韓草誌 (J. Korean Grassl. Sci.) 26(4) : 187~192, 2006

오차드그래스의 품종이 캘러스배양과 식물체 재분화에 미치는 영향

이상훈 · 이기원 · 이동기 · 김도현 · 이병현

Effect of Orchardgrass Varieties on Callus Culture and Plant Regeneration

Sang-Hoon Lee, Ki-Won Lee, Dong-Gi Lee, Do-Hyun Kim and Byung-Hyun Lee

ABSTRACT

In order to investigate the effects of genetic variations of orchardgrass in tissue culture response, calli were induced from mature seeds of eight varieties, 'Hapsung 2', '93E', 'Amba', 'Ambassdor', 'Frode', 'Frontier', 'Potomac' and 'Roughrider', and plant regeneration frequency was compared. Significant differences were observed among the varieties in both callus induction and plant regeneration. Callus induction rate of viable seeds varied from 24.3% to 71.7%. Plant regeneration frequency ranged from 76.6% to 29.7%. "Roughrider" varieties showed higher regenerability with the frequency of 76.6%. These results can be used not only to provide additional improvements in the plant regeneration frequency from transgenic callus, but also useful for molecular breeding of orchardgrass through genetic transformation.
(**Key words** : Callus, Plant regeneration, Orchardgrass)

Ⅰ. 서 론

오차드그래스 (*Dactylis glomerata* L.)는 전 세계적으로도 널리 재배되고 있는 다년생의 북방형 화본과 목초로서 우리나라에서도 가장 많이 재배되고 있는 중요한 목초종 중의 하나이다. 이 초종은 주로 방목초지용 목초로서 많이 재배되고 있으며 건초 또는 사일리지 조제용으로도 재배되고 있어서 그 이용도가 가장 넓은 초종 중의 하나이다 (Miller, 1984).

지금까지 보고 된 오차드그래스의 조직배양을 통한 식물체 재분화에 관한 연구는 현탁배양세포 유래의 원형질체로부터 식물체 재분화 (Horn 등, 1988), 생육중인 잎 조직으로부터 직접 배발생을 통한 재분화에 관한 연구 (Conger 등, 1983; Trigiano 등, 1989; Vasilenko 등, 2000) 등이 보고 된 바 있다. 그러나 이러한 재분화 체계는 배양기간이 장기간 소요되고 세포분열이 왕성한 특수한 식물체 조직을 유지해야하는 등의 번거로움이 있다.

경상대학교 응용생명과학부 낙농학전공(Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea)
Corresponding author : Byung-Hyun Lee, Major of Dairy Science, Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea
Tel : +82-55-751-5418, Fax : +82-55-751-5410, E-mail: hyun@gsnu.ac.kr

최근 주요작물의 조직배양을 통한 고효율 재분화 체계가 확립되어 유용유전자 도입에 의한 신품종개발에 대한 많은 연구가 이루어지고 있지만 사료작물의 경우 조직배양에 관한 연구가 미미한 실정이며 그 효율도 상당히 낮아 조직배양 및 유용유전자 도입에 의한 품종개량에 장해요인으로 작용하고 있다. 이러한 조직배양의 중요성에 따라 배양효율 향상을 위한 많은 연구가 수행되었으며 그 결과, 생장조절제, 탄소원, 배양배지 및 배지 첨가물질의 종류와 농도 등이 오차드그래스의 조직배양 효율에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Lee 등, 2003; Lee 등, 2004; Lee 등, 2005).

그러나 오차드그래스와 같은 화본과 사료작물의 경우 품종에 따라 조직배양과 형질전환 효율에 상당한 차이를 나타내어 유용유전자의 형질전환을 통한 신품종 육종을 위한 식물재료로 사용하기에 많은 제약이 있다.

따라서 본 연구에서는 우리나라에서 재배되고 있는 가장 대표적인 화본과 목초인 오차드그래스의 8가지 품종의 성숙종자로부터 높은 재분화율을 나타내는 품종을 선발하여 유용유전자의 형질전환을 통한 신품종 개발을 위한 재료로 활용하고자 한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 종자소독

식물재료로는 오차드그래스 (*Dactylis glomerata* L.)의 8가지 품종 (Hapsung 2, 93E, Amba, Ambassdor, Frode, Frontier, Potomac 및 Roughrider)을 사용하였다. 캘러스 유도를 위한 종자의 살균은 Lee 등 (2004)의 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 성숙종자의 종피를 제거한 다음 70% ethanol에서 30초간 표면살균하고 멸균수로 3회 세정한 후, 다시 5% (v/v) sodium hypochlorite 용액을 첨가하여 30분간 교반하면서 표면살균하였다. 살균된 종자는 멸균수로 3회 이상 세정한 다음 멸균된 filter paper로 옮겨 물기를 완전히 제거한 후, 캘러스 유도배지에 치상하였다.

