

禾本科 牧草의 種·屬間 雜種에 관한 研究
Ⅲ. 이탈리아 라이그라스의 培養細胞로부터 原形質體 分離와 培養
李映弦·朴炳勳*

Studies on the Interspecific and Intergeneric Hybridization in Herbage Grasses

Ⅲ. Isolation and culture of protoplasts from cultured cells of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.)

Young Hyun Lee and Byung Hoon Park*

Summary

The yield, viability and continuous culture of isolated Italian ryegrass protoplasts were investigated. The effects of cold treatment (4°C) for 7 days and basic LS medium supplemented with 5mg/l AgNO₃ showed effectively on embryogenic callus induction and regeneration responses of immature and mature embryos or young inflorescences subcultured every 4 weeks on basic medium. The optimum combinations of growth regulator on the regeneration responses was 0.2mg/l BAP and 2mg/l 2,4-D. Calli induced inflorescences were suspended in its liquid medium for 5 days before enzyme treatment. Maximum protoplast yield and viability were obtained after digestion in enzyme solution contained 4% cellulase R10, 2% macerozyme and 2% pectinase in 0.6M mannitol. Cell division and microcalli development were observed in isolated protoplasts cultured in agarose culture of KM8P medium.

I. 緒 言

이탈리안 라이그라스는 初期生育이 왕성하고 品質이 우수하며 우리나라 남부지방에서 주요 畝裏作物으로 많이 재배되고 있는 飼料作物이다^{15,19)}. 그러나 耐寒性이 약하여 그 재배지역이 국한되어 耐寒性 품종육성이 요구되고 있다^{16,17)}. 種間 또는 屬間交配¹⁹⁾와 遠緣種間의 배배양을 통한 雜種植物開發¹⁵⁾이 시도되고 있다.

현재 原形質體를 이용한 연구들이 활발히 진행되어 있으며 이는 기초과학 뿐만 아니라 육종학 등 여러 응용과학의 연구수단으로도 많이 이용되고 있다¹²⁾. 그리하여 품종개량을 위하여 효율적인 異種의 有用形質을 한 식물체에 導入을 가능하게 하는 원형질체로부터 식물체까지의 再分化 체계의 필요성이 대두되고 있다. 그러나 일부 식물에서만 原形質體

의 培養 및 再分化가 이루어지고 있어, 이러한 원형질체를 배양하여 완전한 식물체로의 재분화를 유도할 수 있는 방법 등이 우선적으로 연구되어야 할 과제로 되어 있다. 특히 單子葉植物에서 원형질체의 분리 및 배양에 대한 보고가 있었는데 分化率 등이 높은편은 아니었다^{19,13)}.

본 실험에서는 이탈리아 라이그라스에서 誘導된 培養細胞에서 다량의 活性原形質體를 얻는 데 요구되는 여러 조건으로 植物體再分化의 可能性을 檢討하였다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 培養細胞 誘導

이탈리안 라이그라스(*Lolium multiflorum*, Cv.

高麗大學校 大學院(Graduate School of Korea University, Seoul, 136-701, Korea)

* 畜産試驗場(Livestock Experiment Station, RDA, Suweon 441-350, Korea)

