방사선 처리에 의한 톨 페스큐 돌연변이 식물체 선발

이기원 · 문진용 · 지희정 · 최기준 · 김기용 · 황태영 · 이상훈*
농촌진흥청 국립축산과학원 초지사료과

In vitro Technique for Selection of Radiation Induced Mutants of Tall Fescue

Ki-Won Lee, Jin Young Moon, Hee Chung Ji, Gi Jun Choi, Ki-Yong Kim, Tae young Hwang, Sang-Hoon Lee*
Grassland & Forages Division, National Institute of Animal Science, RDA, Seonghwan, Cheonan, Chungnam, 330-801, Korea

ABSTRACT

In vitro culture and radiation techniques were used for obtaining mutants tin tall fescue. Endophyte free and friendly tall fescue cultivars Kentucky-31 and Jesup were used for induction of genetic variability through *in-vitro* mutagenesis. Mature seeds was used for callus induction on 6 mg/L 2,4-D. Actively growing and compact callus was treated with three different doses of gamma rays (10 Gy, 30 Gy and 50 Gy). Maximum proliferation and plantlets regeneration growth was observed in control and minimum at 10 Gy. Furthermore, the maximum number of tiller in the irradiated population was observed in 10 Gy. The treatments 30 Gy and 50 Gy exhibited negative impact on the tillering potential of the tall fescue plant. The object of this study was to develop protocols for mutation breeding in tall fescue through radiation techniques.
(**Key words :** Tall fescue, Mutation, Gamma rays, Endophyte, Callus)

서 론

미국을 비롯한 축산선진국에서는 최근 엔도파이트에 감염되지 않은 (endophyte free 또는 endophyte friendly) 톨 페스큐 품종 개발과 이용에 관한 많은 연구가 활발하게 진행되고 있다 (Meyer et al., 2013; Phillips and Aiken, 2009). 엔도파이트에 감염된 종자를 이용하여 톨 페스큐 초지를 조성하여 가축방목에 경우 가축의 체온상승, 번식률 저하, 유량 감소 및 증체 불량 등 그 위해성이 높은 것으로 보고되고 있다 (Gay et al., 1988; Aldrich et al., 1993; Ball et al., 1993). 반면 엔도파이트 감염 종자는 환경재해 내성을 향상시켜 톨 페스큐 초지의 영속성을 유지하는데 중요한 역할을 하기도 한다 (Arachevaleta et al., 1989; Malinowski, 2000). 국내에서는 톨 페스큐 품종개발 연구를 1990년대부터 시작하여 다양한 특성의 우량 영양계통 합성 및 선발을 통해 국내기후에 적합하고 영속성과 사료가치를 향상시킨 신품종 개발에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있으며 진행되고

Corresponding author : Sang-Hoon Lee, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 330-801, Korea. Tel: +82-41-580-6754, E-mail: sanghoon@korea.kr
2013년 8월 25일 투고, 2013년 9월 16일 심사완료, 2013년 9월 22일 게재확정

있다 (Choi et al., 2010; Lee et al., 2012). 특히 최근에는 초지산업의 활성화를 위하여 영속성을 향상시키면서 엔도파이트에 감염되지 않은 신품종 개발에 박차를 가하고 있다.

관행육종 방법에 의한 신품종 개발은 유전자원의 제한, 우량 형질 특성이 복수의 유전자에 의한 조절 및 배수성의 차이들로 인해 인공 교배에 의한 우량계통 선발 및 합성에 한계가 존재함에 따라 이를 극복할 수 있는 새로운 기술의 출현이 요구되게 되었다 (Ye et al., 1997). 방사선을 이용한 돌연변이 육종방법은 식물의 종자, 조직배양 세포 및 유식물체 등의 식물재로에 바로 적용이 가능하다 (Siddiqui et al., 1994; Karim et al., 2002). 또한 다양한 특성의 돌연변이 유도를 통한 유전자원의 다양성의 조기 확보를 통해 품종개발을 위한 육종모본으로 다양하게 활용될 수 있는 장점이 있다 (Abe et al., 2000). 또한 돌연변이가 유도된 식물체는 기존의 형질은 유지하면서 다양한 특성의 변이체를 유도하여 육종기간을 단축시켜 조기에 신품종을 개발하고 보급할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 기후환경에서 잘 적응하고 엔도파이트 프리 톨 페스큐 신품종을 개발할 목적으로 톨 페스큐 캘러스 조직에 방사선을 조사하여 식물체의 재분화 능력과 돌연변이 개체를 선발하여 우량 육종모재 개발을 위한 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 종자소독 및 캘러스 유도

