

국내육성 오차드그라스 품종들의 캘러스 형성을 및 식물체 재분화 효율

김기용 † · 강경민 · 배은경* · 이인애* · 임용우 · 최기준 · 박근제 · 손대영** · 조진기*

Callus Formation Ratio and Regeneration Efficiency of Orchardgrass Varieties Developed in Korea

Ki-Yong Kim † , Kyung-Min Kang, Eun-Kyung Bae*, In-Ae Lee*, Yong-Woo Rim,
Gi-Jun Choi, Geun-Je Park, Dae-Young Son** and Jin-Ki Jo*

ABSTRACT

Comparisons of callus formation ratios from seed explants, callus sizes, regeneration ratios from callus and regeneration efficiency for 4 orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) varieties (Three were developed in Korea and one was imported from foreign nation) are as follows; Jangbeol 102 (67.0%) has the highest callus formation ratio in 4 weeks incubated callus after bedding the seed explants, but Potomac (68.4%) has the highest ratio in 6-week callus. Potomac (3.93cm) has the highest callus size in 4-week callus, but Jangbeol 101 (4.32cm) has the highest size in 6-week callus. Jangbeol 101 (17.7%) has the highest plant regeneration ratio in 4-week callus, but Potomac (37.4%) has the highest ratio in 6-week callus. Jangbeol 102 (11.5%) has the highest plant regeneration efficiency in 4-week callus, but Potomac (25.6%) has the highest efficiency in 6-week callus.

(Key words : Orchardgrass, Callus, Regeneration, Correlation)

I. 서 론

오차드그라스(*Dactylis glomerata* L.)는 우리나라에서 주요 화본과 목초로서 많이 재배되고, 특히 혼파초지 조성시 이용되는 가장 중요한 목초 중의 하나로 인식되어 있다. 현재 재배·이용하고 있는 대부분은 외국으로부터 도

입한 품종들로서, 추위나 가뭄에는 강하지만 더위와 습해에 약한 단점이 있다. 2002년 농촌진흥청 축산기술연구소에서 품종 등록한 장벌 101호 및 장벌 102호를 포함해서 기존의 합성 2호와 함께 국내에서 육성된 품종은 모두 3품종이다. 이들 3품종 모두 전통적 육종방법인 합성육종으로 개발된 품종이며, 외국의 경우에

“이 논문은 농림기획과제 연구비 지원에 의하여 수행된 결과임.”

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

* 경북대학교 농업생명과학대학 (College of Life Sci. & Agriculture, Kyungpook Nat'l. Univ., Daegu 702-701, Korea).

** 경상대학교 대학원 분자생물학과 (PMBBRC and Dept. Molecular Biology, Gyeongsang Natl. Univ., Jinju 660-701, Korea).

Corresponding author : Ph. D. Ki-Yong Kim, Tel : +82-31-290-1674, Fax : +82-31-290-1775, E-mail : kimky77@rda.go.kr

도 대부분 전통적인 육종방법에 의해 새로운 품종이 개발되고 있다. 하지만 전통적인 육종 방법만으로는 새로운 품종을 개발하는데 오랜 기간이 소요되고, 원하는 특정 형질만을 식물체에 도입하는데 어려운 점이 많다.

조직배양과 형질전환 등 생명공학(BT)기술을 전통육종 방법과 상호 보완적으로 접목시킨다면, 새로운 품종개발에 소요되는 기간을 대폭 단축할 수 있을 뿐 아니라, 전통육종에서는 전혀 불가능한 다른 생물의 유전자를 유용작물에 직접 도입할 수 있기 때문에, 최근 생명공학기술을 이용한 새로운 품종개발 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이 분야의 연구에 있어 목초류의 경우는 타 작물에 비하여 다소 늦게 연구가 시작되었으며, 오차드그라스의 경우 1980년대에 연구가 시작되어 지금까지 다양한 연구결과가 발표되고 있다 (Gray 등, 1984; Hanning 및 Conger, 1986; Horn 등, 1988; Conger 및 Hanning, 1991; Kim 등, 1998; Lee 등, 2000; Lee 등 2001; Bae 등, 2002). 식물의 조직배양 연구에서 캘러스 유도 및 식물체 재분화는 여러 물리적 및 화학적 요인에 의해 영향을 받는데, 그 중에서도 배지의 종류 (Kim 등, 1998), 생장 조절물질의 조합 및 농도 (George 등, 1987), 습도 (Adams 및 Holder, 1992) 및 배지의 pH 등의 영향을 많이 받게 된다.