2. 배발생 캘러스 유도

성숙종자로부터 캘러스를 유도하기 위하여 캘러스 유도배지는 MS (Murashige와 Skoog, 1962) 기본배지에 3 mg/L 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), 0.1 mg/L BA (6-benzyladenine), 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamin-HCl, 100 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose 및 3 g/L Gelrite를 첨가한 배지 (Lee 등, 2003)를 사용하였다. 배지에 살균된 종자를 치상한 다음, 24±2℃의 생장실에서 약광조건으로 4주간 배양하였다. 캘러스 형성율은 치상한 종자에 대한 유도된 캘러스의 수를 백분율로 나타내었고 3반복으로 조사하여 비교하였다.

3. 식물체 재분화

성숙종자 유래의 캘러스로부터 식물체로 재분화시키기 위한 기본적으로 사용한 재분화배지는 N6 기본배지 (Chu 등, 1975)에 1 mg/L 2,4-D, 3 mg/L BA, 1 g/L casein hydrolysate, 1 mg/L thiamin-HCl, 100 mg/L myo-inositol, 500 mg/L L-proline, 30 g/L sucrose 및 3 g/L Gelrite가 첨가된 배지 (Lee 등, 2003)를 이용하였다. 품종에 따른 식물체 재분화 효율을 조사하기 위하여 4주령의 배발생 캘러스를 재분화 배지에 옮겨 24±2℃, 16 h light/8 h dark 조건에서 3주간 배양한 다음 동일한 새 배지에 1회 계대배양한 후, 총 6주 동안 배양하여 각각의 처리구에서 형성된 2 cm 이상으로 자란 신초를 재

분화개체로 조사하였다. 식물체 재분화율은 이식된 캘러스에 대한 식물체가 유도된 캘러스의 수를 백분율로 나타내었다. 재분화 된 신초는 1/2 MS 배지에 이식하여 뿌리발생을 유도하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 품종에 따른 캘러스 유도효율

오차드그래스의 품종간의 배양효율의 차이를 조사하기 위하여 Roughrider 외 7품종의 성숙종자를 사용하여 배발생 캘러스의 유도율을 비교한 결과 Table 1과 같이 나타났다. 4주 동안 배양한 종자로부터 캘러스 유도율은 Frontier, Roughrider, 93E, Frode, Potomac, Ambassador, Hapsung 2, Amba 순으로 높은 캘러스 유도율을 보였다. Frontier, Roughrider 및 Frode 품종이 각각 71.7%, 69% 및 68%의 높은 캘러스 유도율을 보였고, Amba 품종의 경우 24.3%로 가장 낮은 효율을 보여 오차드그래스 품종간에 상당한 차이를 나타내었다. 이러한 결과는 각 품종이 가지는 유전적 배양능력의 차이에 따른 결과로 추측되며, 비교적 종자배양시 캘러스 유도율이 높은 Frontier와 Roughrider 품종에서 형성된 캘러스는 조직 또한 단단하고 유백색으로 밝은 녹색을 띠며 조직이 치밀한 상태를 보였다.

2. 품종에 따른 식물체의 재분화 효율

성숙종자로 유도된 캘러스를 4주간 배양하여 재분화 배지에 옮겨 24±2℃, 16 h light/8 h dark 조건에서 6주간 배양한 다음 품종에 따른 재분화율을 조사한 결과 Table 2와 같이 나타났다. 식물체로의 재분화율은 Roughrider, Frontier, Potomac, Frode, Amba, Hapsung2, 93E, Ambassador 순으로 나타났다. Roughrider 품종의 경우 67.7%의 높은 식물체 재분화율을 보였고, Ambassador 품종의 경우 29.7 %로 가장 낮은 효율을 보여 식물체 재분화율 또한 캘러스 유도율과 마찬가지로 오차드그래스 품종 간에 상당한 차이를 나타내었다. 전체적으로는 캘러스 유도율이 높은 품종이 식물체 재분화율도 높은 경향을 나타내었다. 이러한 품종 간의 배양효율의 차이는 화본과 목초인 이탈리안 라이그래스 (Rim 등, 2000), 페레니얼 라이그래스

Table 1. Effect of varieties on callus formation from mature seed culture of orchardgrass

Varieties	No. of seeds transferred [a]	Callus formation (%)
Hapsung 2	100	34.3 ± 3.1
93E	100	57.0 ± 2.6
Amba	100	24.3 ± 3.1
Ambassador	100	38.7 ± 1.5
Frode	100	68.0 ± 3.6
Frontier	100	71.7 ± 3.1
Potomac	100	51.7 ± 1.5
Roughrider	120	69.0 ± 2.0

[a] Dehusked mature seeds were placed on the callus induction medium and cultured for 4 weeks.

