韓草誌 (J. Korean Grassl. Sci.) 22(3) : 209~212, 2002

약(葯)배양 기법 이용한 이탈리안 라이그라스 식물체 생산

김기용 · 강경민 · 최기준 · 임용우 · 장요순 · 성병렬 · 손대영* · 이병현** · 조진기***

Production of New Regenerated Plant by Anther Culture of Italian Ryegrass

K. Y. Kim, K. M. Kang, G. J. Choi, Y. W. Rim, Y. S. Jang, B. R. Sung, D. Son*, B. H. Lee** and J. Jo***

ABSTRACT

We obtained regenerated Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) plants by anther culture. When Italian ryegrass anther was incubated for 20 days on callus induction medium, MS medium containing 30 g/ℓ of sucrose, 2 mg/ℓ of NAA and 1 mg/ℓ of kinetin, its callus was induced. The ratio of callus induction was 9.2 %, the mean of callus weight was 8.6 mg/callus/anther. When Italian ryegrass callus was incubated for 50 days on plant regeneration medium, MS medium containing 30 g/ℓ of sucrose, 1 mg/ℓ of NAA and 2 mg/ℓ of kinetin, Italian ryegrass plant was regenerated. The ratio of plant regeneration was 26%.

(**Key words** : Italian ryegrass, Anther Culture, Callus Induction, Plant regeneration)

Ⅰ. 서 론

한국에서 이탈리안 라이그라스(*Lolium multiflorum* Lam.)의 육종은 지금까지 대부분 교잡육종 및 선발육종에 국한되어 있었다. 이탈리안 라이그라스는 답리작으로 이용가치가 높은 일년생 또는 월년생 목초로서, 수량 및 사료가치가 높고 여러 번 베어 먹일 수 있는 장점이 있으나, 추위에 견디는 힘이 약해 우리 나라에서 재배지역은 대전이남으로 국한되는 단점이 있다. Choi 등 (2000)은 다교잡(polycross)법으로 내한성 이탈리안 라이그라스를 개발하여, 1월 평균기온이 −9℃ 이상이고 해발 400 m 이하인 지역에서 재배가 가능할 뿐만 아니라, 내도복성, 풍엽성 및 건물생산성이 우수한 "화산 101호" 품종을 개발하여 국내 축산농가에 보급하고 있다. 또한 그 이후에도 우수한 특성을 지닌 "화산 102호"(Choi 등, 2001(a)) 및 "화산 103호"(Choi 등, 2001(b))가 개발되었으며, 이들 품종을 외국 종자회사에 생산을 의뢰해 종자 판매시 로열티를 받는 조건으로 계약을 체결한 바 있다.

하지만 교잡육종 및 선발육종은 오랜 기간이 소요되고 많은 인력이 필요한 단점이 있기 때문에, 육종기간을 단축시키면서도 우수한 특성을 지닌 품종을 육성하기 위한 연구들이 계속되어 왔다. 최근 들어 유전공학적 방법으로 유용 유전자를 도입하여 형질전환 이탈리안 라이

축산기술연구소 (National Livestock Research Institute, Suwon 441-350, Korea)
* 경상대학교 대학원 응용생명과학부 (Graduate School of Applied Life Sciences, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea)
** 경상대학교 농과대학 (College of Agriculture, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea)
*** 경북대학교 농과대학 (College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea)

그라스를 만들거나, 약배양 기법을 이용해 조기에 유전적 고정 계통을 육성하므로써 육종기간을 단축하는 방법들이 연구되고 있다. 유용 유전자를 도입한 형질전환 이탈리안 라이그라스를 만들기 위해서는, 세포단계에서 식물체로 분화시킬 수 있는 재분화기술이 확립되어 있어야만 한다. 이탈리안 라이그라스의 재분화와 관련된 연구에는 Rim 등 (2000), Kim 등 (2001), Lee 등 (2002) 등의 연구논문들이 있다. 이탈리안 라이그라스의 약(葯) 배양과 관련된 연구는 아쉽게도 거의 없는 실정이다. 우리는 같은 화본과 식물인 벼의 약(葯) 배양 관련 논문들을 검토하여 이탈리안 라이그라스 약(葯) 배양을 시도해 보기로 하였다. 벼 약(葯) 배양 관련 논문들로는 Kwon 등 (2001), Qian 등 (2001), Mandal 등 (2000), Guzman 및 Zapata Arias (2000), Afza 등 (2000), Khush (1997), Xu 등 (1997) 등이 있다.

