

# 알팔파 캘러스로부터 형성된 이차체세포배의 형태가 유식물 발달에 미치는 영향

원성혜 · 이병현 · 조진기

## Effect of Embryo Morphology on Plant Development in Secondary Somatic Embryogenesis of Alfalfa

S. H. Won, B. H. Lee and J. Jo

### Abstract

Cotyledonary abnormalities were observed in secondary somatic embryos which were developed from calli cultured on MS medium with various concentrations of 2,4-D. In MS medium containing hormone-free or 0.1 mg/l 2,4-D, the frequency of normal embryo formation with two cotyledons were above 57%. According to concentration of 2,4-D increment the frequency of normal embryos were decreased. In MS medium containing 4 mg/l 2,4-D, the frequency of normal embryo formation was just 10%. The rate of germination was as follows; 37.7% of somatic embryos had one cotyledon, 85% two cotyledons, 38% three cotyledons, 35% four cotyledons, 25% five cotyledons and 29% trumpet-like cotyledons. About 80% of the embryos with two cotyledons were converted into normal plants, but one, three or four cotyledons were only 6.8~10%. The five or trumpet-like embryos were not developed into normal plants.

(Key words: Alfalfa, Somatic embryogenesis, Embryo morphology)

### I. 서 론

기내배양된 식물세포나 조직으로부터 재분화되는 식물체의 획득빈도를 향상시키기 위해서는 일정한 발육단계를 갖는 정상적인 배의 획득빈도를 높이는 것이 무엇보다 중요한 것으로 지적되고 있다. 그러나 기내배양에서 생산된 체세포배는 형태학적으로 차이가 있으며 주로 자엽의 구조에서 현저한 차이가

관찰된다. 대부분의 식물조직배양에서는 자엽이 2개인 정상적인 배 이외에 자엽의 수가 하나 또는 3개이상인 것이 형성되거나, 나팔모양 같은 비정상적인 배가 높은 빈도로 출현하고 있는 것으로 알려져 있다 (Ammirato, 1987; Merkle 등, 1987). 특히 나팔모양 또는 다자엽배가 땅두릅 (Lee와 Soh, 1993a), 멜론과 대두 (Choi 등, 1994a), 시호 (Cho와 Soh, 1995), 당근 (Soh 등, 1996; Lee 등, 1997) 및 당귀 (Cho 등,

1998) 등에서 많이 관찰되었다. 이러한 비정상적인 배의 형성에는 배지내에 첨가되는 sucrose 농도 (Steward 등, 1975), 성장조절제의 종류와 농도 (Lazzeri 등, 1987a; Lazzeri 등, 1987b; Levi와 Sink, 1991), 배양환경 (Ammirato, 1983) 등이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이들 비정상적인 배는 정상배에 비해 식물체의 획득 효율을 저하시키는 주된 요인 중의 하나로 지적되고 있어 (Wetzstein와 Baker, 1993), 배양조건과 배의 형태 및 배의 형태별 식물체 발육 양상 등에 관한 연구가 재분화효율의 향상을 위해 반드시 필요하다.

알팔파 (*Medicago sativa* L.)는 서남아시아가 원산지이며 한발과 더위에 강할뿐만 아니라, 높은 질소 고정력과 다량의 필수 아미노산을 함유하고 있어서, 가축에 의한 기호성이 우수하기 때문에 전세계적으로 널리 사용되고 있는 목초중의 하나이다. 알팔파의 재분화에 대한 연구는 1972년 Saunders 등에 의해 실시되어 처음으로 캘러스로부터 재분화 식물체를 획득하였다 (Saunders와 Bingham, 1972). 지금까지 알팔파 재분화에 대한 연구의 대부분은 재분화에 이용되는 배지 및 식물생장조절제의 조건을 달리하여 재분화율을 높이거나, 품종간 재분화율의 차이 등의 연구가 주축을 이루었다 (Brown와 Atanassov, 1985; Chen와 Thomson, 1987; Stuart와 Strikland, 1984). 그러나 체세포배 발생에서 배의 형태에 대한 연구와 배의 형태가 식물체 재생에 미치는 요인에 관한 연구 보고는 전혀 없다. 본 연구 (Won 등, 1999)에서는 2,4-D 처리에 의해 다량의 알팔파 이차체세포배를 유도할 수 있었다. 이들 체세포배 발생과정을 관찰한 결과, 2,4-D 농도에 따른 배의 형태별 분포와 배의 형태에 따른 식물체로 발육되는 양상 등에 차이를 보였으며 이에 대한 결과를 보고하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

