

오차드그래스의 현탁배양으로부터 부정배 형성과 식물체 재분화

이효신 · 권용삼 · 이병현 · 원성혜 · 김기용* · 조진기

Plant Regeneration from Embryogenic Suspension Culture of Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.)

Hyoshin Lee, Yongsham Kwon, Byung-Hyun Lee, Sung-Hye Won, Ki-Yong Kim* and Jinki Jo

Abstract

This study was carried out to improve the ability of embryo formation and the efficiency of plant regeneration from suspension cultured cells of seed derived calli of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). The frequency of formation of round cell and cell colonies was highest at 50 days after suspension culture in N₆ medium supplemented with 4 g/l casein hydrolysate (CH), 20 g/l sucrose and 30 g/l sorbitol. The highest frequency of plant regeneration and somatic embryo formation was obtained from suspension cultured cells of 60 days. Addition of CH (4 g/l) in suspension culture medium gave the highest frequency of embryo formation (39.6%) and plant regeneration (73.0%).

(Key words : Casein hydrolysate, Orchardgrass(*Dactylis glomerata*), Plant regeneration, Suspension culture)

I. 서 론

식물 조직배양 및 형질전환 기법의 급격한 발달로 제초제 내성 및 환경 스트레스 저항성 유전자 등의 도입에 의한 유용작물의 개량을 통하여 생산성 향상에 관한 많은 연구결과가 보고되고 있으며, 특히 벼와 같은 주곡작물의 경우 조직배양 기술이 체계적으로 확립됨에 따라, 다양한 유전자를 식물체 내로 삽입하여 형질전환체를 얻는 등 상당한 연구성과를 얻고 있는 실정이다 (Hiei 등, 1997). 이에 반하여, 목초류의 경우는 그 중요성이 크게 인식되지 못하였기 때문에, 조직배양에 대한

연구도 다른 작물에 비해 뒤늦게 시작되어 아직 그 효율이 상대적으로 낮은 실정이며, 형질전환 기법을 이용한 품종개량에 큰 제한요소로 작용하고 있다. 그러나, 최근 안정적인 조사료의 공급과 오염된 토양, 물 및 대기의 정화에 있어 사료작물의 중요성이 부각되면서 초지의 중요성이 강조됨에 따라, 이 분야에 관한 연구도 증가하고 있다. 따라서, 목초류에 있어서도 알팔파를 비롯한 몇몇 작물은 조직배양기법을 이용하여 이미 상당한 연구성과를 얻고 있지만(Cogner와 Hanning, 1991), 오차드그래스와 같은 단자엽 초종의 경우는 아직 그 효율이 미미한 실정이다.

경북대학교 농과대학 (College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea)

* 축산기술연구소 (National Livestock Research Institute, Suwon 441-350, Korea)

오차드그래스는 우리나라에서 가장 많이 재배되고 있는 화본과 목초로서, 서늘한 기후를 좋아하고 가뭄에 대한 적응성이 강한 북방형 다년생 목초로서, 토양조건에 대한 적응성이 좋으며, 재생력이 우수하고, 음지에서 잘 자란다. 오차드그래스의 경우 1980년대 초부터 조직배양에 관한 연구가 시작되어 원형질체, 약, 암술과 엽육 조직을 배양하여 식물체를 획득하였으며 (Conger 등, 1983; Gray 등, 1984; Songstad와 Conger, 1986; Horn 등, 1988), 최근에 조직배양 재료의 안정적인 확보를 위하여 종자유래의 캘러스로부터 다수의 식물체를 얻었다는 연구보고 (김 등, 1998; 이 등, 1998)가 있으나, 배양재료나 품종에 따라 배양효율이 큰 차이를 나타내어 이를 형질전환 기법의 재료로 이용하는데 문제점으로 제기되었다. 이를 보완하기 위하여 종자에서 유래된 캘러스를 현탁배양하여 체세포배의 발달과정과 획득효율 향상과 더불어 재분화된 식물체를 많이 얻을 수 있다면, 형질전환 효율 향상에 크게 기여할 수 있을 것이라고 생각된다.