Sikem 2X=14)의 成熟種子胚, 未熟種子胚와 幼穗를 70% ethanol과 0.2% mercuric chloride 용액에 10분간 살균후 무균수로 3회 洗滌하였다. 그리고 無菌床內의 解剖顯微鏡下에서 胚는 胚盤 바로 윗 부분을 胚와 胚乳를 분리시킨 후 置床하였다. 각 explant는 종자배인 경우 살균과 세척 후 12시간이 經過후에 배양하였다. 未熟胚에 있어서는 受粉후 20일 경과 후 배양하였으며, 幼穗는 길이 5mm 내외의 것을 이용하였다. 본 실험에 사용된 callus 誘起培地는 Linsmaier and Skoog¹⁰⁾ (LS) 基本培地에 Dale⁴⁾ (1980)등의 방법과 같이, 2,4-D 2.0mg/l, BAP 0.2mg/l, casein hydrolysate 1g/l, sucrose 30g/l, agar 8g/l을 添加한 배지에 低温處理 혹은 AgNO₃를 5, 10, 50 mg/l을 첨가하여 캘러스 誘起樣相을 조사하였다. 또한 유도된 캘러스를 生長調節劑을 0.2, 1.0, 2.0mg/l을 혼용 혹은 단용으로 처리한 배지에서 植物體分化樣相을 조사하였다. 繼代培養은 4주 간격으로 하였는데 캘러스誘起 培養은 25℃, 暗條件下에서 배양하였고, 植物體分化 배양은 1,500lux의 照度下 16시간 그리고 暗狀態 8시간의 週기로 배양하였다.

2. 懸濁培養에 의한 原形質體의 分離 및 培養

고체배지에서 1개월간 誘起시킨 幼穗의 캘러스를 잘게 부순 다음 50ml 同一 조성의 액체배지가 들어있는 250ml의 삼각 flask에 넣어 110rpm의 속도로 암조건 25℃ 하에서 振蕩培養을 하면서 2일 간격으로 꺼내 여기에 효소 처리하였다. 효소액은 cellulase R10, macerozyme R10 및 pectinase를 각기 농도를 달리하여 사용하였으며, 滲透壓調節劑로서 mannitol을 이용하여 원형질의 受率 및 生存率을 조사하였다. 원형질체 분리는 생체 1g의 배양세포에 효소용액 20ml을 넣고 振蕩機(30~40 rpm)에 4시간 처리하였으며, 분리가 끝난 원형질체는 두겹(150, 50 μm)의

stainless steel sieve로 거른 다음 15cm의 cap tube에 넣어 100g에 5분 동안 遠心分離하여, 얻어진 원형질체를 CPW용액에 현탁시켜 2회 원심분리한 후 시료로 사용하였다. 또한 精製된 원형질체를 hemocytometer를 사용하여 원형질체수를 측정하였으며, 원형질체의 生存性은 0.6M mannitol에 녹인 0.025% Evans blue 용액을 사용하여 測定하였다. 원형질체 배양은 직경 5mm의 petri-dish 용기에 KM8P배지를 이용하여 0.6M mannitol을 첨가한 pH 5.7의 액체 혹은 고체배지에서 배양하였다. 원형질체 密度는 10⁴~10⁵개/ml 되도록 맞춰 원형질체 현탁액 1ml를 넣고 密封하여, 배양기(26±1℃, 암상태)내에서 배양시켰으며, 1주일 간격으로 mannitol이 첨가되지 않은 기본배지를 0.5ml씩 첨가하였다.

III. 結果 및 考察

1. 低温處理 日數와 AgNO₃ 濃度에 따른 callus 生育과 反應

低温處理 日數에 따른 캘러스 形成을 보면 표 1과 같이 저온처리 日數間에 현저한 차이를 보였는데, 캘러스誘起는 4℃ 7일간의 처리가 形成率이 가장 양호하였고, 14일간의 처리는 초기 캘러스의 根發生을 유도하는 경향을 보였다. 반면에 種子胚와 幼穗에 있어서는 그 효과가 미미했다. 캘러스 유기는 未熟胚의 胚盤部位에서 약 2주부터 캘러스 형성이 시작하여 약 4주후에는 직경 3mm에 달했다. Fahey⁶⁾ (1986) 등은 옥수수에서 temperature shock의 概念으로 置床된 미숙배를 3~5℃에 12시간 처리함으로써 캘러스 誘起率과 embryogenic callus 形成에 작용하여 식물체 분화에 크게 작용한다고 한다.

callus 誘起 배지내의 AgNO₃ 농도는 캘러스의 형성과 分化原起(green spots) 발생에 큰 영향을 미치는

Table 1. Effect of cold treatment (4℃) on callus induction from immature embryos of Italian ryegrass.

