

## 톨 페스큐의 종자배양에 있어서 식물체 재분화에 미치는 몇가지 요인

이효신 · 이승민 · 권용삼 · 이병현\* · 조진기

### Factors Affecting Plant Regeneration from Seed-Derived Calli in Tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.)

Hyoshin Lee, Seungmin Lee, Yongsham Kwon, Byunghyun Lee\* and Jinki Jo

#### Abstract

In an effort to optimize tissue culture responses of tall fescue, the effects of basic medium and carbon sources on seed culturability and genotypic difference of plant regenerability were investigated. The MS basal medium was superior to N<sub>6</sub> and B<sub>5</sub> medium in enhancing callus growth and plant regeneration. To determine the effect of carbon sources on plant regeneration, the seeds were cultured on medium with 30 g/L sucrose and maltose, respectively. Medium supplemented with 30 g/L sucrose resulted in regeneration of shoots from 50% of the calli. The genotypic difference in plant regenerability was obvious among five cultivars of tall fescue tested. 'KY31' and 'Hokuryo' showed to have higher regenerability with the frequency of 33% and 51%, respectively.

(Key words : Callus growth, Plant regeneration, Tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.))

#### I. 서 론

톨 페스큐는 유럽이 원산지이며, 생육적온이 15~21℃이나 고온과 저온에 잘 견디는 다년생 한지형 화분과 식물로서 사료작물, 잔디, 토양 보존용 작물로 널리 이용되고 있다. 이러한 장점 때문에 세계 여러 나라에서 톨 페스큐에 대한 육종연구가 활발히 수행되고 있으며(Bai 및 Qu, 2001), 우리나라의 경우 외국에서 몇몇 품종을 도입하여 이용하고 있는 실정이다.

최근 식물의 세포나 조직 및 기관을 배양하여 식물체를 재분화시키는 조직배양 기술은 여러 작물에서 연구되어 신품종 육성의 보조수단으로 활용되고 있다(Vasil 및 Vasil, 1984). 이러한 기법을 사료작물의 하나인 톨 페스큐에 적용한다면, 새로

운 유전자원의 확보라는 측면에서 큰 의의가 있을 것이며, 나아가 새로운 유전자를 식물체 내로 도입하는 형질전환 기술의 기초 자료로 이용될 수 있을 것이다. 톨 페스큐의 조직배양에 관한 연구는 성숙배(Lowe 및 Conger, 1979), 미숙배(Bai 및 Qu, 2001), 어린 화서(Eizanga 및 Dahleen, 1990) 등의 여러 조직으로부터 재분화된 식물체의 획득이 보고되었으나, 아직까지도 육종가가 이용할 만한 수준에 이르지 못하고 있는 실정이다. 또한 형질전환 기술이 단자엽 식물에서도 일반화됨에 따라, 배양재료의 안정적인 공급이라는 측면에서 성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체 재분화 체계의 확립은 무엇보다도 중요할 것이다(Hiei 등, 1997).

따라서 본 연구에서는 톨 페스큐의 종자배양에서 식물체 재분화 능력을 향상시키기 위하여, 배

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

\*경상대학교 농과대학(College of Agriculture, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea)

양효율의 품종간 차이, 배지조성 등에 대한 실험을 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

본 실험에서는 농촌진흥청 축산기술연구소에서 표준재배법으로 재배되어 채종된 툴 페스큐의 품종 중 'Hokuryo', 'KY31', 'Stef', 'Enforcer' 및 'Cajun'을 공시품종으로 사용하였다. 성숙종자의 외영과 내영을 제거하고, 70% ethanol에 30초간 표면살균하여, 1% sodium hypochlorite 용액에 50분간 소독한 후, 멸균수로 3회 세척하였다.