따라서 본 연구에서는 오차드그래스의 조직배양 효율을 향상시키고자, 종자배양에서 유래된 캘러스를 현탁배양하여 배양기간별 배발생 캘러스와 식물체 분화율 등에 대한 실험을 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료

본 연구에서는 축산기술연구소에서 분양받은 오차드그래스 품종 중 Amba와 Potomac을 공시품종으로 이용하였다. 공시품종의 종자를 70%의 ethanol에 30초간, 1% sodium hypochloride에 45분간 각각 소독하고, 멸균수로 3회 세척한 다음, 배지가 20 ml씩 분주된 Petri dish (Ø 9 cm)에 10립씩 배양하였다.

2. 배지조성 및 배양조건

캘러스형성은 3 mg/l dicamba, 30 g/l sucrose, 6 g/l gelrite가 첨가된 N₆ 배지 (Chu, 1978)를 이용하여, 26±1℃의 암상태에서 30일 동안 유지시켰으며, 식물체 재분화는 1 mg/l NAA, 5 mg/l kinetin, 30 g/l sucrose 및 6 g/l gelrite가 첨가된 N₆ 배지에 배양하여, 2,600 Lux 명상태에서 30일 동안 배양한 다음, 식물체 재분화율을 조사하였다.

캘러스의 현탁배양에서 세포의 증식과 형태, 부정배의 형성정도를 조사하기 위하여, 고체배지에서 형성된 캘러스 200 mg을 N₆ 배지 [4 g/l casein hydrolysate (CH), 20 g/l sucrose, 30 g/l sorbitol]가 20 ml씩 분주된 삼각 플라스크 (100 ml)에 넣은 후, 150 rpm (26±1℃, 암상태)으로 진탕배양하면서 1주일 간격으로 배지를 1:1의 비율로 교환하면서 계대배양하였다. 오차드그래스의 종자에서 유래된 캘러스를 70일 동안 현탁배양하면서, 형성된 tube cell과 round cell의 증가 양상 및 cell colony의 수를 혈구계산기를 이용해 7일 간격으로 측정하였고, 120일간 계대배양하면서 형성된 부정배의 수를 10일 간격으로 조사하는 한편, 각각의 부정배를 N₆ 재분화배지로 이식하여 계대배양 기간에 따른 식물체 분화율을 비교하였다. 또한 배지내에 첨가되는 적정 CH의 농도를 구명하기 위하여, CH의 농도를 0, 2, 4, 8 g/l로 조절하여 부정배의 형성정도를 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

대부분의 식물 조직으로부터 유래된 캘러스를 현탁배양하면 세포의 크기가 작고 모양이 둥글면서 세포질이 풍부한 등근 모양의 세포와 이와는 달리 세포질이 적은 tube 모양의 세포가 함께 관찰되며, 이 중 round 형의 세포가 배발생 캘러스로 발달하는 것으로 알려져 있다 (Abe와 Futsuhara, 1991). 따라서, 전보 (이 등, 1998)에서 오차드그래스의 종자유래의 캘러스로부터 식물체 재분화 효

율이 가장 높게 나타난 Amba와 Potomac의 종자유래의 캘러스로부터 현탁배양 세포를 유도한 다음, 계대배양하면서 유도된 현탁배양 세포의 모양과 배양효율을 조사하였다. 먼저, 오차드그래스의 종자를 30일 동안 배양하여 형성된 캘러스를 50일 동안 현탁배양하면서, 7일 간격으로 세포의 형태가 둥글면서 세포질이 풍부한 것과 이들의 cell colony의 수의 품종간 차이를 조사하였다 (Fig. 1). 그 결과, 오차드그래스의 종자에서 유래된 캘러스의 현탁배양에서도 round cell과 tube 모양의 세포가 관찰됨을 확인할 수 있었다. 그러나, 세포질이 풍부하면서 세포의 형태가 둥근 세포나 cell colony의 수는 Amba의 경우 배양 30일째에 $32.1 \times 10^4/\text{ml}$ 로 최대치를 나타낸 다음 감소하는 경향을 나타내었으며, Potomac의 경우는 배양 50일째에 $73.3 \times 10^4/\text{ml}$ 로 최대치를 나타내어, Potomac이 Amba에 비해 2.3배 이상 높게 나타났다. 그러나, Potomac의 경우도 배양 50일 이후에는 감소하는 경향을 나타내었다.