Day	No. of inoculum	No. of calli induction	(%)	Root formation
0	407	296	63	+++*
7	121	116	95	+
14	131	61	46	+++

*: +: rare, ++: good, +++: very good.

것으로 생각되는데 전체적으로 성숙배를 제외하고는 캘러스형성율을 감소시켰다. 반면에 AgNO₃ 5mg/l에서는 분화원기의 발생이 가장 양호하였다(표 2). 특기할 것은 材料와 AgNO₃의 농도에 따른 差異인데, Purnhayser¹⁸⁾(1987) 등은 AgNO₃處理가 급격한 세포분열을 抑制하고 재분화를 助長한다고 報告하였는데 이는 배양 초기의 切斷에 의해 발생하는 ethylene의 量이 조직에 따라 다르며 Ag'는 억제제로서 作用하기 때문에 事 由 된 다.

植物體의 再分化는 分化培地내의 호르몬의 組合에

크게 영향을 받는데 표 3에서 보는 것과 같이 BAP 0.2mg/l와 2,4-D 2.0mg/l의 secondary medium에서 특히 幼穗절편에서 가장 양호하여 explant별 차이를 볼 수 있었고 multiple shoot가 발생하는 경우도 있었다. 이러한 현상에 대하여 Vasil²⁰⁾(1982)은 早期發生하는 胚盤組織이 2,4-D에 의해 頂芽 優勢現象이 消失되어 원래의 shoot meristem에 많은 分裂組織이 발생하기 때문이라고 하였고, Dunstan⁹⁾(1978)도 먼저 somatic embryo가 발생한 후, 早期發芽하는 embryoid에서 multiple shoot가 發生하기 때문이라 하였다.

Table 2. Effect of AgNO₃ on callus induction and regeneration in Italian ryegrass.

AgNO ₃ (mg/l)	Explant sources								
	Mature embryos			Immature embryos			Inflorescences		
	C.I. ¹⁾	G.S. ²⁾	W.S. ³⁾	C.I.	G.S.	W.S.	C.I.	G.S.	W.S.
0	100 %	2 %	0 %	73 %	2 %	4 %	70 %	0 %	0 %
5	96	0	6	72	13	5	62	14	0
10	100	4	6	54	9	3	56	6	0
50	96	0	0	49	5	3	45	2	0

¹⁾ C.I: callus induction.

²⁾ G.S: green sports.

³⁾ W.S: white sports.

Table 3. Effect of growth regulators on regeneration of Italian ryegrass callus induced from three explant sources.

Phytohormones ¹⁾ (mg/l)	Regeneration response		
	Callus induced from		
	Mature embryos	Immature embryos	Inflorescences
BAP 1	—	—	R ²⁾
BAP 1 + NAA 1	—	R	+ ³⁾
Kn 1 + IAA 1	R	+	+++
BAP 0.2 + 2,4-D2	+	++	+++

¹⁾ BAP; 6-benzylaminopurine, NAA; naphthalene acid, Kn; kinetin IAA; indole acetic acid, 2,4-D; 2,4-dichlophenoxyacetic acid.

²⁾ R = root differentiation.

³⁾ -: none, +: rare, ++: good, +++: very good.

2. 懸濁培養에 의한 原形質體의 分離 및 培養

幼穗의 배양세포에서 embryogenic callus를 고품배지에서 액체배지로 옮겨 振蕩培養함으로써 배양세포의 柔軟性を 증가시키게 되어 원형질체의 受率과 生存率을 높일 수 있는데 그림 1은 배양세포를 reciprocal

shaker에서 진탕배양하면서 2일간격으로 酵素處理하였을 때 분리되는 원형질체의 수 및 생존율을 측정한 것이다. 그림 1과 같이 5일정도 진탕배양 후 酵素處理 하였을 경우 多量의 생존성있는 원형질체가 分離되었으며, 1주일 경과하면서 급격히 감소되었다. Wallin²¹⁾(1977) 등과 Nakagawa¹⁴⁾(1985) 등은 이는

세포벽의 肥厚 등에 의한 것으로 보았고 振蕩培養處

리가 分離受率을 증가시켜 준다고 보았다.