Table 2. Effect of varieties on plant regeneration from mature seed-derived callus culture of orchardgrass

Varieties	No. of calli transferred[a]	Plant regeneration (%)
Hapsung 2	100	48.7 ± 3.5
93E	100	31.0 ± 3.6
Amba	100	59.3 ± 2.1
Ambassador	100	29.7 ± 2.1
Frode	100	61.0 ± 2.6
Frontier	100	64.3 ± 2.1
Potomac	100	62.0 ± 1.0
Roughrider	100	67.7 ± 3.2

[a] Calli were transferred to the plant regeneration medium and cultured for 6 weeks.

(Wang 등, 1993) 및 레드 페스큐(Altpeter와 Xu, 2000) 등 에서도 보고된 바 있다. 이러한 품종 간 차이는 모식물체의 genotype에 따른 차이, 품종에 따른 최적 재분화 배지조건의 차이, 기내배양시 세포의 활력 등에 따른 배양효율의 차이 때문일 것으로 추측 된다(Vasil과 Vasil, 1984). 따라서, 오차드그래스 성숙종자로부터 캘러스를 유도함에 있어 캘러스 유도율과 식물체로의 재분화율이 우수한 Frontier와 Roughrider 품종을 이용하는 것이 유용유전자를 도입한 형질전환체 생산에 효율적일 것으로 판단된다.

본 실험을 통하여 오차드그래스에 있어서 품종이 캘러스유도와 식물체 재분화 효율에 미치

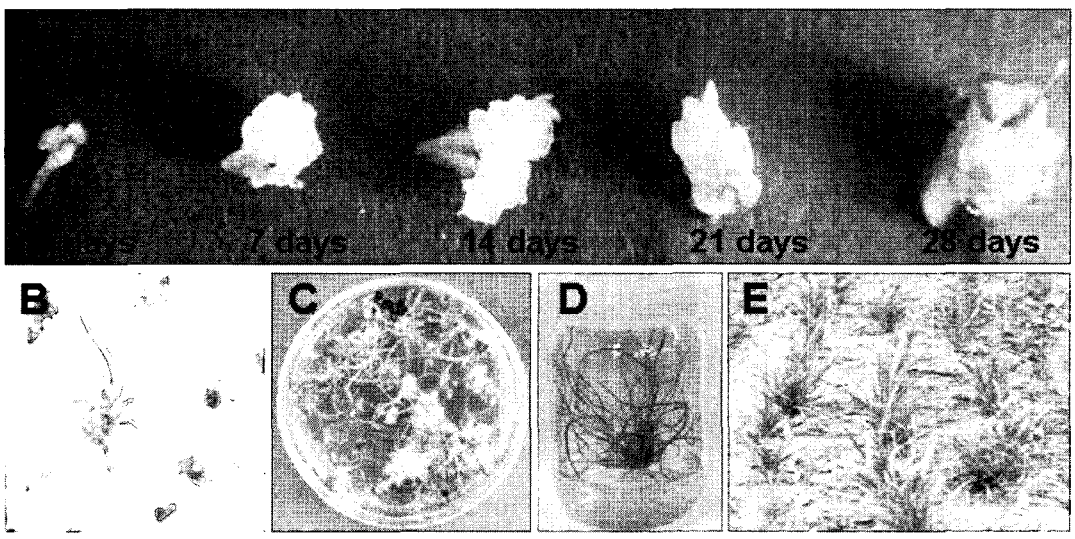

Fig. 1. Stage of callus induction and plant regeneration from mature seed-derived callus of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.)

