

이탈리안 라이그라스 품종별 NaCl 처리가 발아 및 초기생육에 미치는 영향

이상훈¹ · 최기준¹ · 이동기² · 문진용¹ · 김기용¹ · 지희정¹ · 박형수¹ · 이기원^{1*}

¹농촌진흥청 국립축산과학원, ²한국기초과학지원연구원 생명과학연구부

Effects of Sodium Chloride Treatment on Seed Germination and Seedling Growth of Italian Ryegrass Cultivars

Sang-Hoon Lee¹, Gi Jun Choi¹, Dong-Gi Lee², Jin-Yong Mun¹, Ki-Yong Kim¹, Hee Jung Ji¹, Hyung Soo Park¹ and Ki-Won Lee^{1*}

¹National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Cheonan 330-801, Korea, ²Division of Life Sciences, Korea Basic Science Institute, Daejeon, 305-806, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the performance of Italian ryegrass cultivars for salt tolerance under *in vitro* condition. Italian ryegrass cultivars such as Greenfarm, Florida80, Kowinearly, and Hwasan101 were tested for their tolerance to various sodium chloride levels (0, 50, 150, 250, and 350 mM). The seed germination, growth, and activities of antioxidant enzymes were investigated under salt treatment. Physiological traits such as seed germination percentage, germination period, shoot and root length, and dry weight were suppressed under entire salt stress conditions. The results indicated that the highest germination percentage and shoot and root length were recorded at normal conditions. Increased sodium chloride levels caused a significant reduction in the seed germination and growth rate. Among the four tested cultivars, Italian ryegrass 'Hwasan101' could be considered as salt tolerant owing to its higher germination percentage, better seedling growth and antioxidant activities under salinity stress, whereas Greenfarm cultivar was more sensitive. The selection of Italian ryegrass cultivars for greater tolerance to saline environment would allow greater productivity from large saline lands.

(Key words : Italian ryegrass, Salinity, Seed germination, Forage)

I. 서 론

토양에 과대하게 축적된 염농도는 작물의 생산성과 품질을 저해하는 중요한 요인중의 하나이다. 고염도 지역은 농작물의 재배가 가능한 지역보다 3배 이상 넓은 것으로 알려져 있으며, 고염도 농작물 재배지역의 확산은 전 세계를 망라하여 농작물 생산성 감소에 주요한 원인중의 하나로 지목되고 있다 (Binzel and Reuveni, 1994). 토양내에 과다하게 존재하는 수용성 염은 세포내에 삼투압의 불균형을 초래하여 다양한 2차 산화 스트레스를 야기 시킨다. 작물이 고염에 노출 되었을 경우 형태, 생리 및 대사작용에 복합적인 변화를 동반하며 광합성, 호흡, 질소고정 및 탄수화물 대사에 관여하는 생리학적 pathway가 영향을 받는다고 보고되었다 (Chen et al., 2008). 또한, 토양 중에 Na과 Cl가

고농도로 존재하면 작물은 염해 스트레스를 받으며, 이는 독성, 수분포텐셜의 저하, 이온의 흡수 및 수송의 억제에 의한 불균형을 일으켜 작물의 생산성 감소와 초기생육을 저하시키는 요인이 된다.

특히 종자의 발아에 있어서 고염도의 토양조건은 종자의 발아를 저해하는 가장 중요한 요인이며 (Fricke et al., 2006) 작물의 생육과 직결되는 외부 환경 자극이다. 일반적으로 사료작물의 염해에 대한 반응은 초종, 품종 및 생육단계에 따라 다르게 나타나고 있어 작물의 내염성 수준 정도를 단순하게 해석하는 것은 매우 어려운 일이다. 따라서 내염성 품종을 개발하기 위해서는 체계적인 계통선발 기술개발 및 특성평가의 접근이 필요할 것으로 판단된다.