본 실험에는 알팔파의 Vernal 품종을 재료식물로

사용하였다. 알팔파로부터 이차체세포배의 유도과정은 Won 등 (1999)의 방법에 따라 실시하였다. 7일령된 Vernal의 하배축을 7mm 크기로 잘라 2,4-D 4 mg/l 와 kinetin 0.5 mg/l 을 첨가한 MS (Murashige와 Skoog, 1962) 기본배지에 치상하여 캘러스로부터 식물체 재분화를 유도하였다. 재분화된 기내식물의 자엽을 2,4-D 4 mg/l 이 첨가된 MS 배지에 치상하여 이차캘러스를 유도하였다. 이차체세포배를 유도하기 위하여 이차캘러스를 2,4-D 0, 0.1, 1.0, 2.0, 및 4.0 mg/l 로 각각 처리한 MS 배지에 옮겨 26°C, 16시간의 광조건하에서 배양하였다. 배양 6주 후 다량의 이차체세포배가 형성되기 시작하였으며, 계대배양 없이 2주 더 배양 후 2,4-D 농도에 따른 체세포배의 형태적 특징을 비교하였다. 이들 배의 형태별로 유식물 분화양상을 조사하기 위하여, 여러 형태의 배를 식물생장조절제가 첨가되지 않은 MS 배지에 옮겨 26°C, 16시간의 광조건이 유지되는 항온실에 배양하였으며, 배양 40일 후에 배의 형태별로 유식물의 분화정도를 비교하였다.

## III. 결과 및 고찰

재분화된 식물체의 자엽으로부터 캘러스 형성과정을 거쳐 다량의 이차체세포배를 유도한 후, 이들 이차체세포배의 자엽 발생과정을 관찰한 결과, 2,4-D의 농도에 따라 배의 형태별 분포에 차이를 보였으며, 배의 형태에 따른 체세포배의 발아율도 다르게 나타났다. 배의 형태별 분포는 자엽의 형성수에 따라 2개의 자엽을 가진 정상적인 배와 1개, 3개, 4개, 5개 등 비정상적인 자엽을 갖는 체세포배 그리고 나팔모양의 배로 구분되었다. 2개의 자엽을 가진 정상적인 배의 출현빈도는 2,4-D를 첨가하지 않은 처리구에서 65%로 가장 높게 나타났으며, 배발생율이 가장 높았던 2,4-D 0.1 mg/l 처리구에서는 61%로 나타났다. 정상적인 배의 출현빈도는 2,4-D 농도가 증가할수록 감소하였는데, 2,4-D 2 mg/l 와

4 mg/l 처리구에서는 각각 33.1%와 10.7%만 정상적인 배로 발생하였다. 비정상배의 발생빈도는 2,4-D 무처리구와 2,4-D 0.1 mg/l 처리구간에 큰 차이는 없었으나, 5개의 자엽을 가진 배의 형성이 2,4-D 무처리구에서는 나타나지 않았고, 2,4-D 0.1 mg/l

처리구에서는 2% 정도 발생하였다. 2,4-D 2 mg/l 이상의 농도에서는 체세포배 발생율도 낮았으며, 배의 형태도 정상배보다 비정상배의 출현이 상대적으로 높게 나타났다 (Table 1).

Table 1. Effect of 2,4-D on morphological variation of embryos formed from secondary callus of *Medicago sativa* L.

2,4-D (mg/l)	No. of total embryos <sup>a)</sup>	Percent of cotyledonary variation					
		One	Two	Three	Four	Five	Trumpet
0	197	8.1	65.0	9.6	10.2	—	7.2
0.1	212	8.4	61.0	9.9	10.8	1.9	8.0
1.0	108	12.8	47.5	12.2	14.9	2.3	10.3
2.0	74	14.8	31.1	15.2	16.2	2.7	20.2
4.0	56	18.0	10.7	21.4	25.0	5.4	20.0

<sup>a)</sup> Embryos formed from 15 calli/petri-dish.