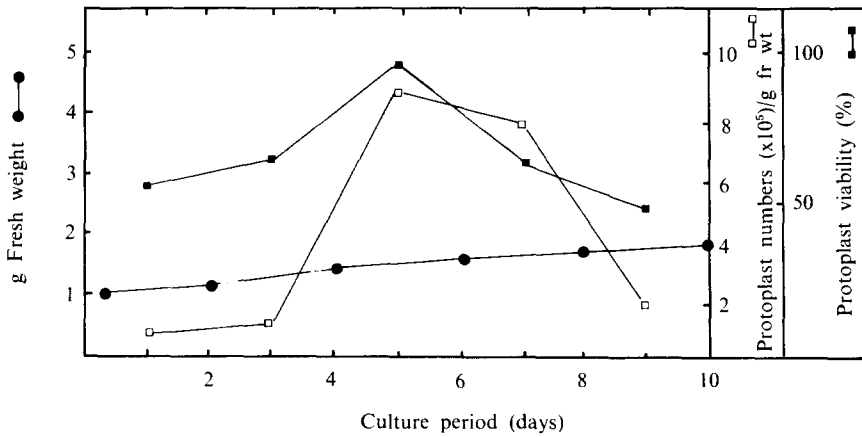


Fig. 1. Relationship between fresh weight, yield, protoplast viability of Italian ryegrass and culture period.

酵素組合이 원형질체의 受率에 미치는 影響을 보면(표 4), cellulase R10 4%, macerozyme R10 2%, pectinase 2% 處理區에서 생존율이 가장 높으며, pectinase를 첨가함으로 보다 높은 생존성을 갖는 원형질체를 다량 얻을 수 있었다. 일반적으로 材料의 影響도 있지만 cellulase와 pectinase의 혼합처리가 원형질 분리에 보다 영향을 미치는 것으로 나타났다¹⁾. 원형질체의 분리 및 생존성에 가장 큰 영향을 미치는 要因으로는 酵素液과 洗滌液에 첨가되는 osmoticum의 종류를 생각할 수 있다. 효소 용액내의 mannitol 농도는 0.6M 처리구에서 높은 원형질체의 受率이 가장 높게 나타났다(표 5). 0.6M 이하의 농도에서는 오히려 분리가 減少되었는데 이는 원형질체 내로 過多한 水分吸收에 따른 원형질 吐出現象에

의한 破壞 등에 起因한 것으로 생각된다. 한편 벼에서 Liu¹¹⁾(1982) 등은 0.7M mannitol에서 분리하였고, Maddock¹²⁾(1987)은 밀에서 osmotic pressure 약 750 mOsM 下에서 배양하였다는 본 실험과 유사한 결과를 보고하였다.

原形質體 培養方法에 있어서 plating 物質이 원형질체 배양에 미치는 영향을 보기 위하여 액체배양과 고체배양을 비교하였던 바, 액체배양은 初期生存率은 높았으나 培養日數가 경과할수록 枯死率이 증가하는 특징을 나타내었다. 고체배양에 있어서 培養初期의 원형질체의 流動抑制와 保護에 影響을 주는 plating 물질에 관한 결과는 융점이 낮고 보다 잘 精製된 Sigma agarose VII가 세포분열에 있어 微細胞塊 形成에 효과적이라 생각된다(표 6).

Table 4. Effects of enzyme concentration on the yield and viability of protoplasts isolated from Italian ryegrass.

