

버즈풋 트레포일 종자로부터 캘러스 유도 및 BOi2Y 배지에서 식물체 재분화

김기용 · 임용우 · 최기준 · 성병렬

Callus Induction from Seeds of Birdsfoot trefoil and Plant Regeneration on BOi2Y Medium

Ki-Yong Kim, Yong Woo Rim, Kee Jun Choi and Byung Ryul Sung

Abstract

The conditions for callus formation and plant regeneration were confirmed in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.). Among SH (Schenk and Hildebrandt), MS (Murashige and Skoog) and N6 medium (Chu), SH medium was highest degree of efficiencies respectively in callus formation and plant regeneration. In this study, we determined volume of hormones and other compounds appended in media. For callus formation, only 3 mg/ℓ of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) was appended in their media. For plant regeneration, we used BOi2Y medium (Bingham et al.). We obtained birdsfoot trefoil plants from callus by regeneration, about sixty days later transfer calli to regeneration media.

(Key words : Birdsfoot trefoil, Callus induction, Plant regeneration)

I. 서 론

버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.)은 1916년에 한국에 처음 도입되었으며, 전국 산야에 흩어져 있는 별노랑이 (*Lotus corniculatus* var. *japonicus* REGEL.)도 여기에 속하며, 환경적응성이 매우 큰 목초로서 내서성과 내한성이 아주 강하고, 비가 많은 다습한 지역에서도 잘 적응한다. 또한, 배수가 불량한 토양, 건조하고 메마른 땅 또는 산성에서 약알칼리성에 이르는 대부분의 토양에까지 적응하는 능력이 다른 어떤 클로버 종류보다 크다. 단점으로는 재생력이 낮아서 자주 베거나 낮게 베면 재생에 극히 불리하다.

지금까지 세계적으로 버즈풋 트레포일의 육종연구는 다른 목초나 사료작물에 비해 대단히 미미한 정도이며, 더욱이 외래의 유용유전자를 도입하여 형질전환을 시도한 연구는 Robbins 등 (1998)이 dihydroflavonol reductase의 역서열 (antisense sequences)을 도입해 본 것이 전부이다. 그 외 콩과식물의 재분화에 관한 연구로는 *Arachis*, *Glycine*, *Mellilotus*, *Vicia* (Phillips와 Collins, 1980), *Trifolium* (Campbell와 Tomas, 1984), *Cajanus* (Kumar 등, 1983), *Caronilla* (Mariotti와 Arcioni, 1983), *Phaseolus*, *Stylasanthus* (Meijer, 1982), *Lotus* (Keyes 등, 1980), 그리고 *Medicago* spp. (Saunders와 Bingham, 1972) 등에 대한 보고가 있다. 국내에서는 아직 버즈풋 트레포

일의 재분화나 형질전환에 관한 연구가 보고되어 있지 않으며, 단지 두과목초인 알팔파의 재분화조건에 대한 연구가 보고되어 있을 뿐이다 (Kim 등, 1999).

환경적응성이 뛰어난 버즈풋 트레포일에 유용유전자를 도입하기 위해서는 우선 캘러스 또는 조직으로부터 재분화체계가 확립되어야 한다. 그래서 본 연구에서는 버즈풋 트레포일의 캘러스 유도 및 재분화 조건을 확립하여 효율적으로 재분화가 가능하도록 하므로써, 유용유전자를 도입하여 새로운 품종으로 개발하기 위한 중요한 기초자료를 제공하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 종자소독

버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.) 종자로부터 캘러스 유도 조건 및 식물체 재분화 조건을 확립하기 위한 식물재료로서 Empire 품종을 공시하였다. Empire 품종의 종자를 70% 에탄올에서 1분, 0.1% SDS/HgCl₂ 용액에서 15분, 1% NaOCl 용액에서 5분간 소독한 다음, 멸균수로 2회 씻어내었다.

2. 캘러스 유도 및 증식

종자로부터 직접 캘러스를 유도함에 있어 가장 적합한 유도조건을 찾기 위하여, 기본배지로는 MS (Murashige와 Skoog, 1962), SH (Schenk와 Hildebrandt, 1972), N6 (Chu, 1978) 등 3종의 배지를 사용하였고, 이들 배지에 auxin으로는 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)를, cytokinin으로는 kinetin (6-furfurylaminopurine)을 각각 0~7 mg/l 농도로 첨가하여 사용하였다. 각 처리별 배지에 소독한 종자를 직접 치상하여 28℃에서 배양하면서 캘러스 유도조건을 배지별로, 호르몬 농도별로 조사하였다. 모든 배지에서 pH는 5.8, agar 농도는 0.8%로 조

절하였으며, 광조건과 암조건으로 구분했을 때의 캘러스 유도 조건도 조사하였다.

유도된 캘러스는 식물체로의 재분화에 이용하기 위하여, 본 실험에서 찾아낸 최적 조건의 유도배지에서 20일 간격으로 계대배양하면서 대량으로 증식하였다.