배의 형태별 유식물 발육양상 비교에서도 (Table 2), 자엽의 수가 2개인 정상배 (Fig. 1A)는 기내에서의 발아율이 85%로 가장 높았을 뿐만 아니라, 성장 조절제가 첨가되지 않은 MS 배지에서 정상적으로 발육되는 개체 (Fig. 1F)의 비율도 80%로 가장 높게 나타났다. 자엽수가 1개인 배 (Fig. 1B)는 일정기간 동안 신장되었지만 그 이후 정상적인 유식물로 발육되는 개체는 7.7%에 불과하였다. 자엽의 수가 3개 (Fig. 1C) 또는 4개인 배 (Fig. 1D)의 경우는 각각 37.6

%와 34.5%로 발아되었으며, 일정기간동안 상배축이 신장되어 정상적인 유식물로 발육되는 개체는 6.8~10%로 나타났다. 그리고 5개의 자엽을 가진 배와 나팔모양의 배 (Fig. 1E)는 정상적인 유식물로 발육되는 개체가 전혀 없었다.

기내배양된 식물조직으로부터 형성되는 체세포배의 형태에는 2,4-D가 크게 관여하는 것으로 알려지고 있는데, 콩의 미숙배 배양에서 NAA 보다는 2,4-D 첨가 배지에서 (Lazzeri 등, 1987a), 2,4-D가 저농도

Table 2. Frequency of plant development from callus-derived embryos with cotyledonary variation of *Medicago sativa* L.

Cotyledonary variation	No. of embryos cultured	No. of embryos germinated (%)	No. of normal plants (%)
One	69	26 (37.7)	2 ( 7.7)
Two	337	286 (84.9)	229 (80.0)
Three	77	29 (37.6)	3 (10.0)
Four	84	29 (34.5)	2 ( 6.8)
Five	12	3 (25.0)	0 ( 0.0)
Trumpet-like	68	20 (29.4)	0 ( 0.0)



에서 보다는 고농도에서 비정상적인 배의 출현빈도가 높다고 하였다 (Choi 등, 1994b). 기내배양중 다자엽배의 출현에 영향을 미치는 것으로 2,4-D 이외에 zeatin, ABA 및 GA<sub>3</sub>의 농도에 따른 체세포배의 발생과 자엽의 수적변화에 대해서도 보고된 바 있으며 (Ammirato, 1977), 땅두릅에 있어서는 배발생 캘러스를 2,4-D 배지에 계대배양하지 않고 계속배양 했을 때 비정상적인 자엽을 갖는 배의 출현빈도가 높다고 보고하였다 (Lee와 Soh, 1993b).

이러한 비정상적인 배는 정상적인 배에 비하여 배의 발아율 및 식물체의 획득 효율을 저하시킨다는 보고가 많은데, 콩 (Lazzeri 등, 1987b), 땅콩 (Baker와 Wetzstein, 1992; Wetzstein와 Baker, 1993), 더덕 (Choi, 1994c), 포도 (Isabelle 등, 1993), 대두 (Choi, 1994b) 등의 조직배양에서 알려져 있다. 그러나 강활의 경우는 주발모양의 자엽을 갖는 체세포배를 제외하고 (33.3%) 비정상자엽배의 발아율이 정상자엽 체세포배의 발아율과 비슷하다고 보고하였는데, 이러한 현상은 식물의 종과 품종에 따라서 그 비율이 다른 것으로 나타났다 (Cho와 Soh, 1998).

본 연구에서는 캘러스로부터 형성된 체세포배에서 2개의 자엽을 갖는 정상적인 배의 출현빈도가 2,4-D의 농도에 따라 차이를 보였는데, 2,4-D 농도가 증가할수록 자엽의 수가 1개, 3개, 4개, 5개 및 나팔모양의 비정상적인 배의 출현빈도가 증가하였다. 이러한 결과는 체세포배 형태형성과정 중 2,4-D가 크게 관여하는 것으로 추정되었다. 그리고 유식물 발육양상에 있어서도 자엽이 2개인 배는 대부분 정상 식물체로 발육이 되는 반면에, 자엽이 1, 3 및 4개인 비정상적인 배가 정상 식물로 발달하는 효율은 0~10%에 불과하고 대부분 고사하였으며, 특히 자엽이 5개인 배와 나팔모양의 배는 전혀 정상적인 식물체로 발달하지 못하였다. 이러한 연구결과는 기내배의 형태가 유식물의 발육에 영향을 미친다는 것을 입증해 주는 좋은 자료가 될 것으로 생각된다. 그러므로 성장조절제의 적정농도 첨가, 적정 배양기간, 정상 식물체로의 유도에 관한 구체적인 연구가 이루어진다면 모체와 동일한 안정된 식물체의 다량증식 체계가 확립 가능할 것으로 생각된다.

