효율을 보였으며 캘러스의 증식속도도 비교적 우수하였다. 2,4-D 처리구의 경우 5 mg/L 농도로 첨가해 주었을 때 58.6%의 가장 높은 캘러스 유도율을 나타내었다. 또한, 2,4-D 첨가농도가 낮아질수록 캘러스 유도효율이 조금씩 감소하였으며, 이보다 높은 농도에서는 캘러스가 갈변하면서 고사하는 현상을 보였다. Dicamba 처리구의 경우도 캘러스 유도율은 5 mg/L에서 53.1%로 가장 높았으며 2,4-D 처리구의 경우와 유사한 경향을 나타내었다. NAA와 IAA 처리

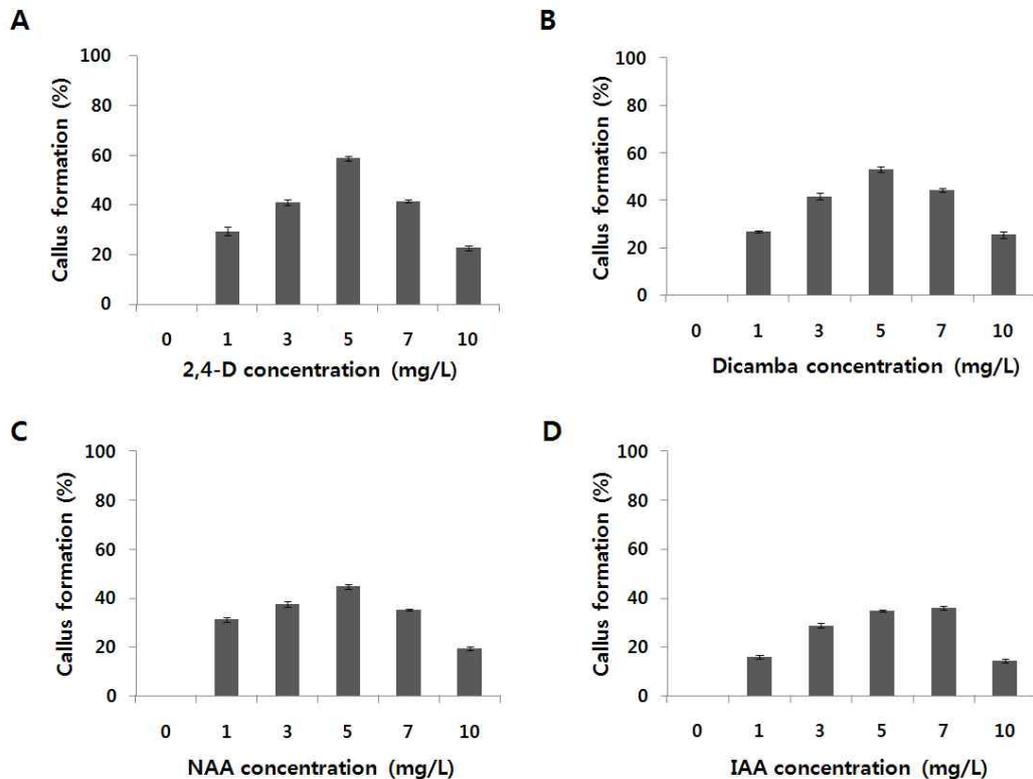


Fig. 1. Effect of different concentrations of auxins on callus formation from mature seeds of Siberian wildrye grass. Data represents the means and standard deviation (SD) of three independent experiments.

구에서는 17~40% 정도의 캘러스 유도율을 보였으며 전체적으로 모든 농도에서 캘러스가 갈변화 하는 경향을 나타내었다.

2. 성장조절물질 종류에 따른 식물체의 재분화

Siberian wildrye grass의 재분화에 영향을 미치는 최적의 cytokinin의 종류와 농도를 조사한 결과 Table 1과 같이 나타났다. 캘러스유도 효율이 가장 우수했던 5 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지에서 형성된 캘러스를 이용하여 BA와 kinetin을 각각 1, 2, 3 mg/L의 농도로 첨가한 재분화 배지에서 배양해 본 결과 3 mg/L BA가 43%로 가장 높은 재분화 효율을 나타내었고 2 mg/L kinetin이 28%로 낮은 재분화 효율을 나타내었다. 따라서 Siberian wildrye grass의 재분화 배지에 첨가되는 단용 cytokinin류로는 BA가 Kinetin에 비해 식물체 재분화에 효과적인 것으로 확인 할 수 있었다.