3. 캘러스로부터 식물체 재분화

버즈풋 트레포일 캘러스로부터 식물체를 재분화하기 위하여 크게 2가지의 조건으로 실험을 진행하였다.

첫째 조건은 NAA (5 mg/l)와 kinetin (2 mg/l)을 첨가한 SH 배지에서 28일간 광조건으로 배양하고, 2,4-D (11 mg/l)와 kinetin (1 mg/l)을 첨가한 SH 배지에서 3일간 배양한 다음, (NH₄)₂SO₄ (1.6 g/l)와 L-proline (5.75 g/l)을 첨가한 SH 배지 (Stuart와 Strikland, 1984)에서 21일간 배양하였다 (Kim 등, 1999).

둘째 조건은 단순히 BOi2Y 배지 (Bingham 등, 1975)에서 20일 간격으로 새로운 BOi2Y 배지로 옮겨주면서 지속적으로 배양하였다. SH와 BOi2Y 배지에는 첨가되는 호르몬 외에 배지 1 l에 sucrose 30 g을 첨가하였으며, 잎과 뿌리가 형성된 캘러스는 호르몬을 첨가하지 않은 각각의 배지에 옮겨 재분화를 완성하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 버즈풋 트레포일 종자로부터 캘러스 유도

2,4-D와 kinetin의 농도를 달리하여 버즈풋 종자로부터 직접 캘러스를 유도하였을 때, 가장 적합한 호르몬의 농도는 사용된 기본배지의 종류에 관계없이 kinetin은 첨가하지 않고 2,4-D를 1~5 mg/l로 첨가한 처리구에서 캘러스 형성이 양호하였으며, 2,4-D

를 3 mg/ℓ 첨가한 처리구에서 가장 우수하였다. 또한 2,4-D를 첨가하지 않은 처리구에서는 캘러스가 전혀 형성되지 않았고, kinetin의 농도가 높아질수록 캘러스 형성 정도와 뿌리 발육이 급격히 저하되었다.

Kinetin은 첨가하지 않고 2,4-D를 3 mg/ℓ 첨가하였을 때, SH 배지에 배양한 것이 MS나 N6 배지에 배양한 것보다 캘러스 형성량이 좀 더 많았다.

캘러스 유도 배지의 제조시 pH를 5.8로 조절한 이유는, Bingham 등 (1975), Schenck와 Hildebrandt (1972) 등의 보고에서 pH 5.8에서 캘러스의 생성량이 가장 좋은 것으로 보고한 바를 근거로 한 것이며, 고형배지의 agar 농도를 0.8로 한 것은, agar 농도가 높을수록 거대분자의 확산이 어려워지고, 또한 고농도의 agar 첨가에 의하여 배양조직으로부터 방출되는 전화효소가 불활성화되기 때문에, 이로 인하여 조직내의 glucose 이용도가 감소되어 생장이 저하된다는 보고 (George와 Sherrington, 1984)가 있기 때문에 고형배지의 형태를 유지할 수 있는 정도로 agar 농도를 조절하였다.

2. 캘러스로부터 식물체로의 재분화

재분화의 일반적 과정은 cytokinin의 처리에 의해 shoot 형성을 유도한 후, NAA, IBA (Indol-3-butyric acid) 혹은 IAA (Indol-3-acetic acid)와 같은 rooting 호르몬에 의해, 또는 호르몬을 제거한 조건에서 뿌리를 내리게 함으로써 완전한 식물체를 형성하게 하는 것이다 (Thorpe, 1981).

재분화유도를 위해 사용한 캘러스는 캘러스 형성 후 2~3회 계대배양하여 증식한 캘러스를 사용하였으며, 버즈풋 트레포일 캘러스로부터 식물체 재분화를 유도해 본 결과, 모든 처리를 광조건으로 해서 SH 배지에 NAA 5mg과 kinetin 2mg을 첨가한 배지에서 28~30일 배양하고, 2,4-D 11mg과 kinetin 1mg을 첨가한 배지에서 3~5일 배양 후, (NH₄)₂SO₄ 1.6g과 proline 5.75g을 첨가한 배지에서 21~25일 배양한 조건 1의 경우에는 뿌리만 유도되고 잎과 줄기는 형성되지 않아서, 전체 처리과정을 한 번 더 실시하였을 때 겨우 10% 미만으로 재분화되었으며, 재분화기간도 3개월 이상이 소요되었다. 반면에 조건 2의

Table 1. Effect of basic medium on callus growth of several varieties of birdsfoot trefoil

Plant	Degree of callus size from seed in three kinds of media		
	1~10 (1; small size, 10; large size)		
	SH	MS	N6
Birdsfoot trefoil	10	8	7

The size of callus formed from seed was measured after culture for 20 days and was indicated to a numeral such as 1~10 (1; small size, 10; large size). 3 mg/ℓ of 2,4-D was added in three kinds of media.