본 연구에서는 이탈리안 라이그라스의 약(葯) 배양 가능성을 검토하기 위하여, 캘러스 유도배지 1종, 식물체 재분화배지 1종만을 정하여 이탈리안 라이그라스 약(葯)을 대량으로 배양하여 보았다. 다음 연구에서는 본 연구의 결과를 근거로 해서 약(葯) 배양 효율을 좀 더 높일 수 있는 정확한 조건을 조사할 계획이다. 이탈리안 라이그라스 약(葯) 배양이 계획대로 진행된다면, 품종육성 기간의 단축, 유전적 고정 계통 집단의 이용에 따른 선발효율 극대화, 고세대 분리집단에서 우량형질 조기 고정, 열성형질 관련 유전변이 확대 등이 기대된다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 식물재료

식물재료로는 축산기술연구소에서 육성한 이탈리안 라이그라스 (*Lolium multiflorum* Lam.) 계통 중 내한성이 강하고 숙기가 빠른 계통 A를 공시하였다. 5월초에 출수기부터 개화전까지 이탈리안 라이그라스 계통A의 화서(花序)를 채취한 다음, 멸균수를 채운 용기에 배양재료를 꽂아 비닐로 외부를 밀봉하고, 8℃로 유지되는 chamber에서 암조건으로 10일 이상 전처리를 실시하였다. 전처리를 마친 꽃차례를 꺼내어 약(葯)이 들어 있는 영(穎)을 떼내어 70% EtOH에서 5분간, 1~5% NaOCl 용액에서 10~20분간 살균한 다음, 멸균수로 2~3회 헹구고, 멸균된 filter paper로 옮겨 물기를 제거 후, 준비된 캘러스 유도배지에 치상하였다.

2. 사용배지

이탈리안 라이그라스 약(葯)으로부터 캘러스를 유도하기 위한 배지는 MS 기본배지(Murashige와 Skoog, 1962) 1 ℓ에 sucrose 30 g, NAA 2 mg, kinetin 1 mg을 첨가하여 사용하였으며, 식물체의 재분화를 위한 배지는 MS 기본배지에 sucrose 30 g, NAA 1 mg, kinetin 2 mg을 첨가하여 사용하였다 (Table 1). 모든 배지는 pH 5.8, gelrite 농도 0.6%로 조절하였다.

3. 캘러스 유도 및 식물체 재분화

이탈리안 라이그라스 계통 A의 약(葯) 유래 캘러스를 유도시, 이탈리안 라이그라스의 약(葯)을 싸고 있는 영(穎)을 소독하여 캘러스 유도배지에 치상한 다음, 25±2℃로 유지되는 생장실에서 암상태로 3~6 주간 배양하였다. 캘러스로부터 식물체의 재분화는 25±2℃로 유지

Table 1. The medium conditions for callus induction and plant regeneration from anther of Italian ryegrass line A

Line	Callus induction				Plant regeneration			
	Basal medium	Addition (per Liter)			Basal medium	Addition (per Liter)		
		Sucrose	NAA	Kinetin		Sucrose	NAA	Kinetin
line A	MS	30 g	2 mg	1 mg	MS	30 g	1 mg	2 mg

되는 생장실에서 1일에 12~16시간의 명상태 (2000~2500 Lux 유지)로 2개월 이상 배양하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

농촌진흥청 축산기술연구소에서 육성한 이탈리안 라이그라스 (*Lolium multiflorum* Lam.) 계통 중 내한성이 강하고 숙기가 빠른 계통 A를 공시하여, 약(葯) 배양을 통해 목초의 품종육성 연한을 단축하고, 내한성 및 조숙성에 관련된 형질들을 단기간에 고정할 목적으로 본 실험이 진행되었다.

이탈리안 라이그라스 계통A의 화서(花序)를 채취하여 8℃ chamber에서 전처리 및 살균처리 후, 화서(花序)에서 약(葯)을 분리하여 여러 차례 캘러스의 유도를 시도하였으나, 벼, 보리, 호밀 등의 약(葯) 크기에 비해 이탈리안 라이그라스의 약(葯) 크기가 너무 작은 이유로 캘러스 유도에 실패하였다. 출수 초기의 이탈리안 라이그라스의 약(葯)을 분리해 보면, 쉽게 분리가 되지 않을 뿐만 아니라, 약(葯)의 길이가 1~2 mm 정도인 연약한 상태이기 때문에 쉽게 상처를 받으므로 약(葯)을 직접 배양하기에는 부적합하였다.