Table 1. Effect of different concentration of cytokinins on plant regeneration from mature seeds-derived callus of Siberian wildrye grass

Cytokinins (mg/L)	No. of calli transferred	Plant regeneration (%) ^a
BA	1	23±3.2
	2	34±3.6
	3	43±2.6
Kinetin	1	17±2.5
	2	28±2.1
	3	26±2.1

^a Values represent the mean±standard deviation (SD) of three independent experiments.

또한, auxin과 cytokinin을 혼용 처리 했을 때 식물체 재분화 효율을 조사한 결과 Table 2과 같이 나타났다. 다양한 농도의 혼용 처리구 중에서 1 mg/L 2,4-D와 3 mg/L BA가 첨가된 처

리구에서 58%의 가장 높은 재분화 효율을 나타내었다. 따라서 Siberian wildrye grass 재분화에는 cytokinin 단용 처리구 보다 2,4-D와 BA 혼용 처리가 효과적인 것으로 확인할 수 있었다.

화본과 목초를 기내배양함에 있어 재분화에 서 저농도의 auxin과 고농도의 cytokinin를 첨가해주는 것이 재분화 효율을 개선시킨다는 결과가 다른 작물 (Griffin와 Dibble, 1995; Chaudhury와 Rongda, 2000)에서도 보고된 바 있다.

Table 2. Effect of mixed treatments of auxins and cytokinins on plant regeneration from mature seeds-derived callus of Siberian wildrye grass

Growth regulators (mg/L)	No. of calli transferred	Plant regeneration (%) ^a
2,4-D	BA	
1	3	100
2	3	100
2,4-D	Kinetin	
1	3	100
2	3	100
NAA	BA	
1	3	100
2	3	100
NAA	Kinetin	
1	3	100
2	3	100

^a Values represent the mean±standard deviation (SD) of three independent experiments.

3. 기본배지의 종류에 따른 배양효율

Siberian wildrye grass의 성숙종자로부터 캘러스유도 및 식물체 재분화에 미치는 기본배지의 종류에 따른 배양효과를 조사하기 위하여 MS, N6 및 SH 기본배지를 사용하여 조사한 결과는 Table 3과 같이 나타났다. 캘러스 유도율은 MS 배지가 N6 배지와 SH 배지에 비해 효과적이었으며, 식물체 재분화 효율은 MS 배지와 SH 배지가 각각 42%와 27%의 재분화 효율을 나타낸 반면 N6 배지는 이에 비해 월등히 높은

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

Media	No. of seeds transferred	Callus formation (%) ^a	No. of calli transferred	Plant regeneration (%) ^b
MS	120	54.0	100	42.0
N6	120	49.3	100	58.0
SH	120	29.5	100	27.0

^a Calli cultured on the callus induction medium were used.

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

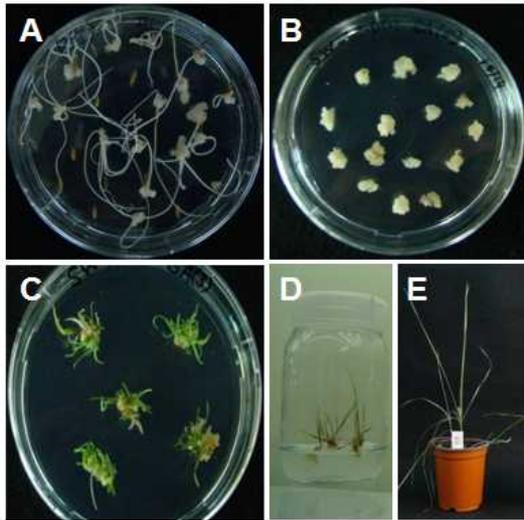


Fig. 2. Plant regeneration from seed-derived callus of Siberian wildrye grass.

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

58%의 재분화 효율을 나타내어 가장 효과적인 것으로 나타났다. 이러한 유사한 결과가 화본과 목초인 오차드그라스(이 등, 2003), 켄터키 블루그라스(이 등, 2005) 등에서도 보고 된 바 있다.