툴 페스큐의 종자배양에서 캘러스 형성 및 식물체 재분화를 위한 적정 배지를 선정하기 위하여, 'Hokuryo'를 공시품종으로 하여 2 mg/l 2,4-D, 30 g/l maltose, 2 g/l casein hydrolysate, 5 g/l gelrite가 첨가된 MS(Murashige 및 Skoog, 1962), N<sub>6</sub>(Chu 등, 1975), B<sub>5</sub>(Gamborg 등, 1968) 배지에 각각 종자를 치상한 다음, 26±1℃로 조절되는 항온실에서 암상태로 40 일간 배양하여 캘러스를 유기시켰다. 캘러스는 1 mg/l NAA, 5 mg/l kinetin, 30 g/l maltose, 5 g/l gelrite가 첨가된 MS 배지에 이식하여 배양 45일 후의 식물체 재분화율을 조사하였다. 그리고 배지 내에 첨가되는 적정 탄소원을 구명하기 위하여 기본배지로 MS 배지를 사용하여, 캘러스 유도 및 식물체 재분화 배지에 maltose와 sucrose를 각각 첨가하여 탄소원의 종류에 따른 캘러스 형성 및 식물체 재분화 능력을 비교하였다.

툴 페스큐의 종자배양에서 식물체 재분화 능력의 품종간 차이를 조사하기 위하여, 'Hokuryo' 외 4품종('KY31', 'Stef', 'Enforcer', 'Cajun')을 이용하여 2 mg/l 2,4-D, 30 g/l sucrose, 2 g/l casein hydrolysate, 5 g/l gelrite가 첨가된 MS 배지에 종자를 치상하여 캘러스를 유기시킨 다음, 캘러스를 1 mg/l NAA, 5 mg/l kinetin이 첨가된 MS 배지에 이식하여 식물체 재분화 능력을 비교하였다.

캘러스 생체중은 배양 40일 후에 1립의 종자에서 유기된 캘러스의 무게로 조사하였으며, 식물체 재분화는 26±1℃로 조절되고 1일 2,500 Lux로 조명되는 항온실에서 45일간 배양한 다음, 이식된 캘러스에 대한 식물체가 유기된 캘러스의 수를 백분율로 나타내었다.

## III. 결과 및 고찰

툴 페스큐의 품종 중 'Hokuryo'의 종자를 2 mg/l의 2,4-D가 첨가된 MS, N<sub>6</sub> 및 B<sub>5</sub> 배지에 배양하여 캘러스 형성 정도와 식물체 재분화율을 비교한 결과(Table 1), B<sub>5</sub> 배지에서 형성된 캘러스의 생체중은 87.2 mg인 반면에 MS 배지에서 형성된 캘러스는 137.4 mg을, 그리고, N<sub>6</sub> 배지에서 형성된 캘러스의 생체중은 121.8 mg을 나타내었다. 또한 이들 캘러스를 1 mg/l NAA와 5 mg/l kinetin을 첨가한 각각의 재분화 배지에 이식하였을 때, B<sub>5</sub> 배지와 N<sub>6</sub> 배지에서 형성된 캘러스로부터의 재분화율은 10%와 19%를 각각 나타내었으나, MS 배지

Table 1. Effect of basic medium on callus growth and plant regeneration in seed culture of tall fescue

| Basic media    | No. of seeds transferred | Callus weight of per a seed <sup>a)</sup> (mg) | No. of calli transferred | % of plant regeneration |
|----------------|--------------------------|--|--------------------------|-------------------------|
| N <sub>6</sub> | 100                      | 121.8±11.3                                     | 100                      | 19.0                    |
| MS             | 100                      | 137.4±15.4                                     | 100                      | 33.0                    |
| B <sub>5</sub> | 100                      | 87.2±12.7                                      | 100                      | 10.0                    |

<sup>a)</sup> Cultivar : Hokuryo

Table 2. Effect of carbon sources on callus growth and plant regeneration in seed culture of tall fescue

| Carbon sources | No. of seed transferred | Callus weight of per a seed <sup>a)</sup> (mg) | No. of calli transferred | % of plant regeneration |
|----------------|-------------------------|--|--------------------------|-------------------------|
| Maltose        | 100                     | 127.3±17.6                                     | 100                      | 32.0                    |
| Sucrose        | 100                     | 156.4±10.3                                     | 100                      | 50.0                    |

<sup>a)</sup> Cultivar : Hokuryo

에서 형성된 캘러스는 33%의 높은 재분화 능력을 나타내었다.