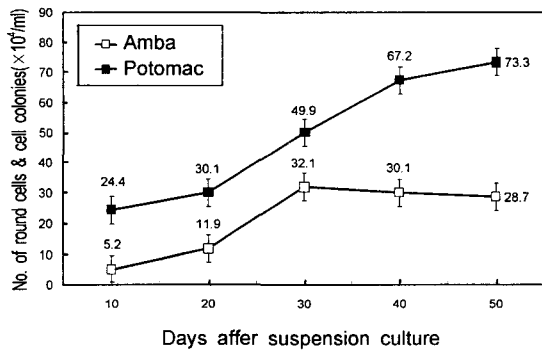


Fig. 1. Number of round cells and cell colonies to days after suspension culture of seed-derived callus of orchardgrass. Each value represents the mean measured in at least three independent experiments. Bars indicate standard deviations of the mean activities.

현탁배양 과정에서 세포의 형태가 둥글면서 세포질이 풍부한 것과 이들의 cell colony의 수가 높

게 나타난 Potomac의 종자유래의 캘러스를 120일 동안 현탁배양하면서, 10일 간격으로 부정배의 형성률을 조사한 다음, 형성된 부정배를 재분화 배지로 옮겨 이들 부정배로부터 식물체 재분화율을 조사하였다 (Fig. 2). 그 결과, 부정배 형성율은 현탁배양 60일째에 68%의 가장 높은 수준을 나타내었으며, 그 이후는 감소하는 양상을 나타내었다. 형성된 부정배로부터 식물체 분화율 또한 배양 60일째에 40.2%로 가장 높은 경향을 나타내었으며, 현탁배양 기간이 90일 이상으로 길어질수록 부정배의 형성률과 식물체 재분화율이 급격하게 감소하는 양상을 나타내었다. 따라서, 오차드그래스 종자유래의 캘러스로부터 식물체 재분화율이 품종에 따라 차이는 있으나, Amba (이 등 1998)와 합성 19호 (김 등, 1998)의 경우 가장 높은 32% 및 29%를 나타낸다는 것을 고려하면, 68% 및 40.2%의 부정배 형성 및 식물체 재분화율은 매우 높은 수준으로 생각된다. 또한 현탁배양의 경우, 동일 line으로부터 많은 양의 재료를 확보할 수 있다는 점과 배양세포의 유지가 용이하다는 점을 고려하면, 형질전환 식물체의 구축에 있어 유용할 것으로 생각된다.

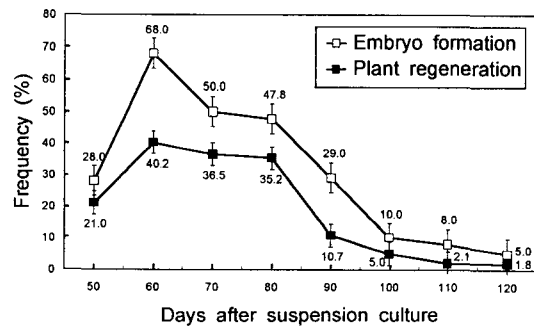


Fig. 2. Frequency of embryo formation and plant regeneration in suspension culture of orchardgrass. Each value represents the mean measured in at least three independent experiments. Bars indicate standard deviations of the mean activities.

현탁배양 기간이 길어질수록 부정배의 형성률이 감소하는 것은, 벽의 뿌리조직 유래의 갬러스 현탁배양에서 배양기간이 장기간 지속되면 부정배 형성율이 감소된다고 한 Abe와 Futsuhara(1991)의 연구와 유사한 결과이며, 그 원인은 아직 명확하지 않으나, 장기간의 배양과정에 따른 재분화 능력의 상실 때문으로 알려져 있으며, 앞으로 이에 대해서 좀더 깊이 있는 연구가 있어야 될 것으로 생각된다.