이탈리안 라이그라스 (*Lolium multiflorum* Lam.)는 사료가치가 높고 가축의 기호성이 좋고 사일리지 조제에도 적합

* Corresponding author : Ki-Won Lee, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 330-801, Korea. Tel: +82-41-580-6757, Fax: +82-41-580-6779, E-mail: kiwon@korea.kr

하며 특히 최근에는 건조로도 그 이용 가치가 매우 높은 사료작물로 평가되고 있다(Park et al., 2013).

본 연구는 이탈리아 라이그라스 내염성 품종개발에 필요한 기초자료를 확보하기 위하여 *in vitro* 조건에서 다양한 염농도 조건을 처리하여 품종간의 발아율, 초기생육 및 산화 스트레스 관련 효소들의 활성 등을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험품종 및 NaCl 처리

출수기가 다른 이탈리아 라이그라스 4품종을 사용하였다. 극조생 품종으로는 그린팜, 조생 품종으로는 플로리다80과 코윈어리, 만생 품종으로 화산101호를 각각 사용하였다. 이탈리아 라이그라스 성숙종자를 이 등(2010)의 방법으로 70% ethanol에서 30초간 5% sodium hypochlorite 용액을 첨가하여 30분간 교반하면서 표면살균 하였다. 소독한 종자는 9 cm petri dish에 여과지(Whatman No.1)를 3장 깔고 NaCl 용액의 농도를 0, 50, 150, 250 및 350 mM로 각각 조제하여 100립씩 3반복으로 치상하여 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 16 h light/8 h dark 조건의 생장실에서 배양하였다. 각 처리구들은 2일 간격으로 NaCl 농도별 5 mL 씩 공급하였다.

2. 발아율, 초기생육 및 식물체 무게 측정

이탈리아 라이그라스 품종별 발아율 측정은 치상 2주 후 발아된 개체를 조사 조사하였다. 또한 NaCl 처리 농도에 따른 발아 진행 상태를 5일 간격으로 하여 20일 동안 조사하였다. 발아된 개체들의 초기 생육을 조사하기 위하여 발아 2주 후 NaCl 처리 농도별 발아된 식물체의 shoot 과 root의 길이를 각 처리구별 5반복으로 조사하였다. 발아된 유식물체의 생체중 측정은 5개체씩 5반복으로 측정 후 70°C 건조기에서 48시간 동안 건조한 후 건조 무게를 측정하였다.

3. 항산화효소 활성 분석

APX와 POD 효소활성의 효소활성 분석방법은 다음과 같다. 먼저 단백질 추출버퍼를 사용하여 유식물체 잎 조직에서 총 수용성 단백질을 분리한 후 Bio-Rad protein assay 용액을 사용하여 단백질 함량을 정량 하였다(Bradford, 1976). Ascorbate 산화는 290 nm 파장에서 1분 30초간 H_2O_2 에 의해 시작되어 감소되는 것을 측정하였다. APX 효

소활성 반응의 측정은 단백질 추출액과 40 mM HEPES (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, 0.03 mM AsA, 0.1 mM H_2O_2 를 사용하였다. APX 효소활성은 ascorbic acid의 산화 정도(흡광계수: $2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)에 의해 Nakano and Asada(1981)의 방법대로 분석되었다. APX 효소활성 1 unit은 1 mmol의 ascorbate가 산화되는데 필요한 효소량으로 나타내었다. POD 효소활성 효소활성 반응의 측정은 단백질 추출액 및 10 mM potassium phosphate (pH 6.0), 7.8 mM H_2O_2 , 0.5% pyrogallol의 혼합액을 사용하였다. POD 효소활성 1 unit은 pyrogallol이 1 mg의 purpurogallin으로 전환되는데 필요한 효소량으로 나타내었다.