본 실험을 통하여 Siberian wildrye grass의 성숙종자로부터 효율적인 재분화 식물체를 획득할 수 있는 조직배양체계를 확립하였다. 성

숙종자를 캘러스유도 배지에서 배양한 결과 배양 5일째부터 배발생 캘러스가 형성되기 시작하여 6주 후에는 50% 이상 형성되었으며 (Fig. 2A, B), 재분화 배지에 이식했을 때 배양 6주 후에는 약 50% 이상의 높은 빈도로 신초가 재분화 되었다 (Fig. 1C). 재분화된 신초는 rooting 배지 (Fig. 1D)에서 2주간 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 pot에 이식하여 재배할 수 있었다 (Fig. 1E).

IV. 요약

Siberian wildrye grass는 몽골지역 방목 초지에 넓게 분포하는 대표적인 초종으로 사료가치가 높고 장기간 이용 할 수 있는 장점 등으로 그 중요성이 증대되고 있다. 그러나 최근 기후 변화로 인한 사막화로 초지의 면적이 점점 줄어들고 있는 추세이다. 따라서 환경에 대한 적응성이 우수한 신품종을 개발할 목적으로 우선 효율적인 기내배양 조건을 확립하고자 하였다. Siberian wildrye grass의 최적의 기내배양 조건을 확립하기 위하여 몽골에서 수집한 성숙종자로부터 최적 캘러스 유도조건 및 효율적인 식물체 재분화 체계를 확립하였다. 캘러스는 5 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 배지에서 가장 높은 빈도로 유도되었으며, 식물체 재분화는 1 mg/L 2,4-D와 3 mg/L BA가 첨가된 N6 배지에서 캘러스를 배양했을 때 50% 이상의 재분화율을 나타내었다. 본 연구를 통하여 확립된 기내배

양 시스템은 분자유종을 통한 신품종 siberian wildrye grass의 개발에 유용하게 이용되어질 수 있을 것이다.

V. 사 사

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

VI. 인 용 문 헌

1. 이상훈, 이동기, 김진수, 이병현. 2003. 오차드그래스 성숙종자로부터 캘러스 유도 및 고효율 식물체 재분화. 한국식물생명공학회지 30(4):341-346.
2. 이기원, 이상훈, 이동기, 우현숙, 김도현, 최명석, 원성혜, 서성, 이병현. 2005. 켄터키 블루그래스에 있어서 캘러스 배양 및 식물체 재분화에 미치는 요인의 영향. 한국동물자원과학회지 47(6): 1067-1074.
3. Chaudhury, A. and Rongda. Q. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type Bermuda grass: effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. Plant Cell Tiss Org Cult. 60:113-120.
4. 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.
5. Griffin, J.D. and M.S. Dibble. 1995. High-frequency plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). Plant Cell Rep. 14:721-724.
6. Li, C.W. and Z.Q. Bai. 1998. A new excellent grass of the northwest grassland area - *Elymus sibiricus* L. cv. 'chuancao No. 2'. Grassland in Sichuan. 4:24-25.
7. Li, Daxu, Jie. Zhang, Jian. Zhao, Yi. Zhang, Fei. Chen, Jingqiu. Zhu, Shujun. Liu and Zhirong. Yang. 2006. Plant regeneration via somatic embryogenesis of *Elymus sibiricus* cv. 'chuancao No. 2', Plant Cell Tiss Org Cult. 84:285-292.
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. Otgonjargal, Lkhazal. 2008. 몽골의 축산물 유통에 관한 연구. 전북대학교 박사학위 논문.
10. 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.
11. Wang, Hao, Zizhong. Li, Yuanshi. Gong, Zhongyan. Wang and Ding. Huang. 2009. Single Irrigation Can Achieve Relatively High Production and Water Use Efficiency of Siberian Wildrye Grass in the Semiarid Agropastoral Ecotone of North China. Agronomy Journal. 101:996-1002.

(접수일: 2011년 6월 7일, 수정일 1차: 2011년 6월 27일, 수정일 2차: 2011년 7월 13일, 게재확정일: 2011년 7월 20일)