본 연구에서는 2001년부터 농림기획과제로 추진하고 있는 “내하고성 목초의 개발” 과제를 추진함에 있어, 국내에서 육성된 3개의 오차드그라스 품종에 대해 캘러스 유도를 및 식물체 재분화 효율을 밝혀냄으로써, 오차드그라스의 형질전환 연구를 성공적으로 수행하는데 반드시 필요한 효율적인 재분화조건을 구명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시품종 및 종자소독

본 연구에서는 국내 육성품종인 합성 2호

(Hapsung 2), 장별 101호 (Jangbeol 101), 및 장별 102호 (Jangbeol 102)와 대비품종으로 Potomac을 공시하였다. 이들 품종의 종자를 70% 에탄올에서 1분, 0.1% SDS/HgCl₂ 용액에서 15분, 1% NaOCl 용액에서 5분간 소독한 다음, 멸균수로 2회 씻어내었다.

2. 캘러스 유도 및 배지조성

소독을 마친 종자는 캘러스 유도 배지에 20립/plate씩 치상하여 암 상태에서 24~25℃의 온도로 7~10일간 배양후, 형성된 캘러스만을 분리하여 동일한 조성의 새 배지로 옮겨 4~6주간 계속 배양하였다. 캘러스 유도배지의 조성은 MS배지 (Murashige 및 Skoog, 1962)를 기본으로 하여 Table 1과 같은 성분들을 첨가하였으며 pH는 5.8로 조정하였다.

Table 1. Constituent for callus formation and plant regeneration

Constituent	Callus formation (l^{-1})	Plant regeneration (l^{-1})
Sucrose	30g	20g
Sorbitol	—	20g
Maltose	—	20g
Casein	1g	—
Thiamin	1mg	—
Myo-Inositol	0.25g	—
Proline	0.69g	—
2,4-D	2mg	—
NAA	—	1mg
Kinetin	—	5mg
BAP	0.0157mg	—
Copper	1.25mg	2.5mg
Gellan gum	5g	5g

3. 켈러스의 크기 및 켈러스 형성률 조사

품종별로 400립씩 종자를 치상하여 켈러스를 유도 후, 각 품종마다 200립은 4주 후에, 나머지 200립은 6주 후에 켈러스의 크기 및 켈러스 형성률을 조사하였다. 켈러스 크기는 켈러스 장축의 지름을 자로 측정하여 cm로 표시하였으며, 켈러스 형성률은 종자 200립에 대한 형성된 켈러스 수를 종자발아율로 보정하여 백분율로 나타내었다.

4. 식물체 재분화 유도 및 배지 조성

형성된 4주령의 켈러스와 6주령의 켈러스를 MS배지 (Murashige 및 Skoog, 1962)를 기본으로 하여 Table 1과 같이 성분들을 첨가하여 pH는 5.8로 조정된 재분화 유도 배지에 plate당 10개씩 치상하여 24~25℃의 광조건에서 신토가 나올 때까지 약 2~4주간을 배양하였다.

5. 식물체 재분화율 및 재분화 효율 조사

식물체 재분화율은 치상된 켈러스로부터 형성된 신토의 수를 백분율로 표시하였으며, 재분화 효율은 켈러스 형성률에 식물체 재분화율을 곱한 수를 백분율로 나타내었다 (재분화 효율 (%) = 켈러스 형성률 × 식물체 재분화율 ÷ 100).

III. 결과 및 고찰

1. 켈러스 유도 및 식물체 재분화의 관찰

국내에서 육성된 오차드그라스 3품종의 품종별 켈러스 형성률과 재분율을 조사하여 대비품종 (도입품종)인 Potomac의 수치와 비교하였다. MS배지를 기본으로 한 켈러스 유도배지에서

치상 후 7일 이후부터 유백색의 점액성 켈러스가 형성되기 시작하였다. 새로운 배지에 옮겨 4주간 배양했을 때는 좀 더 치밀하고 견고한 유백색의 켈러스가 형성되었고, 2주간 배양했을 때는 4주령의 켈러스에 비해 어두운 황백색의 켈러스가 형성되었다. 유도된 켈러스를 식물체 재분화 배지 (MS배지에 NAA 1mg/l 및 kinetin 5mg/l 첨가한 배지)에 치상하여 식물체의 재분화를 유도한 결과, 배양 4~5일 후부터 켈러스 주위에 녹색의 spot이 관찰되었으며, 이 때부터 식물체의 재분화가 시작되어 치상 후 4주 정도 지나서 완전히 재분화되었다. 이때 재분화되지 않은 대부분의 켈러스는 암갈색으로 변하여 더 이상의 재분화는 관찰되지 않았으나, 이들 켈러스에서도 솜털 모양의 뿌리와 비슷한 조직의 발생이 관찰되었다. 이러한 결과는 Bae 등 (2002)의 결과와도 일치하고 있다.