는 영향을 재배품종 중 8가지의 품종을 사용하여 체계적으로 조사하였다. 식물체 재분화율이 우수한 'Roughrider' 품종의 성숙종자를 배양했을 때 캘러스 유도배지에서 배양 3일째부터 캘러스가 형성되기 시작하여 4주 후에는 70% 이상이 형성되었으며 (Fig. 1A), 이들을 식물체 재분화 배지에 이식했을 때 배양 6주 후에는 높은 빈도로 신초가 재분화 되었다 (Fig. 1B, C). 재분화된 신초는 1/2 MS로 구성된 rooting 배지에서 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후 (Fig. 1D), pot에 이식하여 순화시킨 다음 포장에 이식하여 재배하였다 (Fig. 1E). 본 실험을 통하여 밝혀진 품종 간의 배양효율에 대한 결과는 유용유전자 도입을 통한 형질전환 목초 개발에 있어서 유용한 자료로 활용될 수 있을 것이다.

Ⅳ. 요 약

오차드그래스의 최적 조직배양조건을 확립하기 위하여 8가지 품종의 성숙종자로부터 배발생 캘러스 유도 및 캘러스로부터의 식물체 재분화 효율을 조사하였다. 4주 동안 배양한 종자로부터 캘러스 유도율은 Frontier, Roughrider, 93E, Frode, Potomac, Ambassador, Hapsung 2, Amba 순으로 높은 캘러스 유도율을 보였고 식물체로의 재분화율은 Roughrider, Frontier, Potomac, Frode, Amba, Hapsung2, 93E, Ambassador 순으로 나타났다. 전체적으로는 캘러스 유도율이 높은 품종이 식물체 재분화율도 높은 경향을 나타내었다. 본 연구를 통하여 밝혀진 캘러스 유도와 식물체 재분화율이 우수한 품종은 분자육종을 통한 신품종 오차드그래스의 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

Ⅴ. 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 연구비 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

Ⅵ. 인 용 문 헌

1. Altpeter, F. and J. Xu. 2000. Rapid production of transgenic turfgrass (*Festuca rubra* L.) plants. Plant Physiol. 157:441-448.
2. Chu, C.C., C.S. Wang, C.C. 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. Scienta Sinic. 18:659-666.
3. Conger, B.V., G.E, Hanning, D.J. Gray and J.K. McDaniel. 1983. Direct embryogenesis from methophyll cells of orchardgrass. Sci. 221:850-851.
4. Horn, M.E., R.D. Shillito, B.V. Conger and C.T. Harms. 1988. Transgenic plants of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) from protoplasts. Plant Cell Rep. 7:469-472.
5. Lee, S.-H., D.-G. Lee, H.-S. Woo and B.-H. Lee. 2004. Development of transgenic tall fescue plants from mature seed-derived callus via *Agrobacterium*-mediated transformation. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 17:1390-1394.
6. Lee, S.-H., D.-G. Lee, J.-S. Kim and B.-H. Lee. 2003. High-frequency plant regeneration from mature seed-derived callus culture of orchardgrass. J. Korean Plant Biotech. 30:341-346.
7. Lee, S.-H., D.-G. Lee, B.-H. Lee. 2004. Effects of medium supplements on seed-derived callus culture and regeneration of orchardgrass. J. Korean Crop Sci. 49:232-236.
8. Lee, K.-W., S.-H. Lee, D.-G. Lee, H.-S. Lee, M.S. Choi, K.Y. Kim, H.S. Lee and B.H. Lee. 2005. Effect of plant growth regulators and antioxidants on callus Induction and plant regeneration from seed culture of orchardgrass. J.

korean Grassl. Sci. 25:191-198.

9. Miller, D.A. 1984. Forage crops. McGraw-Hill. New York. pp. 396-409.
10. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 15:473-497.
11. 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 Kor Grassland Sci 20:25-30.
12. Trigiano, R.N., D.J. Gray, B.V. Conger and J.K. McDaniel. 1989. Origin of direct somatic embryos from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata.* Bot. Gaz. 150:72-77.
13. Vasil, V. and I.K. Vasil. 1984. Induction and maintanance of embryogenic callus cultures of Gramineae. In: Vasil IK (eds), Cell culture and somatic cell genetics of plants, Vol 1, Academic Press, Orlando, pp. 36-42.
14. Vasilenko, A., J.K. McDaniel and B.V. Conger. 2000. Ultrastructural analyses of somatic embryo initiation, development and polarity establishment from mesophyll cells of *Dactylis glomerata. In vitro* Cell Dev. Biol. Plant 36:51-56.
15. Wang, Z.Y., J. Nagel, I. Potrykus and G. Spangenberg. 1993. Plants from cell suspension-derived protoplasts in *Lolium* species. Plant Sci 94:179-193.