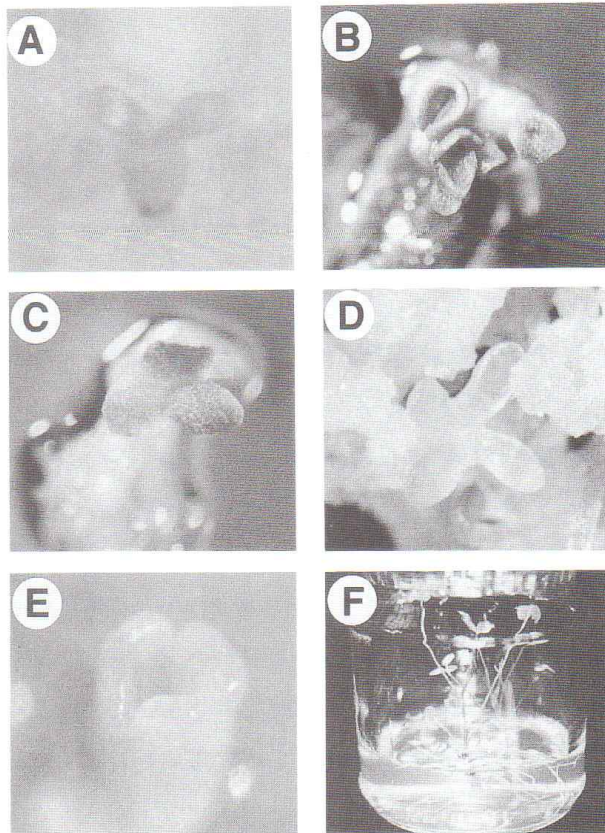


Fig. 1. Morphological variation and plant development of callus-derived embryos in hypocotyl cultures of *Medicago sativa* L. A, Normal embryo with two cotyledons; B, One cotyledonary embryo; C, A three cotyledonary embryo; D, A four cotyledonary embryo; E, A trumpet-like shape embryo; F, Normal plants developed from two cotyledonary embryos.

#### IV. 적 요

알팔파의 재분화된 식물체로부터 다량의 이차체세포배를 유도하였으며, 이들 체세포배로부터 재분화되는 식물체의 획득빈도를 향상시키기 위하여, 캘

러스에서 유래된 배의 형태 및 형태별 유식물 분화양상에 관한 실험을 수행하였다. 2,4-D 농도에 따라 체세포배의 형성에 차이를 나타내었는데, 생장조절제가 첨가되지 않았거나, 2,4-D가 0.1 mg/l 첨가된 배지에서 형성된 배는 약 57% 이상이 2개의 자엽을 갖는 정상배였으며, 2,4-D 농도가 증가할수록 정상 체세포배의 출현빈도는 감소하였고, 2,4-D 4 mg/l 에서는 10%만이 정상배로 나타났다. 배의 형태에 따른 발아율 및 유식물 분화양상을 조사한 결과, 2개의 자엽을 갖는 정상배의 경우는 발아율이 85%로 가장 높았으며, 정상식물체로 발육되는 비율도 80%로 나타났다. 그러나 자엽이 1개 또는 3~4개인 배는 정상적으로 발육되는 식물체의 비율이 10% 이하로 매우 낮았으며, 자엽이 5개인 배와 나팔모양의 배는 정상적인 식물체로 발달하지 못하였다.