성숙종자에 다양한 선량의 방사선을 조사한 후 유발되는 다양한 특성의 우량 영양계통을 선발하기 위하여 국외에서 수집한 톨 페스큐 엔도파이트 프리 5가지 품종 (AU-Triumph, Cajun, Jesup, Kentucky-31 및 Seine)의 종자를 Kim et al. (2005)의 방법에 준하여 종피 제거 후, 70% ethanol에 30분간 표면 살균한 후 tween-20이 3-5방울 첨가된 30% sodium hypochlorite (v/v) 용액으로 30분간 소독하였다. 소독한 종자는 멸균수로 5~7회 헹구어 물기를 완전히 제거한 후 캘러스 유도를 위한 배지에 치상하였다.

2. 캘러스 유도 및 방사선 조사

살균된 종자는 Kim et al. (2005)의 방법으로 캘러스 유도배지 (MS 기본배지, 500 mg/l L-proline, 100 mg/l myo-inositol, 3% sucrose, 0.5% gelrite, 6 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l BAP, 가압멸균 전 pH 5.8)가 첨가된 MS 고체 배지에 치상하여 암상태에서 40일 동안 캘러스를 유도하였다. 성숙종자로부터 유도된 캘러스는 shoot 부분을 완전히 제거한 후 새로운 배지에 계대배양하여 7일간 배양한 후 방사선 조사에 이용하였다. 캘러스 유도에 사용한 종자는 100개의 종자를 3반복으로 총 300개의 종자를 치상하여 캘러스 유도효율을 조사하였다.

3. 방사선 조사 캘러스의 식물체 재분화

감마선 조사에 의한 톨 페스큐 성숙종자 유래 캘러스로부터 재분화된 유식물체에서의 돌연변이체를 선발하기 위하여 성숙종자에서 유도된 캘러스를 감마선 0, 10, 30 및 50 Gy로 각각 24시간 조사한 후 3일간 캘러스 유도배지에서 배양하였다.

배양된 캘러스로 부터 감마선 선량에 따른 식물체 재분화 효율, 신초의 생육 및 분얼경수를 조사하기 위하여 Kim et al. (2005)의 방법으로 N6 배지 (Chu et al., 1975)에 1 g/l casein hydrolysate, 500 mg/l L-proline, 3 mg/l thiamine-HCl, 3% sucrose, 0.5% gelrite, 1 mg/l 2,4-D and 3 mg/l BA가 첨가된 고체배지에서

식물체의 재분화를 유도하였다.

재분화 된 식물체는 1/2 MS 배지에 이식하여 뿌리를 유도한 후 화분에 익하여 순화 시킨후 온실에서 재배하면서 감마선 선량에 따른 생육특성을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 품종간 배양효율

다양한 특성의 톨 페스큐 신품종을 개발하기 위하여 우선 국외에서 수집한 엔도파이트 프리 5품종의 재분화 효율을 조사하기 위하여 캘러스 형성과 식물체 재분화율을 조사한 결과 Fig. 1과 같다.

수집한 5품종의 발아율을 조사한 결과 80% 이상으로 나타났으며 (결과미제시) 이들 품종들을 캘러스를 유도한 결과 품종에 따라 49.3%~69.7%로 나타났다. 엔도파이트 프리 Kentucky-31 품종이 69.7%로 가장 높은 캘러스 유도율을 보였으며 Seine 품종이 49.3%로 가장 낮은 효율을 보였다. 식물체로의 재분화 효율은 엔도파이트 프리 Kentucky-31 품종이 66.7%로 가장 높았고 Cajun 품종이 42.0%로 나타났다.

돌연변이 육종법에 기내 조직배양 기술을 도입하면 계대배양에 의한 변이체를 대량으로 생산할 수 있으며 짧은 시간에 변이개체를 생산할 수 있는 장점이 있다 (Pierik, 1987).

따라서 톨 페스큐 기내배양 캘러스에 감마선 조사를 돌연변이체를 유기를 위한 품종은 Kentucky-31과 Jesup 품종이 효율적인 것으로 판단되어 향후 실험재로로 사용하였다.

2. 방사선 조사 선량별 식물체 재분화

엔도파이트에 감염되지 않은 다양한 육종 모본을 확보하기 위하여 재분화 효율이 60% 이상인 Jesup 품종과 Kentucky-31 품종을 선발하여 방사선 조사 후 선량별 재분화 효율을 조사하였다.