일반적으로 화분과 작물의 조직배양에서는 N<sub>6</sub> 배지가 MS 배지보다 효율적이라고 알려져 있는데 (Vasil 및 Vasil, 1984), 사료작물인 켄터키 블루그래스의 종자배양(Griffin 및 Dibble, 1995; Van der vaik 등, 1995)과 툴 페스큐의 미숙배(Bai 및 Qu, 2001) 및 화서 배양(Eizanga 및 Dahleen, 1990)에서 식물체 재분화에는 MS 배지를 주로 이용하고 있는 실정이다. 본 연구에서도 툴 페스큐의 종자배양에 있어서 MS 배지가 N<sub>6</sub> 및 B<sub>5</sub> 배지보다 캘러스 형성 및 식물체 재분화 효율이 높게 나타남을 확인할 수 있었다.

툴 페스큐의 종자배양에서 배지 내에 첨가되는 탄소원의 종류가 캘러스 형성 및 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사하였다(Table 2). 그 결과, maltose 첨가구의 경우 캘러스 생체중과 식물체 재분화율은 127.3 mg과 32%를 나타낸 반면에, sucrose 첨가구의 경우 156.4 mg과 50%를 나타내어, sucrose가 첨가된 배지에서 형성된 캘러스가 생체중도 무겁고 식물체 재분화율도 높은 양상을 나타내었다.

식물 조직배양에 있어서 배지 내에 첨가되는 탄소원은 일반적으로 sucrose가 주로 이용되고 있는데, 작물에 따라서 glucose나 maltose를 첨가하여 배양효율을 향상시킨 예가 밀, 감자에서 보고된 바 있다(Vasil 및 Vasil, 1984). 본 연구에서는 maltose 보다는 sucrose를 배지 내에 첨가하면 배양

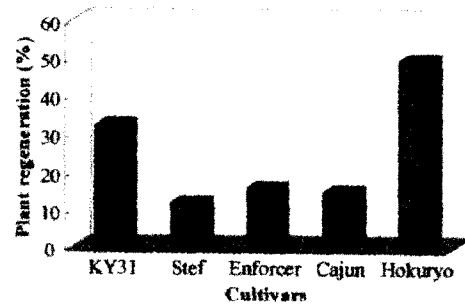


Fig. 1. Varietal difference of plant regeneration ability from seed-derived calli of tall fescue.

효율이 크게 향상되는 것으로 나타났는데, 탄소원의 보다 구체적인 효과를 구명하기 위해서는, 여러 가지 탄소원의 단독 또는 혼용의 효과에 대한 깊이 있는 연구가 있어야 될 것으로 생각된다.

툴 페스큐의 종자배양에서 30 g/l의 sucrose가 첨가된 MS 배지가 캘러스 형성 및 식물체 재분화에 효과적인 것으로 나타났다. 따라서 이러한 배지 조성이 다른 품종의 식물체 재분화 능력에 어떠한 차이를 나타내는지 여부를 조사하기 위하여, 'Hokuryo'의 4품종의 식물체 재분화 능력을 비교한 결과(Fig. 1), 식물체 재분화 능력은 품종에 따라 18~51%까지의 큰 차이를 나타내었는데, 특히 'KY31'과 'Hokuryo'는 각각 33%와 51%의 높은 식물체 재분화 능력을 나타내었다. 그러나 'Stef',

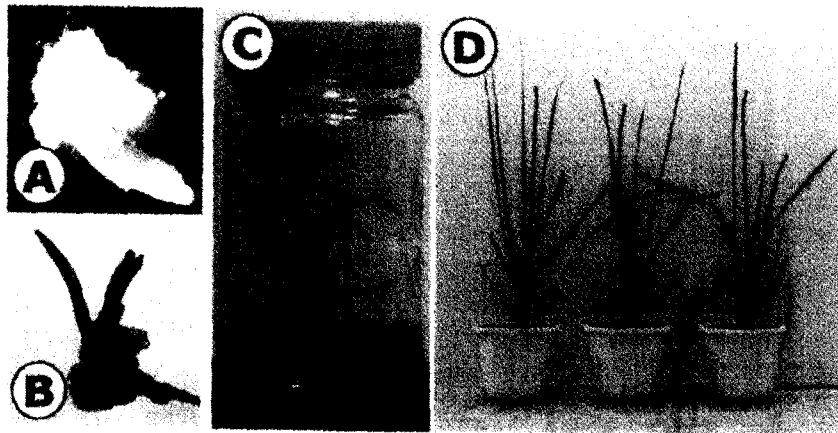


Fig. 2. Plant regeneration from seed-derived calli in seed culture of tall fescue. (A) Callus formation from seed cultured on medium. (B) and (C) Plantlet development from seed-derived calli (D) Regenerated plants cultivated in pot for 5 weeks.