이탈리안 라이그라스 약(葯)이 들어 있는 영(穎)을 떼내어 배양하는 방법으로 실험을 진행한 결과, 오염율은 다소 높았지만 캘러스를 유도할 수 있었다. 이탈리안 라이그라스의 캘러스 유도와 관련된 연구들 (Rim 등, 2000; Lee 등 2002)에서는 캘러스를 유도함에 있어 옥신으로 2,4-D를 사용하였지만, 본 연구에서는 약(葯) 이외의 조직으로부터 캘러스가 유도되는 것을 방지하기 위해, 2,4-D를 사용하지 않고 2,4-D 보다 역가가 낮은 NAA를 사용하였다.

MS 기본배지(Murashige와 Skoog, 1962)에 sucrose 30 g/ℓ, NAA 2 mg/ℓ, kinetin 1 mg/ℓ을 첨가한 캘러스 유도배지에 이탈리안 라이그라스 계통 A의 영(穎)을 치상하여 배양하였을 때, 배양 20일이 지나면서 캘러스가 유도되기 시작하여 40일 정도까지 캘러스 유도가 관찰되었다. 종자로부터 캘러스를 유도하는 경우, 정상적인 종자를 사용하면 90% 이상 캘러스가 유도되지만, 이탈리안 라이그라스 계통 A의 영(穎)으로부터 캘러스 유도율은 9.2 %로서 낮았다 (Table 2). 또한 캘러스 크기에 있어서도 종자 유래의 캘러스 크기 평균 16~17 mg/callus/seed (Lee 등 2002)에 비해 8~9 mg/callus/anther 로서 다소 작았다 (Table 2).

종자로부터 캘러스를 유도한 것에 비해 약(葯) 배양에서 캘러스 유도율이 낮은 것은 약(葯) 배양 자체에서 낮아지는 원인도 있지만, 2,4-D에 비해 NAA의 역가가 낮고 약(葯)이 영(穎)에 싸여 있기 때문에 배지에 접촉하는 정도가 약해서 캘러스 유도율이 낮은 것으로 판단된다.

이탈리안 라이그라스 계통 A의 약(葯) 유래의 캘러스를 증식시켜 MS 기본배지에 sucrose 30 g/ℓ, NAA 1 mg/ℓ, kinetin 2 mg/ℓ을 첨가한 재분화 배지에 치상하여 배양한 결과, 배양 30일이 되면서 일부에서 shoot가 나타났고, 배양 50일에는 완전히 재분화된 식물체를 얻을 수 있었다. 재분화 배지에 치상 후 90일까지 배양하며 식물체 재분화를 조사한 결과, 캘러스로부터 식물체로 재분화되는 비율은 26%로 나타났다 (Table 2).

Fig. 1은 이탈리안 라이그라스 계통 A의 약(葯) 유래의 캘러스로부터 식물체를 재분화시켜 기내에서 키우고 있는 사진으로서, Fig. 1A는 이탈리안 라이그라스 계통 A의 약(葯)을 캘러스 유도배지에 치상하여 30일 배양했을 때

Table 2. The ratio of callus induction and plant regeneration from anther of Italian ryegrass line A

Line	No. of anthers transferred	% of callus induction	Callus weight of per anther (mg)	No. of calli transferred	% of plant regeneration
line A	1000	9.2	8.6	100	26.0

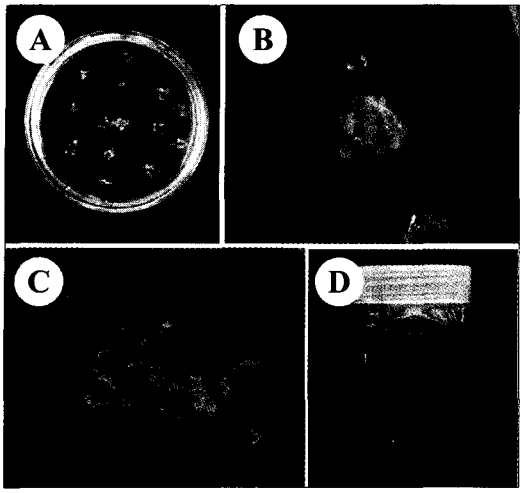

Fig. 1. Callus induction and plant regeneration from anther of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) line A.