2. 4주령 켈러스로부터 식물체 재분화

국내에서 육성한 오차드그라스 3품종과 외국으로부터 도입된 품종인 Potomac의 종자로부터 켈러스 형성률, 형성된 켈러스의 크기, 켈러스로부터의 재분화율 및 재분화 효율을 4주령의 켈러스에 대하여 얻은 결과는 Table 2와 같았다.

4주령의 켈러스에 대한 종자로부터 켈러스의 형성률은 Jangbeol 102 > Hapsung 2 > Potomac > Jangbeol 101 순으로서, Jangbeol 102와 Hapsung 2는 대비품종 Potomac보다 켈러스 형성률이 높았다. 4주령의 켈러스의 크기를 직경 (cm)으로 표시하였을 때, 최저 3.47cm, 최고 3.93cm로서 품종간에 큰 차이는 없었으며, 크기순서로 보면 Potomac > Jangbeol 101 > Jangbeol 102 > Hapsung 2 순으로서, 국내육성 품종이 대비품종 Potomac에 비해 모두 작은 것으로 관찰되었다.

Table 2. Comparisons of callus formation ratio, callus diameter, regeneration ratio and regeneration efficiency in 4 orchardgrass varieties for 4-week treatment

Variety	Number of tested seeds	Callus formation(%)	Callus diameter(cm)	Regeneration (%)	Regeneration efficiency(%)
Potomac	200	60.0	3.93±0.62	16.1	9.7
Hapsung 2	200	66.2	3.47±0.41	10.3	6.8
Jangbeol 101	200	59.8	3.72±0.36	17.7	10.6
Jangbeol 102	200	67.0	3.65±0.35	17.2	11.5

4주령의 캘러스로부터 식물체 재분화는 10.3~17.7%의 넓은 범위의 차이를 보였는데, 재분화율의 순서는 Jangbeol 101 > Jangbeol 102 > Potomac > Hapsung 2의 순으로서, Jangbeol 101과 Jangbeol 102가 대미품종 Potomac에 비해 재분화율이 높게 나타났다. 4주령 캘러스로부터 식물체 재분화 효율을 계산한 결과, 그 범위는 6.8~11.5%로서 재분화율의 범위와 비교해서 그 폭이 비슷하였다. Jangbeol 102의 재분화율이 11.5%, Jangbeol 101의 재분화율이 10.6%로서 대미품종 Potomac (9.7%)보다 높았으며, Hapsung 2는 가장 낮은 6.8%였다.

3. 6주령 캘러스로부터 식물체 재분화

동일한 품종들에 대하여 캘러스 형성율, 형성된 캘러스의 크기, 캘러스로부터의 재분화율 및 재분화 효율을 6주령의 캘러스에 대하여 얻은 결과는 Table 3과 같았다.

종자로부터의 캘러스 형성률은 Potomac > Jangbeol 102 > Hapsung 2 > Jangbeol 101의 순으로서, 4주령의 캘러스 형성률 순위와 다소 다른 결과를 보였다. 형성된 캘러스의 크기는 3.76~4.32cm로서 가장 큰 것과 가장 작은 것 사이에 큰 차이는 없었다. 6주 배양 후 캘러스의 크기는 Jangbeol 101 > Potomac > Jangbeol 102 > Hapsung 2의 순으로서, 이 순서 역시 4주령 캘러스 크기 순서와 다소 차이를 보였다.

6주령 캘러스의 식물체 재분화율은 11.2~37.4%로서 큰 편차를 보였다. 4개의 품종 모두

Table 3. Comparisons of callus formation ratio, callus diameter, regeneration ratio and regeneration efficiency in 4 orchardgrass varieties for 6-week treatment

Variety	Number of tested seeds	Callus formation(%)	Callus diameter(cm)	Regeneration (%)	Regeneration efficiency(%)
Potomac	200	68.4	4.29±0.39	37.4	25.6
Hapsung 2	200	64.7	3.76±0.62	11.2	7.2
Jangbeol 101	200	59.5	4.32±0.54	23.5	14.0
Jangbeol 102	200	65.9	3.97±0.46	18.5	12.3

4주령의 캘러스에 비해 6주령의 캘러스로부터의 재분화율이 더 높게 나타났으며, 이들 중 대비품종인 Potomac은 월등하게 재분화율이 높아졌다. 이상의 결과에서 본 실험에 공시한 품종들에 대한 식물체 재분화 실험에서는 6주령의 캘러스를 이용하는 것이 재분화 효율을 높일 수 있을 것으로 판단된다.