III. 결과 및 고찰

1. NaCl 농도에 따른 발아율

국내육성 이탈리아 라이그라스의 발아율은 Fig. 1과 같이 나타났다. NaCl 무처리구에서 그린팜 73.3%, 플로리다80 98%, 코윈어리 78% 및 화산101호 94.7%로 나타났다. 50 mM 저농도의 NaCl 처리구에서는 모든 품종에서 발아율의 차이가 1~3% 정도 감소하는 경향을 보였다. 150 mM의 NaCl 처리구에서의 경우 극조생 그린팜 품종은 발아율이 63% 이상 급격하게 감소하기 시작하였으나 조생종 플로리다80과 코윈어리 품종은 6% 내외, 만생종 화산 101호 품종은 2% 내외로 큰 차이가 나타나지 않았다. 250 mM 이상의 NaCl 처리구에는 모든 품종에서 50% 이상의 발아율 감소를 보였으나 화산 101호 품종은 발아율 감소가 33% 내외로 가장 높은 발아율을 보였으며 350 mM의 NaCl 처리구에도 약 12%의 발아율을 보여 만생종인 화산101호 품종이 *in vitro* 선발에서 염해에 대한 내성이 우수한 것으로

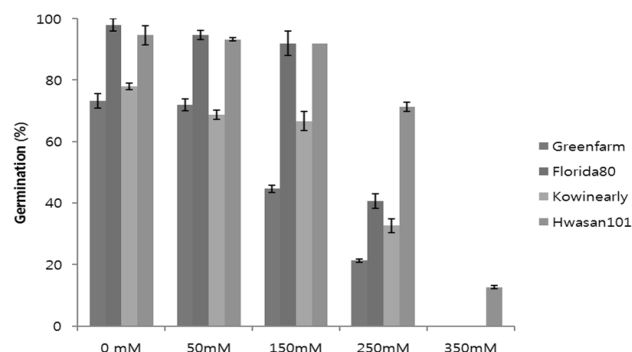


Fig. 1. Seed germination percentage (%) of four Italian ryegrass cultivars under different levels of NaCl. Each value is a mean of three replicates \pm standard error of mean.

나타났다.

고염 스트레스는 작물의 성장기간 동안 모든 생육발달 단계에 영향을 미치기 때문에 작물 생산성 감소에 주요인이다. 작물은 생육단계에 따라 염류에 반응하는 현상이 다르게 나타나며, 또한 품종 및 염 축적 상황에 따라서도 그 현상이 다르게 나타난다고 보고되고 있다(Alam et al., 2004; Theerakulpisut et al., 2005).

국내육성 이탈리아 라이그라스의 품종별 NaCl 처리구에 따른 발아율의 변화는 Fig. 2와 같이 나타났다. NaCl 무처리구에는 모든 품종에서 2~3일 후부터 발아가 진행되기 시작하였으며 발아 2주후 품종간의 차이는 있으나 73.3%~94.7%로 나타났다(Fig. 2A). NaCl이 첨가된 모든 처리구에 NaCl 농도가 높아질수록 발아에 걸리는 시간이 지연되었으며(Fig. 2B, 2C, 2D), 350 mM NaCl이 첨가된 처리구에서 화산101호 품종만이 치상 10일 후에 발아가 시작되는 경향을 보였다.

토양에 과대하게 축적된 염농도는 종자의 발아와 유식물의 생육에 피해를 일으키는 중요한 요인이다(Akbari et al., 2007; Azza et al., 2007; Feizi et al., 2007). 특히 종자의 발아와 초기 생육 기간이 후기 생육에 비하여 고염에 의한 장애를 더 입는 것으로 보고되고 있다(Almansouri et al., 2001). 따라서 발아시기와 초기 생육기간에 우수한 내염성 형질을 관찰하고 선발하는 것이 내염성 계통과 품종을 선

발하는데 중요한 기준이 될 수 있을 것으로 판단된다.