오차드그래스의 현탁배양에서 배지 내에 첨가되는 casein hydrolysate의 영향을 조사한 바 (Fig. 3), 무처리보다는 CH가 첨가된 배지에서 부정배의 형성과 식물체 분화율이 높게 나타났는데, 4 g/l의 CH가 첨가되었을 때 부정배의 형성과 식물

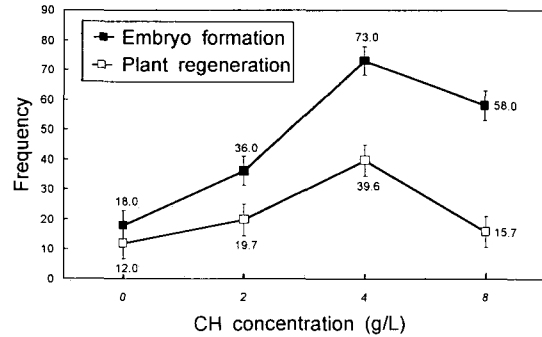


Fig. 3. Effect of casein hydrolysate(CH) on embryo formation and plant regeneration in suspension culture of orchardgrass. Each value represents the mean measured in at least three independent experiments. Bars indicate standard deviations of the mean activities.

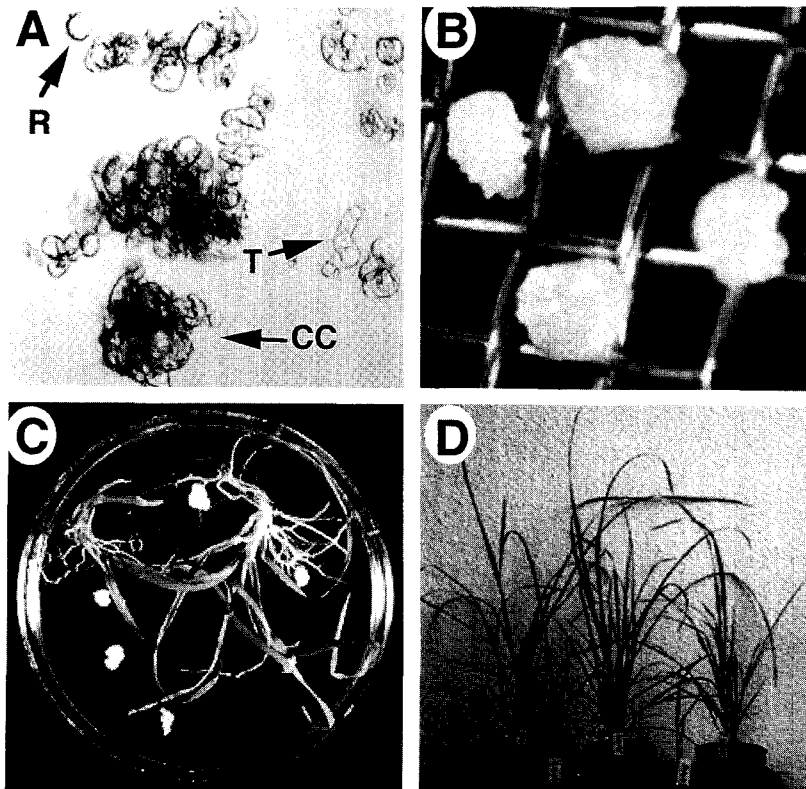


Fig. 4. Embryo formation and plant regeneration from suspension culture of orchardgrass. A ; Round cell (R), tube cell (T) and cell colony (CC), B ; Somatic embryo formed from suspension culture, C ; Plant regeneration, D ; Plants cultivated in pots for 5 weeks.

체 분화율이 각각 73.0%와 39.6%로 가장 높게 나타났다. CH는 nitrogen이 13.3%, 18종의 서로 다른 amino acid가 73% 함유되어 있는 화합물로서, 이들 amino acid 중 L-alanine, L-glutamine, L-proline은 조직배양 효율을 향상시키는 작용을 하며, methionine, histidine, leucine 등은 몇몇 작물에 있어서 그렇지 못한 것으로 증명되고 있다 (Sigma Chemical Co. analytical data). 액체 현탁배양에서 배지 내에 첨가되는 CH의 영향은 몇몇 화분과 작물에서 보고되고 있는데, 벼의 경우 CH 첨가는 배양효율에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보고되고 있다 (Abe와 Futsuhara, 1991). 그러나, 오차드그래스의 경우 배지 내에 첨가되는 CH는 세포의 증식을 촉진시킬 뿐 만 아니라 체세포 배형성에 반드시 필요하며 배양효율을 크게 높이는 것으로 보고되었다 (Gray와 Conger, 1985). 본 연구에서도 무처리보다는 CH가 첨가된 배지에서 부정배의 형성률과 재분화율이 높게 나타나 Gray와 Conger (1985)의 결과와 일치하는 경향을 나타내었다. 벼와 오차드그래스에서 CH의 효과면에서의 차이는 작물의 종이 다른데서 비롯된 결과라고 추정되어진다. 따라서 오차드그래스의 현탁배양시 4 g/l의 CH를 첨가하면 높은 배양효율을 얻을 것으로 생각된다.