캘러스가 유도된 사진, Fig. 1B는 증식중인 캘러스를 확대한 사진, Fig. 1C는 캘러스를 재분화 배지에 옮겨 50일 배양했을 때 식물체가 재분화된 사진, Fig. 1D는 완전히 재분화된 식물체를 배양중인 사진이다.

Ⅳ. 요 약

이탈리안 라이그라스(*Lolium multiflorum* Lam.) 계통 A의 약(葯) 배양을 실시하여 약(葯) 유래의 식물체를 생산하였다. MS 기본배지에 sucrose 30 g/ℓ, NAA 2 mg/ℓ, kinetin 1 mg/ℓ을 첨가한 캘러스 유도배지에서 배양 20일만에 약(葯) 유래의 캘러스를 유도하였다. 캘러스 유도율은 9.2%였으며, 캘러스의 평균 크기는 8.6 mg/callus/anther 였다. MS 기본배지에 sucrose 30 g/ℓ, NAA 1 mg/ℓ, kinetin 2 mg/ℓ을 첨가한 재분화 배지에 캘러스를 치상하여 배양 50일에 완전히 재분화된 식물체를 얻었으며, 캘러스로부터 식물체로 재분화되는 비율은 26 % 였다.

Ⅴ. 인 용 문 헌

1. Afza, R., M. Shen, F.J. Zapata-Arias, J. Xie, H.K. Fundi, K. Lee, E. Bobadilla-Mucino and A. Kodym. 2000. Effect of spikelet position on rice anther culture efficiency. Plant Sci. 153(2):155-159.
2. Choi, G.J., Y.W. Rim, K.Y. Kim, S.H. Choi, B.R. Sung, W.H. Kim, D.E. Shin and Y.C. Lim. 2000. A cold-tolerant and high-yielding italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) new variety "Hwasan 101". J. Korean Grassl. Sci. 20(1):1-6.
3. Choi, G.J., Y.W. Rim, Y.C. Lim, K.Y. Kim, B.R. Sung, M.J. Kim, G.J. Park and S.R. Kim. 2001(a). Growth characters and productivity of new Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) variety "Hwasan 102". J. Korean Grassl. Sci. 21(3):157-162.
4. Choi, G.J., Y.W. Rim, Y.C. Lim, K.Y. Kim, B.R. Sung, S.H. Choi and G.J. Park. 2001(b). Growth characters and productivity of new Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) variety "Hwasan 103". J. Korean Grassl. Sci. 21(3):163-168.
5. Guzman, M. and F.J. Zapata-Arias. 2000. Increasing anther culture efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) using anthers from ratooned plants. Plant Sci. 151(2):107-114.
6. Khush, G.S. 1997. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. Plant Mol. Biol. 35(1-2): 25-34.
7. Kim, K.Y., G.J. Choi, B.R. Sung, Y.W. Rim, G.J. Park, Y.S. Jang and J. Jo. 2001. Root initiation in cut Italian ryegrass stems by treatment of IBA. J. Korean Grassl. Sci. 21(1):31-34.
8. Kwon, Y.S., H.G. Lee, G.H. Park and J.K. Sohn. 2001. High frequency production of doubled-haploid plants by colchicine application in anther cultures of rice. Korean J. Plant Tissue Culture 28(1):47-52.
9. Lee, H.S., K.M. Kang and J. Jo. 2002. Factors affecting plant regeneration from seed-derived calli in Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.). Korean J. Plant Tissue Culture 28(6):323-328.
10. Mandal, A.B., T.E. Sheeja and B. Roy. 2000. Assessment of androclonal variation in an indica rice PTB 28. Indian J. Exp. Biol. 38(10):1054-7.
11. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15:71-78.
12. Qian, Q., P. He, S. Teng, D.L. Zeng and L.H. Zhu. 2001. QTLs analysis of tiller angle in rice (*Oryza sativa* L.). Yi Chuan Xue Bao. (Chinese) 28(1):29-32.
13. Rim, Y.W., K.Y. Kim, K.J. Choi, B.R. Sung and J.S. Shin. 2000. Callus induction from seeds of Italian ryegrass and plant regeneration. J. Korean Grassl. Sci. 20(1):25-30.
14. Xu, Y., L. Zhu, J. Xiao, N. Huang and S.R. McCouch. 1997. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F2, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). Mol. Gen. Genet. 253(5):535-45.