Enzyme (%)			Viable protoplast	
Cellulase R10	Macerozyme R10	Pectinase	No.	Viability (%)
2	0.25	—	0.3 ¹⁾	94 ²⁾
4	1.00	—	2.3	93
4	2.00	2	4.2	96
6	4.00	4	4.8	92
4	6.00	1	3.2	94

¹⁾ Number of protoplasts($\times 10^5$ /g fr wt).

²⁾ After 4 days of culture.

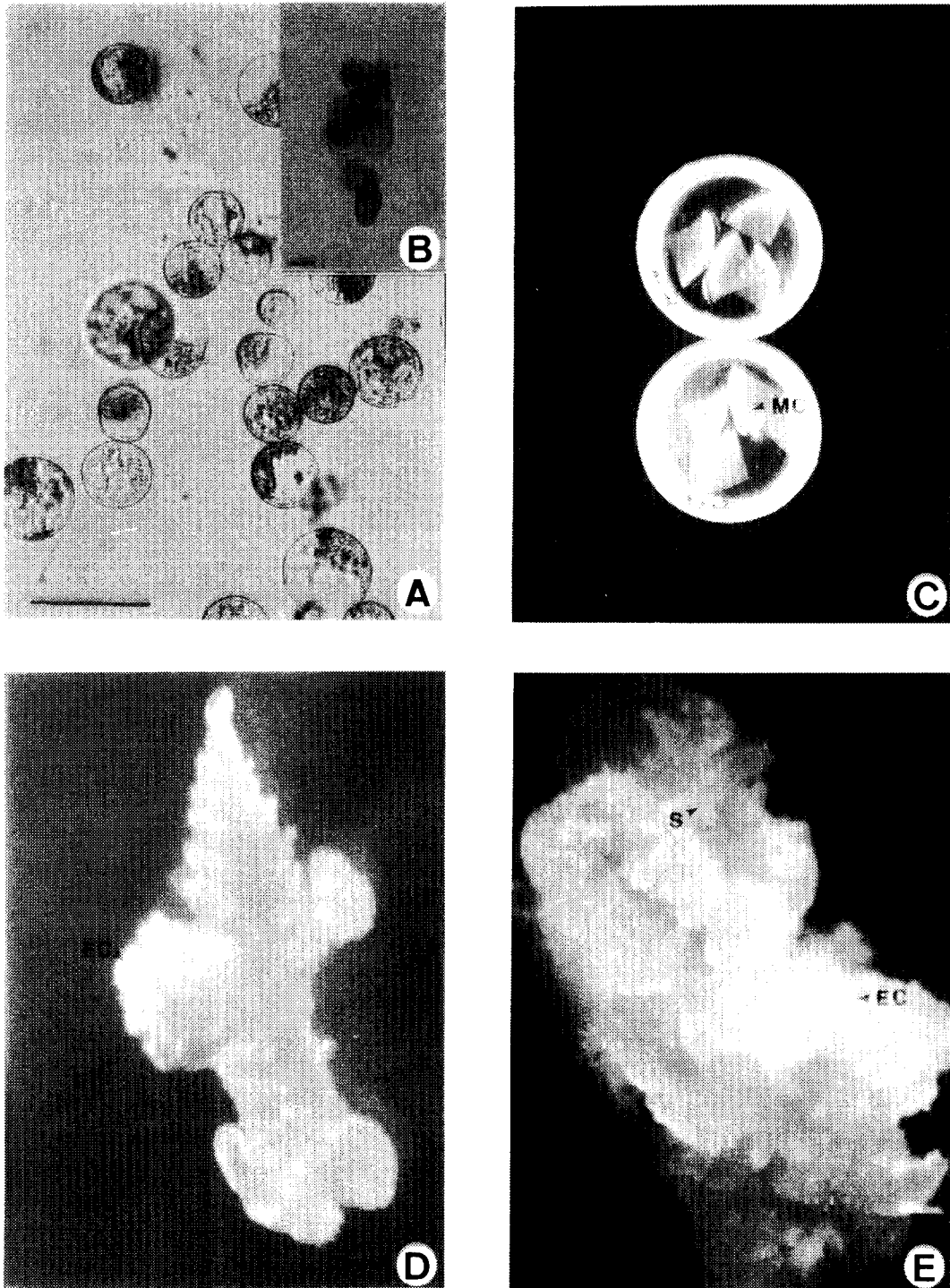


Fig. 2. Protoplasts and callus of Italian ryegrass. (A) Protoplasts. Bar=50 μm . (B) Protoplast division after 2 days of culture. Bar=100 μm . (C) Microcalli in agarose- solidified KM8P medium. (D,E) Initiation and development of embryogenic callus induced from young inflorescences. Abbreviations: EC: embryogenic callus, MC: microcalli, S: shoot.

Table 5. Effect of mannitol concentration on the yield and viability of protoplasts isolated from Italian ryegrass.

Mannitol(M)	mOsM ¹⁾	No. of protoplast/g fr. wt.		
		($\times 10^6$)	Viable protoplast	
			No. ($\times 10^6$)	Viability ²⁾ (%)
0.2	437	23.2	0.0	(0.0)
0.4	515	24.6	9.6	(39.0)
0.6	794	75.0	68.6	(91.4)
0.8	1,074	13.0	10.0	(76.9)
1.0	1,359	7.0	4.0	(42.8)

¹⁾ Osmotic pressure unit.

²⁾ After 4 days of culture.

Enzyme treatment: 4% cellulase R10+2% macerozyme R10+2% pectinase, pH 5.6, 4 hours.