Bae 등 (2002)의 보고에 의하면, 오차드그라스 6주령 캘러스에서 각 parameter들간의 상관관계를 조사했을 때, 캘러스 형성률과 캘러스 크기, 캘러스 형성률과 재분화 효율, 캘러스 크기와 재분화 효율 모두에서 정의 상관관계를 나타내어 1%의 높은 유의성이 있었다. 본 실험에서도 캘러스 크기와 재분화 효율 사이에 상관관계수가 $r=0.634$ 로 나타났다. 그러나 Bae 등 (2002)에서도 지적되었듯이 특정 품종에서는 통계적인 유의성과는 반대의 결과도 충분히 예상되기 때문에, 이들 통계적 수치는 참고자료로는 가능하지만 절대적 지침은 될 수 없는 것이다.

IV. 적 요

국내육성 품종인 Hapsung 2, Jangbeol 101, Jangbeol 102와 대비품종인 Potomac의 종자로부터의 캘러스 형성률, 캘러스 크기, 식물체 재분화율 및 재분화 효율을 4주령 및 6주령의 캘러스에 대하여 조사한 결과는 다음과 같다. 캘러스 형성률은 4주령 캘러스에서는 Jangbeol 102가 가장 높았고, 6주령 캘러스에서는 대비품종인 Potomac이 가장 높았다. 캘러스 크기는 4주령 캘러스에서 대비품종인 Potomac (3.93 cm)이 가장 컸으며, 6주령 캘러스에서는 Jangbeol 101 (4.32cm)이 가장 컸지만, 품종간의 차이는 적은 편이었다. 식물체 재분화율은 4주령 캘러스에서 10.3~17.7%의 넓은 범위의 차이를 보였는데, Jangbeol 101이 가장 높았으며,

6주령 캘러스에서도 역시 11.2~37.4%로서 품종간에 큰 편차를 보였으며, 특히 대비품종인 Potomac은 월등하게 재분화율이 높았다. 식물체 재분화 효율은 4주령 캘러스에서 그 범위가 6.8~11.5%로서 Jangbeol 102가 가장 높았으며, 6주령 캘러스에서는 범위가 7.2~25.6%로서 Potomac이 가장 높았다.

V. 인 용 문 헌

1. Adams, P. and R. Holder. 1992. Effect of humidity, Ca, and salinity on the accumulation of nutrients in the leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum*). J. Hort. Sci. 66:545-550.
2. Bae, E.K., I.A. Lee, K.Y. Kim, B.H. Lee, D.Y. Son, H.S. Lee, M.S. Chung and J.K. Jo. 2002. Comparison of callus formation ratios from seed explants, callus sizes and regeneration efficiency among several orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) varieties. J. Korean Grassl. Sci. 22(2):93-100.
3. Conger, B.V. and G.E. Hanning. 1991. Regeneration of embryogenic orchardgrass germplasm with a high capacity for somatic embryogenesis from *in vitro* cultures. Crop Sci. 31:855-893.
4. George E.F., D.J.M. Puttock and H.J. George. 1987. Plant culture media, Vol. 1 Formulation and uses. Exergetics Ltd. Edington UK. Leifort, C., S. Pryce, P.J. Lumsden and W.M. Waits. 1992. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plants growing *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 30:171-179.
5. 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.
6. Hanning, G.E. and B.V. Conger. 1986. Factors influencing somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata* L. Plant Physiol. 123:23-29.
7. Horn, M.E., B.V. Conger and C.T. Harms. 1988. Plant regeneration from protoplasts of embryo-

- genic suspension cultures of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). Plant Cell Rep. 7:371-374.
8. Kim, K.Y., Y.W. Rim, K.J. Choi, J.S. Shin, J.G. Kim and J. Jo. 1998. Rapid regeneration of plants on N6 medium from orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) calli. J. Korean Grassl. Sci. 18(3):267-272.
 9. Lee, H., B.H. Lee, S. Won, S. Lee and J. Jo. 2000. Effect of copper on the plant regeneration from seed derived callus of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.), J. Korean Grassl. Sci. 20(4):259-264.
 10. Lee, H., E.K. Bae, K.Y. Kim, S. Won, M. Chung and J. Jo. 2001. Transformation of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) with glutathione reductase gene. J. Korean Grassl. Sci. 21(1):21-26.
 11. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:71-78.