그림 4는 오차드그래스의 종자유래의 캘러스로부터 현탁배양 과정을 통한 식물체 재분화 과정을 보여주고 있다. 즉, 캘러스를 현탁배양하면 round 및 tube 모양의 세포가 형성되며, round형의 세포가 분열하여 세포피가 형성된다 (Fig. 4A). 이들 세포피가 분열을 거듭하여 부정배가 형성되고 (Fig. 4B), 부정배를 재분화 배지에 이식하였을 때 recollusing 과정없이 식물체가 재분화되며 (Fig. 4C), 재분화된 식물체를 20일간 순화시킨 다음 화분에 이식하면 완전한 식물체로 성장하는 양상을

보였다 (Fig. 4D).

IV. 적 요

오차드그래스의 종자배양에서 형성된 캘러스를 현탁배양하여 배양기간별 부정배 형성정도와 식물체 재분화율 등에 대한 몇 가지 실험을 수행하여 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다. 종자유래의 캘러스를 현탁배양하였을 때, 세포 모양이 둥근 것과 그들의 세포피는 배양 50일 후에 최대치를 나타내었고 그 이후는 감소하였다. 현탁배양 기간에 따른 캘러스의 부정배 형성과 식물체 분화율은 배양 60일째 가장 높았으며, 그 이후는 감소하는 경향이었다. 현탁배양에서 배지 내에 첨가되는 casein hydrolysate (CH)의 적정농도는 4 g/l인 것으로 나타났다.

V. 인 용 문 헌

1. 김기용, 임용우, 최기준, 신재순, 김정갑, 조진기. 1998. N₆ 배지에서 오차드그래스 캘러스로부터 빠른 재분화. 한초지. 18(3):267-272.
2. 이효신, 권용삼, 이병현, 이상현, 조진기. 1998. Orchardgrass의 종자유래 캘러스로부터 식물체 재분화. 한초지. 18(4):285-290.
3. Abe, T. and Y. Futsuhara. 1991. Regeneration of rice plants from suspension cultures, In Bajaj eds, Biotechnology Agriculture and Forestry 14, Springer-Verlag, Berlin, pp. 38-46.
4. Chu, C. 1978. The N₆ medium and its applications to anther culture of cereal crops. Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture, Science Press, Pecking. pp. 43-50.
5. Conger, B.V. and G.E. Hanning. 1991. Registration of *Embryogen-P* orchardgrass germplasm with a high capacity for somatic embryogenesis

- from *in vitro* cultures. *Crop Sci.* 31:855.
6. Conger, B.V., G.E. Hanning, D.J. Gray and J.K. McDaniel. 1983. Direct embryogenesis from mesophyll cells of orchardgrass. *Science* 221: 850-851.
 7. Gray, D.J., B.V. Conger and G.E. Hanning. 1984. Somatic embryogenesis in suspension and suspension-derived callus cultures of *Dactylis glomerata* L. *Protoplasma* 122:196-202.
 8. Gray, D.J., B.V. Conger. 1985. Influence of dicamba and casein hydrolysate on somatic embryo number and quality on cell suspensions of *Dactylis glomerata* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 4:123-133
 9. Hanning, G.E. and B.V. Conger. 1986. Factors influencing somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata* L. *J. Plant Physiol.* 123:23-29.
 10. Hiei, Y., T. Komari and T. Kubo. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 35:205-218
 11. Horn, M.E., B.V. Conger and C.T. Harms. 1988. Plant regeneration from protoplasts of embryogenic suspension cultures of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) *Plant Cell Rep.* 7:371-374.
 12. Songstad, D.D. and B.V. Conger. 1986. Direct embryogenesis from cultured anthers and pistils of *Dactylis glomerata*. *Am. J. Bot.* 73:989-992.