## V. 인용 문헌

1. Ammirato, P.V. 1977. Hormonal control of somatic embryo development from of caraway. International of abscisic acid, zeatin and gibberllic acid. *Plant Physiol.* 59:579-586.
2. Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis. In D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (eds). *Handbook of Plnt cell Culture*, Vol 1, Collier MacMillan, London, pp. 82-123.
3. Ammirato, P.V. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. In C. E. Greens et al., eds, *Plant Tissue and Cell Cuture*, Alan R, Liss Inc, New York, pp. 57-81.
4. Baker, C.M. and H.Y. Wetzstein. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaflets of peanut, *Arachis hypogaea*. *Plant Cell Reports* 11:71-75.
5. Brown, D.C.W. and A. Atanassov. 1985. Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4:111-122.
6. Chen, T.H. and B.G. Thompson. 1987. Genotypic effects on somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of alfalfa. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 8:73-78.
7. Cho, D.Y. and W.Y. Soh. 1995. Morphology of somatic embryos formed from leaf explants of *Bupleurum falcatum* L., *Korean J Plant Tissue Culture* 22:291-297.
8. Cho, D.Y. and W.Y. Soh. 1998. Plant regeneration from somatic embryo with structural diversity from leaf explant culture of *Ostericum koreanum* Kitagawa. *Korean J. Plant Tissue Culture* 25:51-56.
9. Choi, P.S., W.Y. Soh, D.Y. Cho and J.R. Liu. 1994a. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration in seedling explant cultures of melon (*Cucumis melo* L.). *Korean J Plant Tissue Culture* 21:1-6.
10. Choi, P.S., W.Y. Soh, D.Y. Cho and J.R. Liu. 1994b. Somatic embryogenesis in immature zygotic embryo cultures of Korean soybean (*Glycine max* L.) cultivars and effect of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid on somatic embryo morphology. *Korean J Plant Tissue Culture* 21:7-13.
11. Choi, P.S., W.Y. Soh, D.Y. Cho and J.R. Liu. 1994c. Effects of carbohydrates source and osmoticum on the structural abnormality of somatic embryo of *Codonopsis lanceolata*. Abstract, Spring Meeting, Korean Society Plant Tissue Culture p. 47.
12. Isabelle, G.T., M.C. Mauro, L. Sossountzov and A. Deloire. 1993. Arrest of somatic embryo development in grapevine: histological characterization and the effect of ABA, BAP and Zeatin in stimulating plantlet development. *Plant Cell*,



- Tissue and Organ Culture 33:91-103.
13. Lazzeri, P.A., D.F. Hilderbrand and G.B. Collins. 1987a. Soybean somatic embryogenesis : Effect of hormones and culture manipulations. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 10:197-208.
  14. Lazzeri, P.A., D.F. Hilderbrand and G.B. Collins. 1987b. Soybean somatic embryogenesis : Effect of nutritional, physical and chemical factors. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 10:209-220.
  15. Lee, E.K., D.Y. Cho and W.Y. Soh. 1997. Multicotyledonary structure of somatic embryo formed from cell cultures of *Daucus carota* L. J. Plant Biology 39:71-77.
  16. Lee, K.S. and W.Y. Soh. 1993a. Somatic embryogenesis and structural aberrancy of embryos in tissue cultures of *Aralia cordata* Thumb. Korean J. Plant Tissue Culture 20:77-83.
  17. Lee, K.S. and W.Y. Soh. 1993b. Effects of cytokinins on the number of cotyledons of somatic embryos from cultured cells of *Aralia cordata* Thumb. Korean J. Plant Tissue Culture 20:171-175.
  18. Levi, A. and K.C. Sink. 1991. Somatic embryogenesis in asparagus: The role of explants and growth regulators. Plant Cell Reports 10:71-75.
  19. Murashige, Y. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15:71-78.
  20. Saunders, J.W. and E.T. Bingham. 1972. Production of alfalfa plants from callus tissue. Crop Sci. 12:804-808.
  21. Steward, F.C., H.W. Israel, R.L. Mott, H.J. Wilson and A.D. Krikorian. 1975. Observations on growth and morphogenesis in cultured cells of carrot (*Daucus carota* L.). Philos Trans R. Soc. London Ser. B. 273:33-53.
  22. Stuart, C.A. and S.G. Strikland. 1984. Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. Plant Sci. Lett. 34:165-174.
  23. Wezstein, H.Y. and C.M. Baker. 1993. The relationship between somatic embryo morphology and conversion in peanut (*Arachis hypogaen* L.). Plant Science 92:81-89.
  24. Won, S.H., B.H. Lee, K.Y. Kim, H.S. Lee and J.K. Jo. 1999. Multi-secondary somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl cultures of alfalfa (*Medicago sativa* L.). J. Korean Grassl. Sci. 19:273-280.