저선량 방사선 처리시 (10 Gy)의 재분화 효율은 처리하지 않은 처리구와 유사한 경향을 보였으나 30 Gy 이상의 방사선량 조사시 재분화 효율이 급격하게 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 화본과 작물인 수수의 캘러스 배양 (Yasmin et al., 2011), 벼의 약배양 (Mkuya et al., 2005) 등에서도 보고된 바 있다.

또한 품종간 재분화 효율 비교시에는 Kentucky-31 품종이 모든 방사선량 선량 처리구에서 Jesup 품종 보다 높은 경향을 보였다.

3. 방사선 조사 선량별 신초형성율

화본과 목초의 조직배양시 재분화되는 식물체는 Multi shoot으로 분화하는 경향을 보여준다 (Lee et al., 2008; Lee et al., 2009). 기내배양한 캘러스를 약 0.5 mm 크기로 절단하

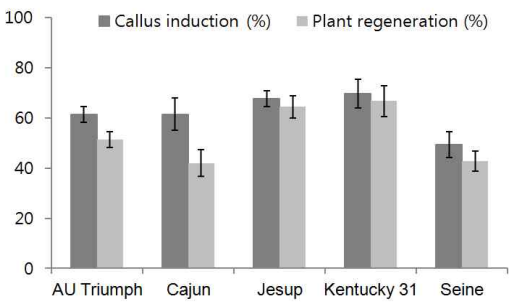

Fig. 1. Callus induction and plant regeneration percentage of five different tall fescue genotypes.

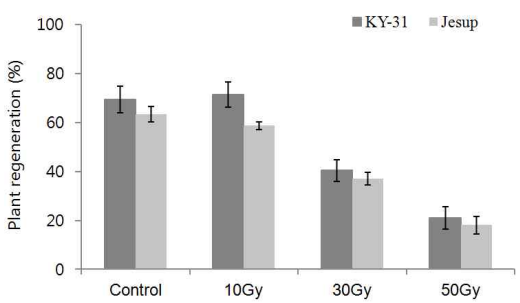

Fig. 2. Effect of different doses of gamma rays on regeneration capacity of tall fescue callus.

여 다양한 선량의 방사선을 조사한 후 캘러스로부터 분화되는 신초를 조사한 결과 방사선량이 높을수록 신초 형성능이 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 3). 또한 50 Gy 이상의 방사선 처리시 재분화 효율이 급격히 낮아졌으며 캘러스가 괴사되는 빈도가 높게 나타났다. 이러한 결과는 난을 이용한 감마선 조사시 선량의 증가에 따라 신초분화가 감소한다는 결과와 유사한 경향을 나타내었다 (Sheela et al., 2006).

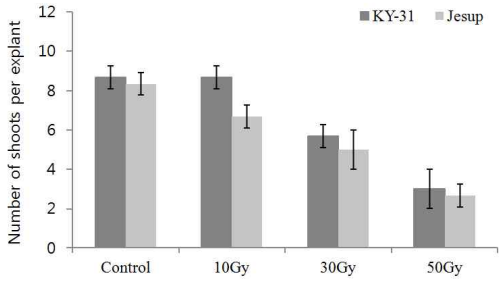

Fig. 3. *In vitro* shoot number and shoot survival of tall fescue treated with different doses of gamma rays.

4. 방사선 조사 선량별 식물체 분얼경수

뿌리의 형성이 완성된 개체들은 토양에 이식하여 기내순화 시킨 후 와그너 포트에 이식하여 재배하였다. 돌연변이 계통의 후대 종자생산을 위하여 자연조건의 온실에서 월동시킨 후 이듬해 분얼경수를 조사한 결과 Fig. 4와 같이 나타났다.

비처리구와 10 Gy 방사선량 조사시 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 30 Gy 이상의 처리구에서는 식물체의 분얼경수가 서서히 감소하여 ky-31 품종이 13개와 Jesup 품종이 11개로 나타났으며 50 Gy 선량에서는 ky-31 품종과 Jesup 품종 모두 8개의 분얼경수가 조사되었다. 방사선 선량이 높을수록 재분화된 식물체에서의 분얼경수 감소한다는 연구결과가 수수 (Yasmin et al., 2011)에서도 보고된 바 있으며 본 연구에서도 유사한 결과가 나타났다.

또한 감마선 조사를 통해 얻은 식물체는 인공교배를 통해 종자를 합성하고 계통포장에 이식하여 재배하면서 세대진전을 통해 향후 지속적으로 수량성 및 농업적 특성 등을 조사하여 톨 페스큐 신품종 개발에 활용할 것이다.