Table 6. Effect of plating materials on the viability and cell division of protoplasts isolated from Italian ryegrass.

Materials	Con. (%)	Plating temperature(°C)	Cell division ¹⁾	Microcalli ²⁾
			No./ocular(%)	induction
Sigma agarose II	0.4	45	94(39)	+ ³⁾
Sigma agarose VII	0.4	37	166(69)	++
Bacto agar	0.8	45	62(25)	+

¹⁾ After 7 days of culture, ocular= $\times 100$ multiple.

²⁾ After 21 days of culture.

³⁾ +: rare, ++: good.

그림 2는最適分離 조건하에서 얻어진 생존성이 높은 원형질체를 KM80P 培地⁸⁾에 agarose plating culture 方法으로 배양한 것이다. 배양 48시간후부터 일부 세포에서 돌기와 細胞分裂이 일어났고 배양 21일 후에 顯微鏡下에서 微細胞塊를 관찰할 수 있어 Jones⁷⁾(1982) 등에 의해 보고된 것과 일치되고 있다. 일반적으로 세포분열은 배양된 원형질체의 密度나 培地造成, 그리고 agar 등에 의해서 影響을 받고 있다.

以上の結果로 볼때, 原形質體의 分離 및 生存率에서는 비교적 좋은 결과를 얻었으나 培養에 관해서는 더 많은 研究가 要求된다.

IV. 摘 要

이탈리안 라이그라스(*Lolium multiflorum* Lam.)의 원형질체 분리 및 생존성에 영향을 미치는 몇가지 要因들에 대하여 조사한 바 다음과 같은 결과를

얻었다. 成熟胚, 未熟胚 및 幼穗에 있어서 分化力이 높은 캘러스 誘起는 4°C에서 7일간 低温處理와 기본 배지에 AgNO₃ 5mg/l을 添加한 것이 효과적이었다. 캘러스로부터의 再分化는 BAP 0.2mg/l와 2,4-D 2 mg/l의 組合에서 가장 좋았다. 幼穗에서 誘起된 懸탁 배양 세포를 액체배지에서 5일간 진탕배양한 후 酵素(4% cellulase R10, 2% macerozyme, 2% pectinase)와 滲透壓 조절제인 0.6M mannitol을 添加한 용액에서 생존율이 높은 원형질체를 얻었다. 그리고 原形質體는 KM8P배지의 agarose 고체배지에서 細胞 分裂과 微細胞塊가 이루어졌다.