'Enforcer', 'Cajun' 등은 20% 미만의 식물체 재분화 능력을 나타내어 모식물의 genotype에 따라서 큰 차이를 나타내는 것으로 조사되었다. 툴 페스큐의 배양효율에 있어 이러한 품종간의 차이는, 화서배양에서 genotype에 따라 식물체 재분화율이 1.1~30.5%까지 다양하게 나타난다고 보고된 바 있다 (Eizanga 및 Dahleen, 1990).

그림 2는 툴 페스큐의 종자배양 과정을 나타내는 것으로, 2 mg/l의 2,4-D가 첨가된 배지에 종자를 배양하면 배양 15~20일경부터 배반부에서 캘러스가 형성되며(Fig. 2A), 형성된 캘러스를 재분화 배지에 이식하면 배양 10일 후부터 식물체가 재분화되기 시작하였다 (Fig. 2B). 그리고 재분화된 어린 식물체를 생장조절제가 첨가되지 않은 MS 배지로 이식하였을 때 정상 식물체 (Fig. 2C)로 발육되었으며, 이들 식물체를 순화처리 후 포트에서 재배하였다 (Fig. 2D).

이상의 결과로 보아 툴 페스큐의 종자배양에서는, 2 mg/l 2,4-D와 30 g/l의 sucrose가 첨가된 MS 배지에서 배양하여 캘러스를 유기시킨 다음, 1 mg/l NAA와 5 mg/l kinetin이 첨가된 MS 배지에 캘러스를 이식하면 식물체 재분화에 적합한 것으로 나타났다. 또한 툴 페스큐의 품종 중 'KY31'과 'Hokuryo'는 각각 33%와 51% 이상의 높은 식물체 재분화 능력을 나타내어, 이들 품종에서 형성된 캘러스는 유용유전자의 형질전환을 위한 식물체 재료로 크게 이용되어질 수 있을 것으로 사료된다.

#### IV. 적 요

툴 페스큐의 종자배양에서 캘러스 형성 및 식물체 재분화 체계를 확립하기 위하여, 기본배지와 탄소원의 종류별 식물체 재분화 정도 및 배양효율의 품종간 차이 등에 대한 실험을 수행하여 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다. 기본배지의 종류에 따른 캘러스 형성 및 식물체 재분화율은 MS 배지가 N<sub>6</sub> 배지나 B<sub>5</sub> 배지보다 높게 나타났다. 배지 내에 첨가되는 탄소원의 종류에 따른 식물체 재분화율은 sucrose가 maltose보다 효과적이었다. 툴 페스큐의 종자배양에 있어서 모식물의 genotype에 따라 식물체 재분화 능력은 큰 차이를 보였으며, 공시품종 중 'KY31'과 'Hokuryo'의 재분화 능력이 각각 33%와 51%로 가장 높았다.

#### Acknowledgement

이 논문은 2001년도 경북대학교 Post-Doc. 연구 지원에 의하여 연구되었음.

#### V. 인용 문헌

1. Bai, Y. and R. Qu. 2001. Factors influencing tissue culture responses of mature seeds and immature embryos in turf-type tall fescue. *Plant Breeding*. 120:239-242.
2. Chu, C. C., C.C. Wang, C. S. 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. *Sci. Sinica*. 18:659-668.
3. Eizanga, G. C. and L. S. Dahleen. 1990. Callus production, regeneration and evaluation of plants from cultured inflorescences of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 22:7-15.
4. Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151-158.
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. Hiei, Y., T. Komari and T. Kubo. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 35:205-218.
7. Lowe, K. W. and B. V. Conger. 1979. Root and shoot formation from callus cultures of tall fescue. *Crop Sci.* 19:397-400.
8. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 25:473-497.
9. Van der Valk, P., F. Ruis, A. M. Tettelaar-Schrier and C. M. Van de Velde. 1995. Optimizing plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass. The effect of benzyladenine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 141:589-595.
10. Vasil, V. and I. K. Vasil. 1984. Induction and maintenance of embryogenic callus cultures of Gramineae, pp. 36-42, In Vasil, I. K. (ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 1. Academic Press, Orlando, Florida.