2. NaCl 농도에 따른 shoot과 root의 길이

NaCl 처리에 따른 국내육성 이탈리아 라이그라스의 생육을 조사하기 위하여 배양 2주후 shoot과 root의 길이를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. NaCl이 첨가되지 않은 무처리구에서 품종별 shoot의 길이는 8.6 cm~9.6 cm(Fig. 3A), root의 길이는 8.1 cm~9.8 cm의 범위였다(Fig. 3B). 모든 품종은 NaCl 농도가 높아질수록 shoot과 root의 길이가 감소하기 시작하였다. 250 mM NaCl이 첨가된 처리구에 그린팜, 플로리다80, 코윈어리 및 화산101호의 초장은 각각 1.1, 2.5, 2.4 및 3.5 cm로 만생품종 일수록 shoot의 길이가 더 신장된 경향을 보였으며 350 mM 이상 NaCl 처리구에서 모든 품종에서 shoot이 자라지 않았다(Fig. 3A). Root의 길이는 150 mM NaCl이 첨가된 처리구에서 부터 급격하게 감소하기 시작하여 그린팜, 플로리다80, 코윈어리 및 화산101호의 shoot의 길이가 각각 12.1, 3.9, 4.4, 및 4.7 cm로 나타났으며, shoot의 생육과 마찬가지로 만생품종 일수록 root의 길이 생육이 우수하였다. 화산101 품종의 경우 350 mM 이상 고농도의 NaCl 처리구에서 shoot은 자라지 않았지만 약 0.5 cm의 root의 발육이 있었다. 벼와 양배추를 이용한 연구에서 NaCl 처리는 종자의 발아, shoot 및 root의

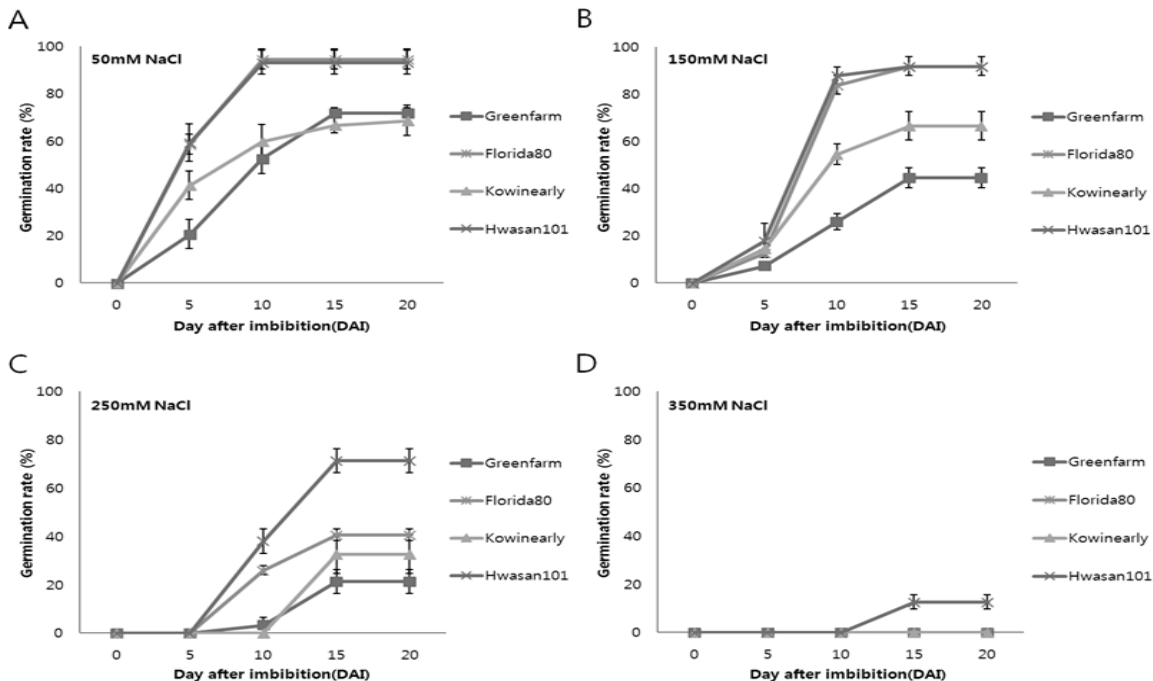


Fig. 2. Seed germination percentage (%) after imbibition of four Italian ryegrass cultivars under different levels of NaCl. Each value is a mean of three replicates \pm standard error of mean.