V. 引用文獻

1. Brak, D.S., S. Rambold, F. Constable, and O.L. Gamborg. 1980. Isolation, fusion and culture of *Sorghum* and corn protoplast. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 96. S. 269-275.

2. Carolyn, S. 1990. Cereal progress via biotechnology. *Biosci.* vol. 40, No. 1:5-14.
3. Dele, P. J. 1975. Meristem tip culture in *Lolium multiflorum*. *J. of Exp. Botany*, Vol. 26, No. 94:731-736.
4. _____. 1980. Embryoids from cultured immature embryos of *Lolium multiflorum*. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 100:73-77.
5. Dunstan, et al. 1978. The anatomy of secondary morphogenesis in cultured scutellum tissues of *Sorghum bicolor*. *Protoplasma* 97:251-260.
6. Fahey, J.W., J.N. Reed, T.L. Readdy, and G.M. Pace. 1986. Somatic embryogenesis from three commercially important inbreds of *Zea mays*. *Plant Cell Reports* 5:35-38.
7. Jones, M.G.K., and P.J. Dale. 1982. Reproducible regeneration of callus from suspension culture protoplast of the grass *Lolium multiflorum*. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 105. S. 267-274.
8. Kao, K.N., and M.R. Michayluk. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Plants (berl.)* 126: 105-110.
9. Koop, H.U., G. Weber, and H.G. Schweeriger. 1983. Individual culture of selected single cells and protoplasts of higher plants in microdroplets of defined media. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 112. S. 21-34.
10. Linsmaier, E.M., and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18:100-127.
11. Liu, Li-Fei, and Kwan-Long Lai. 1982. Isolation and culture of rice protoplasts from suspension cells originated from young embryo. *Proc. 5th Intl. Cong. Plant tissue & Cell Culture 1982.* pp. 581-582.
12. Maddock, S.E. 1987. Suspension and protoplast culture of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports.* 6:23-26.
13. Molenaar, J.C., P.V.D. Valk, J.P.M. Loeffen, and M.C.M. Zaal. 1989. Plant regeneration from suspension cultures and protoplasts of *Lolium perenne* L. *Plant Sci.* 63:167-176.
14. Nakagawa, H., H. Tannaka, T. Oba, N. Ogura, and M. Lizuka. 1985. Callus formation from protoplast of cultured *Spinacia oleacea* cells. *Plant Cell Reports.* 4:148-150.
15. 朴炳勳, 金明桓. 1989. 禾本科牧草의 種·屬間雜種에 관한 研究. I. 交雜胚 日齡에 따른 Callus 形成과 植物體分化. *韓草誌.* 9(2):62-67.
16. _____, 柳鏡遠, 李映弦. 1991. 禾本科牧草의 種·屬間雜種에 관한 研究. II. Italian ryegrass X tall fescue F₁ 雜種의 形態 및 生理의 特性. *韓草誌.* 11(1):1-5.
17. _____. 1992. 牧草 및 飼料作物 育種. *韓草誌.* 12(特別號):56-63.
18. Purnhauser, L., P. Medgyesy, M. Czako, P.J. Dix, and L. Marton. 1987. Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃. *Plant Cell Reports.* 6:1-4.
19. 柳鏡遠, 姜正勳, 韓興傳, 金雄培, 朴炳勳. 1988. 禾本科 牧草의 種·屬間雜種 Hybrid ryegrass 와 Festulolium의 生育特性. *韓草誌.* 8(2):123-127.
20. Vasil, V. and I.K. Vasil. 1982b. The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* L. I. In cultured immature embryos. *Bot. Gaz. (Chicago)* 143:454-465.
21. Wallin, A., K. Glimelius, and T. Eriksson. 1977. Pretreatment of cell suspension as a method to increase the protoplast yield of *Haplopappus gracilis*. *Physiol. Plant.* 40:307-311.