톨 페스큐 식물체의 돌연변이 유전자원을 확보하기 위하여 성숙종자 유래의 캘러스를 이용한 감마선 10Gy, 30Gy 및 50Gy을 처리

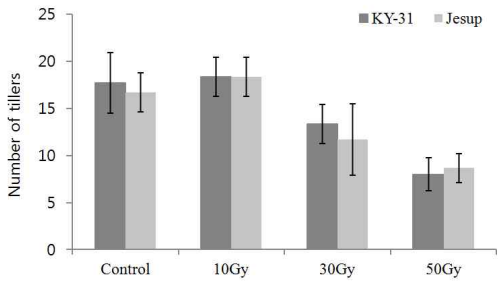

Fig. 4. Number of tillers per plant as affected by different doses of gamma rays at generation tall fescue.

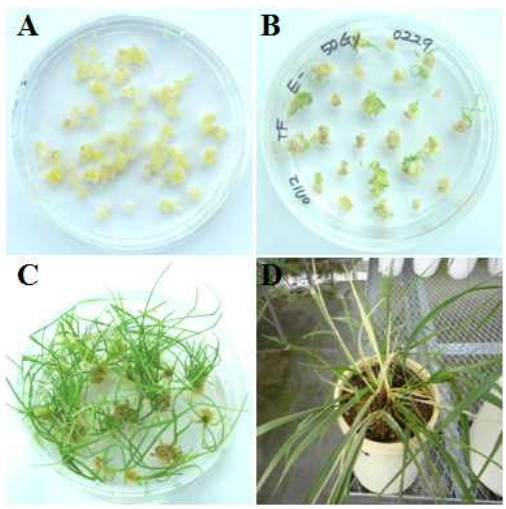

Fig. 5. Regeneration from irradiated calli of tall fescue.
(A) Induction of callus, (B) Embryogenic calli, (C) Regeneration from irradiated calli in KY-31 at 10 Gy (D) Regeneration of albino shoots in ky-31 at 50 Gy.

하여 식물체 재분화 효율 및 돌연변이를 조사한 결과 엽록소 돌연변이 등이 출현하였으며 50Gy의 높은 선량에서 식물체 재분화 효율은 낮았으나 돌연변이 출현율은 대체적으로 높게 나타났다(Fig. 5D).

결 론

다양한 특성의 톨 페스큐 신품종을 개발하기 위하여 10, 30 및 50 Gy 감마선을 캘러스에 조사한 후 식물체 재분화 효율을 조사한 결과 저선량 방사선 (10 Gy) 조사시 비처리구와 유사한 경향을 보였으나 30 Gy 이상의 방사선량 조사시 재분화 효율이 감소하는 경향을 보였다. 또한 캘러스로부터 분화되는 신초 형성능이 감소하는 경향을 보이며 50 Gy 이상의 방사선량 조사시 캘러스가 괴사되는 빈도가 높게 나타났다. 재분화 된 개체들은 기내순화 후 온실에 이식하여 월동 시킨 후 분얼경수를 조사한 결과 저선량 방사선 (10 Gy) 조사시 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 30 Gy 이상의 처리구에서는 식물체의 분얼경수가 감소하였다 비처리구에 비해 감소하였다. 향후 재분화된 돌연변이 계통들은 인공교배를 통해 종자를 생산하고 세대진전 후 수량성 및 농업적 특성 등을 조사하여 톨 페스큐 신품종 개발을 위한 육종모본으로 활용할 것이다.

본 연구결과는 톨 페스큐 신품종을 개발함에 있어 돌연변이 방사선 육종을 이용함으로써 보다 다양한 형질의 유전자원을 신속하게 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 2013년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후 연수과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