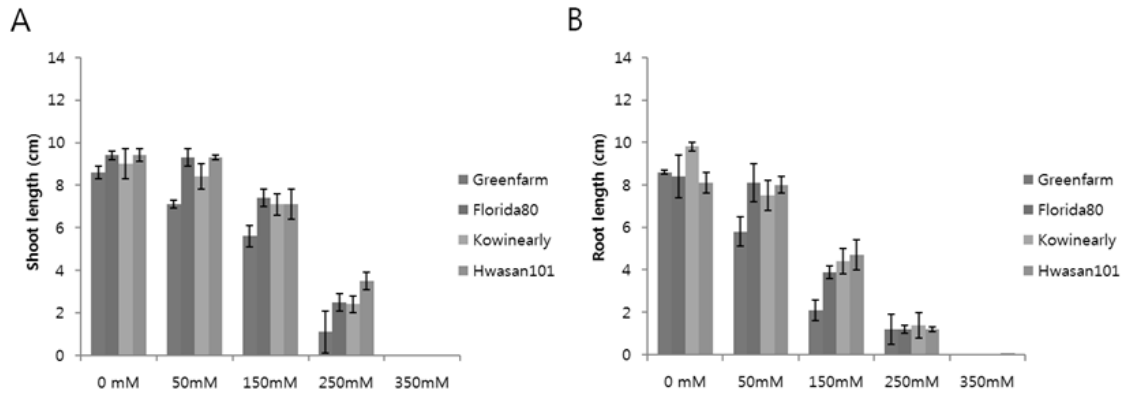


Fig. 3. Effect of salinity stress on shoot (A) and root growth (B) of four Italian ryegrass cultivars. Plants were treated with 0, 50, 150, 250 and 350 mM NaCl and used to take length measurement. Data points and vertical bars represent means of replicates and standard error, respectively.

생육을 억제하였다고 보고된 바 있으며 (Jamil et al., 2007; Sheng et al., 2011), 또한 Razzaque 등 (2009)은 7가지 벼 품종을 이용하여 고염에 의한 초장, shoot, root 및 건물 중량에 역효과가 있음을 보고하였다. 이러한 것은 삼투압 조절이나 이온 독성이 원인이 되어 종자 발아 장애의 원인으로 알려져 있다 (Huang and Remann, 1995; Ali et al., 2004).

3. NaCl 농도에 따른 생초와 건조 후 무게

다양한 농도의 NaCl 처리 조건에서 배양 2주 후 발아한 유식물체의 생체중과 건조 후 무게의 변화를 조사한 결과는 Fig. 4와 같이 나타났다. 그린팜 품종의 경우 50 mM의 저농도 NaCl이 첨가된 처리구에서부터 생체중과 건중량이 급격하게 감소하는 경향을 보였으나 나머지 3품종에서는

50 mM 저농도에는 대조구와 처리구 간의 뚜렷한 생장의 차이는 나타나지 않으나 150 mM 이상의 농도에서 생체중과 건조 후 무게가 서서히 감소하는 경향을 보였다.