인 용 문 헌

1. Abe, T., Bae, C.H., Ozaki, T., Wang, J.M., Yoshida, S., 2000. Stress-tolerant mutants induced by heavy-ion beams. Proceedings of 39th Gamma Field Symposium, Naka-gun, Ibaraki-ken, Japan. 39, 45-56.
2. Arachevaleta, M., Bacon, C.W., Hoveland, C.S., 1989. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. Agron. J. 81, 83-90.
3. Aldrich, C.G., Rhodes, M.T., Miner, J.L., Kerley, M.S., Paterson, J.A., 1993. The effects of endophyte-infected tall fescue consumption and use of a dopamine antagonist on intake, digestibility, body temperature, and blood constituents in sheep. J. Anim. Sci. 71, 158-163.
4. Ball, D.M., Pedersen, J.F., Lacefield, G.D., 1993. The tall-fescue endophyte. Am. Sci. 81, 370-379.
5. Choi, G.J., Lim, Y.C., Ji, H.C., Kim, K.-Y., Park, H.S., Seo, S., Moon, C.S., Kim, D.H., Lee, S.-H., 2010. A Stress-Tolerant and High-Yielding Tall Fescue New Variety, ‘Greenmaster’. J. Kor. Grassl. Forage Sci. 30(3), 199-204.
6. Gay, N., Boling, J.A., Dew, R., Miksch, D.E., 1988. Effects of endophyte-infected tall fescue on beef cow-calf performance. Appl. Agric. Res. 3, 182-186.
7. Karim, M.Z., Amin, M.N., Hossain, M.A., Islam, S., Hossain, F., Alam, R., 2002. Micropropagation of two sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties from callus culture. Online. J. of Bio. Sci. 2(10), 682-685.
8. Kim, D.-H., Lee, D.-G., Lee, S.-H., Woo, H.-S., Lee, K.-W., Choi, M. S., Lee, B.

-H., 2005. Efficient Callus Culture and Plant Regeneration from Mature Seed of Tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). Journal of Plant Biotechnology. 32(3), 187-193.

9. Lee, K.-W., Kim, K.-Y., Choi, G.J., Lim, Y.C., Kim, W.H., Jung, M.W., Seo, S., Lee, B.-H., Lee, S.-H., 2008. Callus Induction and plant regeneration from mature seeds of timothy. J. Kor. Grassl. Forage Sci. 28, 165-170.
10. Lee, K.-W., Choi, G.J., Kim, K.-Y., Ji, H.C., Park, H.S., Yoon, S.H., Lee, S.-H., 2009b. High frequency plant regeneration from mature seed derived callus of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) cultivars. African Journal of Biotechnology. 8(24), 6828-6833.
11. Lee, S.-H., Lee, D.-G., Kim, J.-S., Lee, B.-H., 2003. High-frequency plant regeneration from mature seed-derived callus culture of orchardgrass. Kor J Plant Biotechnology. 30, 341-346.
12. Lee, S.-H., Lee, K.-W., Ji, H. C., Kim, K.-Y., Park, H.S., Lim, Y.C., Choi, G.J., 2012. Growth characteristics and productivity of tall fescue new variety 'Purumi' in South Korea. African Journal of Biotechnology. 11(21), 4956-5960.
13. Malinowski, D.P., Belesky, D.P., 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: Mechanisms of drought and mineral stress tolerance. Crop Sci. 40, 923-940.
14. Meyer, S.L.F., Nyczepir, A.P., Rupprecht, S.M., Mitchell, A.D., Martin, P.A.W., Brush, C.W.. Chitwood, D.J., Vinyard, B.T., 2013. Tall Fescue 'Jesup (Max-Q)': *Meloidogyne incognita* Development in Roots and Nematotoxicity. Agronomy journal. 105(3), 755-763.
15. Mkuya, M.S., Si, H.-M., Liu, W.-Z., Sun, Z.-X., 2005. Effect of ^{137}Cs Gamma Rays to Panicles on Rice Anther Culture. Rice Science. 12(4), 299-302.
16. Pierik, R.L.M., 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands.
17. Phillips, T.D, Aiken, G.E., 2009. Novel-endophyte-infected tall fescues. Forage and Grazinglands. doi:10.1094/FG-2009-1102-01-RV.
18. Siddiqui, S.H., Khatri, A., Javed, M.A., Khan, I.A., Nizamani, G.S., 1994. *In vitroculture*: Asource of genetic variability and an aid to sugarcane improvement. Pak. J. Agric. Res. 15(1), 127-133.
19. Sheela V.L., Sarada, S., Anita, S., 2006. Development of protocom-like bodies and shoots in *Dendrobium* cv. Sonia following gamma irradiation. J. Trop. Agri. 44(1-2), 86-87.
20. Ye, X., Wang, Z.Y., Wu, X., Potrykus, I., Spangenberg, G., 1997. Transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. Plant Cell Rep. 16, 379-384.
21. Yasmin, S., Khan, I.A., Khatri, A., Seema, N., Siddiqui, M.A., Bibi, S., 2011. Plant regeneration from irradiated embryogenic callus of sugarcane. Pakistan Journal of Botany. 43(5), 2423-2426.