4. 항산화효소 활성 분석

Peroxidase (POD)는 대표적인 활성산소 제거 효소로서 과산화수소를 이용하여 기질을 탈수소화시키는 반응을 촉매하는 기능을 담당하고 있다. 이탈리아 라이그라스 품종별 잎 조직에서 POD 활성은 그린팜과 코윈어리에서 가장 낮게 확인 되었으며 화산101호에서 가장 높게 나타났다 (Fig. 5A). 고염 조건 (150 mM NaCl)에서 21일 동안 발아 시킨 후 잎 조직에서 POD 활성을 측정 한 결과, 대조군과 유사한 수준의 활성이 확인 되었다. 이러한 결과는 벼의 실험에서 고염 스트레스에 의해 벼의 생육 단계별 POD의 활성

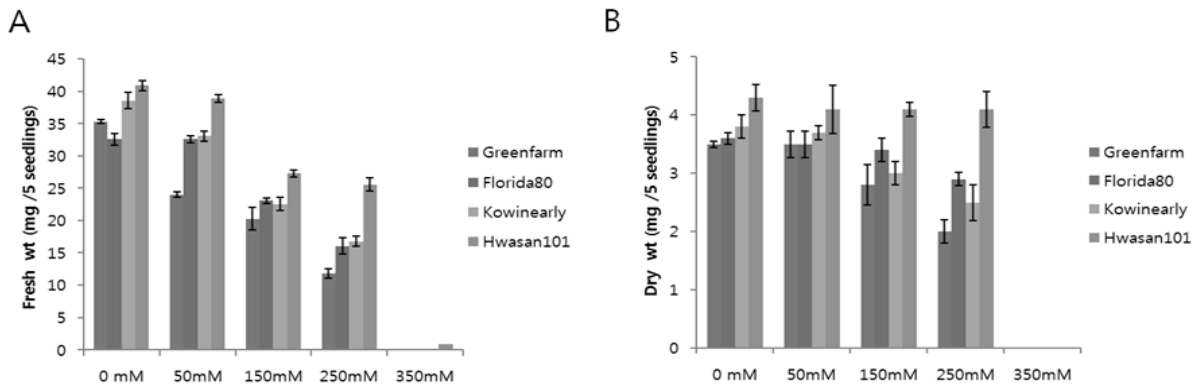


Fig. 4. Effect of salinity stress on fresh weight (A) and dry weight (B) of the shoots of four Italian ryegrass cultivars. Plants were treated with 0, 50, 150, 250 and 350 mM NaCl and used to determine their fresh and dry weight. Data points and vertical bars represent means of replicates and standard error, respectively.

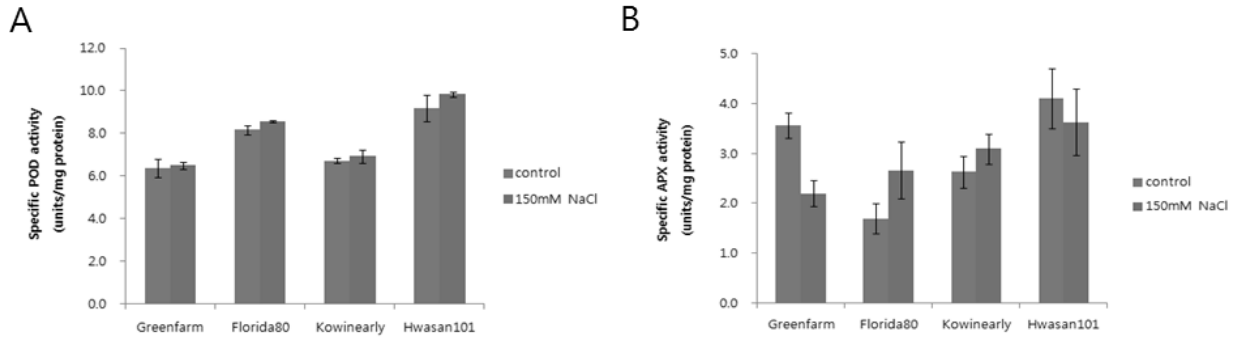


Fig. 5. Effect of salinity treatment on POD (A) and APX (B) activity in the shoot and root of 21 day old Italian ryegrass cultivars.

이 증가되었다는 보고와 다른 결과이며 (Swapna, 2003), 이는 식물체내 다양한 POD isoform들이 존재하여 품종 및 조직에 따라 매우 복잡한 기능에 의한 것으로 판단된다.

Ascorbate peroxidase (APX)는 대표적인 활성산소를 제거하는 효소중의 하나로 ascorbate를 기질로 하여 과산화수소를 탈수소화시키는 반응 촉매하는 기능을 한다. 정상적인 조건에서의 이탈리아 라이그라스의 품종간 APX 활성은 POD와 동일하게 화산101호에서 가장 높게 나타났으며 (Fig. 5B), 플로리다80과 코윈어리의 APX 활성은 그린팜보다 낮게 나타났다. 그러나 고염의 조건에서 발아 후 잎 조직에서 APX 활성을 조사한 결과, 플로리다80과 코윈어리 품종에서는 증가하는 경향을, 화산101 품종에서는 감소하는 경향을 나타냈으나 유의적인 수준 ($P > 0.05$)에서 차이는 확인되지 않았다. 그러나 그린팜 품종에서는 유의적인 수준 ($P > 0.01$)에서 고염 처리에 의한 APX 활성이 감소되는 것을 확인하였다.

이러한 결과는 고염도 조건에서 그린팜 품종의 발아율 및 생육이 가장 저조한 원인을 생리학적 측면에서 잘 설명해 주는 증거라고 판단된다. 화산101 품종의 POD 및 APX의 활성이 대조군과 고염도 조건에서 유사한 경향을 나타내었으나, 다른 품종에 비하여 상대적인 활성이 높기 때문에 발아율 및 생육이 가장 우수한 원인 중에 하나 일 것으로 판단된다.

IV. 요약

이탈리안 라이그라스의 발아 및 초기 생육단계에서 내염성 수준 정도를 조사하기 위하여 *in vitro* 조건에서 다양한 염농도 조건에서 그린팜, 플로리다80, 코윈어리 및 화산101호 품종을 이용하여 염해에 대한 반응을 발아율과 산화 스트레스 관련 효소들의 활성을 통해 조사하였다.

저농도의 NaCl 처리구에서는 모든 품종에서 발아율의 차이가 1~3% 정도 감소하는 경향을 보였으며 250 mM 이상의 NaCl 처리구에는 화산 101호 품종을 제외한 모든 품종에서 50% 이상의 발아율 감소를 보였다. 또한, NaCl 농도가 높아질수록 발아에 걸리는 시간이 지연되었으며, 350 mM NaCl이 첨가된 처리구에는 화산101호 품종만이 치상 10일후에 발아가 시작하여 12% 정도 발아하였다. NaCl 농도에 따른 shoot과 root의 길이와 생초와 건조 후 무게의 변화도 만생종으로 갈수록 더 생육이 우수한 것으로 나타났다.

품종별간의 잎 조직에서 항산화효소 활성을 분석 결과 고염 조건 (150 mM NaCl)에서 POD 활성은 대조군과 유사한 수준으로 확인 되었다. 반면 APX 활성은 플로리다80과 코윈어리 품종에서는 증가하는 경향을, 화산101 품종에서는 감소하는 경향이 나타났으나 유의적인 수준에서 차이는 확인되지 않았다. 반면 그린팜 품종에서는 유의적인 수준에서 고염 처리에 의한 APX 활성이 감소되는 경향이 나타났다. 지속적으로 *in vitro* screening을 통해 선발된 계통들은 향후 특성평가와 인공교배를 통해 내염성 이탈리아 라이그라스 개발에 필요한 유용한 육종모재로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

V. 사 사

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ008599012014)의 지원과 2014년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후연수과정 지원사업에 의해 이루어진 것임

VI. REFERENCES

Akbari, G., Sanavy, S.A. and Yousefzadeh, S. 2007. Effect of auxin

- and salt stress (NaCl) on seed germination of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 10(15):2557-2561.
- Akbari, G., Sanavy, S.A. and Yousefzadeh, S. 2007. Effect of auxin and salt stress (NaCl) on seed germination of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 10(15):2557-2561.
- Alam, M.Z., Stuchbury, T., Naylor, R.E.L. and Rashid, M.A. 2004. Effect of salinity on growth of some modern rice cultivars. *Journal of Agronomy*. 3(1):1-10.
- Almansouri, M., Kinet, J.M. and Lutts, S. 2001. Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant and Soil*. 231:243-254.
- Azza, M.A.M., Fatma EL-Quensi, E.M. and Farahat, M.M. 2007. Responses of ornamental plants and woody trees to salinity. *World Journal of Agricultural Sciences*. 3(3):386-395.
- Binzel, M.L. and Reuveni, M. 1994. Cellular mechanisms of salt tolerance in plant cells. *Horticultural Reviews*. 16:33-70.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 48-254.
- Chen, H.J., Chen, J.Y. and Wang, S.J. 2008. Molecular regulation of starch accumulation in rice seedling leaves in response to salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 30(2):35-142.
- Feizi, M., Aghakhani, A., Mostafazadeh-Frad, B. and Heidarpour, M. 2007. Salt tolerance of wheat according to soil and drainage water salinity. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 10(17):2824-2830.
- Fricke, W., Akhiyarova, G., Wei, W., Alexanderssn, E., Miller, A., Kjellbom, P.O., Richardson, A., Wojciechowski, T., Schreiber, L., Veselov, D., Kudoyarova, G. and Volkar, V. 2006. The short term growth responses to salt of the developing barley leaf. *Journal Experimental Botany*. 57(5):1079-1095.
- Huang, J. and Redmann, R.E. 1995. Salt tolerance of *Hordeum* and Brassica species during germination and early seedling growth. *Canadian Journal of Plant Science*. 75:815-817.
- Jamil, M., Lee, K.B., Jung, K.Y., Lee, D.B., Han, M.S. and Rha, E.S. 2007. Salt stress inhibits germination and early seedling growth in cabbage (*Brassica oleracea capitata* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 10(6):910-914.
- Lee, K.W., Choi, G.J., Kim, K.Y., Yoon, S.H., Ji, H.C., Park, H.S., Lim, Y.C. and Lee, S.H. 2010. Genotypic variation of *Agrobacterium*-mediated transformation of Italian ryegrass. *Electronic Journal of Biotechnology*. 13(3)1-10.
- Park, H.S., Kim, J.H., Seo, S., Jung, J.S., Lee, S.H., Lee, K.W. and Choi, G.J. 2013. Effect of Conditioning Methods and Tedding Frequency on the Drying Rate and Quality in Italian Ryegrass Hay. *Journal of the Korean Society of Grassland and Forage Science*. 19(1)69-74.
- Razzaque, M.A., Talukder, N.M., Islam, M.S., Bhadra, A.K., Dutta, R.K. 2009. The effect of salinity on morphological characteristics of seven rice (*Oryza sativa*) genotypes differing in salt tolerance. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 12(5):406-412.
- Sheng, X., Hu, B., He, Z., Ma, F., Feng, J., Shen, W. and Yang, J. 2011. Enhancement of salinity tolerance during rice seed germination by presoaking with hemoglobin. *International Journal of Molecular Sciences*. 12:2488-2501.
- Swapan, T.S. 2003. Salt stress induced changes on enzyme activities during different developmental stages of rice (*Oryza sativa* L.). *Indian Journal of Biotechnology*. 2:251-258.
- Theerakulpisut, P., Bunnag S. and Kong-Ngern, K. 2005. Genetic diversity, salinity tolerance and physiological responses to NaCl of six rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Asian Journal of Plant Sciences*. 4(6):562-573.

(Received May 15, 2014/ Revised June 2, 2014/ Accepted June 5, 2014)