Table 2. Plant regeneration ratio and culture time of birdsfoot trefoil in different medium condition

Medium condition	Culture time (day)	Plant regeneration ratio of birdsfoot trefoil (%)
Condition 1	90	9
Condition 2	60	16

BOi2Y 배지에서 재분화를 유도한 경우에는 약 60일 만에 16% 정도가 재분화되어 조건 1에 비해 재분화 효율이 높고 재분화기간이 월등히 단축되었다.

화본과 목초인 오차드그라스 캘러스로부터 식물체를 재분화한 보고 (Kim 등, 1998)에서는 재분화배지로 NAA 1 mg/ℓ 와 kinetin 5 mg/ℓ 를 첨가한 N6 배지를 사용하였으며, 콩과 목초인 알팔파로 재분화를 유도한 연구 (Kim 등, 1999)에서는 본 연구의 조건 1과 동일한 조건의 배지를 사용하였는데, 본 실험에서는 버즈풋 트레포일이 두과목초이고 또한 버즈풋 트레포일의 재분화에 대한 보고가 없는 관계로 Kim 등 (1999)의 알팔파 재분화시 사용했던 배지와 외국에서 알팔파 재분화시 이용했던 BOi2Y 배지 (Bingham 등, 1975; Novak과 Konecna, 1982; Pereira와 Erickson, 1995; Shahin 등, 1986)를 사용해서 재분화를 유도하였다. Table 3에서는 버즈풋 트레포일의 캘러스유도 및 식물체 재분화에 사용된 배지, 첨가물의 량 및 시기별 소요되는 시간을 보여준다.

Fig. 1은 캘러스 증식부터 재분화까지의 과정을 사진으로 보여주는 것으로서, Fig. 1A는 종자를 유도한 캘러스를 유도배지 (SH 배지에 2,4-D를 3 mg/ℓ 첨가)에서 20일 간격으로 계대배양하며 캘러스를 증식하는 과정이고, Fig. 1B는 형성된 캘러스를 BOi2Y 배지에서 약 30일 배양하였을 때 캘러스가 녹색을 띄면서 배발생 단계로 들어가는 재분화 초기 단계이며, Fig. 1C는 BOi2Y 배지에서 약 60일 배양했을 때 배발생 단계를 거쳐 shoot와 root가 형성되는 단계이며, Fig. 1D는 뿌리와 잎이 모두 형성되어

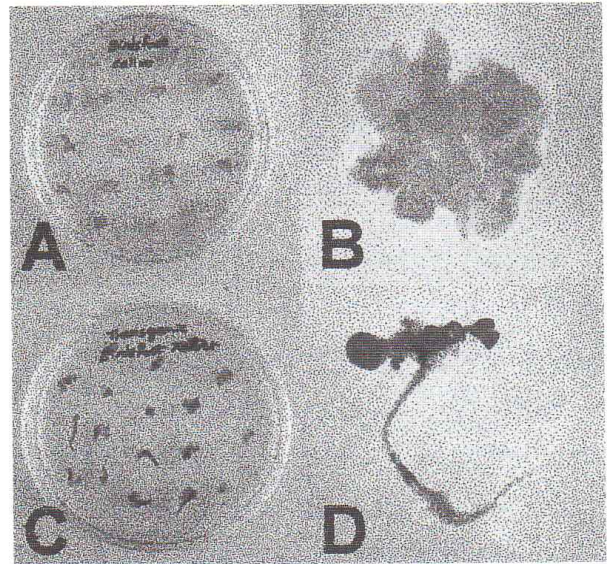


Fig. 1. Callus formation and plant regeneration of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L. cv. Empire). A, Callus formation and callus multiplication; B, Stage of embryo formation; C, Stage of shoot and root formation; D, Regenerated birdsfoot trefoil plant.

재분화가 완성되어 무균적으로 기내에서 뿌리를 활착시키는 단계이다.

본 실험에서 버즈풋 트레포일의 재분화조건을 확립함으로써, 외래의 유용유전자를 도입하여 형질전환 버즈풋 트레포일을 생산할 수 있는 기반이 마련되었다고 생각한다. 이후의 연구에서는 확보하고 있는 몇 종류의 유용유전자를 이용하여 버즈풋 트레포일의 형질전환을 시도할 계획이다.

Table 3. Suitable media condition and culture time in callus formation and plant regeneration of birdsfoot trefoil

Treatment	Basal medium	Addition (mg/ℓ)	Culture time (day)
Callus formation	SH	2,4-D (3mg)	20
Callus multiplication	SH	2,4-D (3mg)	40-60
Plant regeneration	BOi2Y	None	55-65

IV. 적 요

버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L. cv. Empire) 종자로부터 직접 캘러스를 유도하고, 형성된 캘러스로부터 식물체를 재분화하는 조건을 확립하였다. 캘러스 유도시 사용한 SH (Schenk and Hildebrandt), MS (Murashige and Skoog), N6 (Chu) 배지중에서 SH 배지가 캘러스 유도에 유리한 것으로 나타났으며, 캘러스 유도 및 증식시에는 2,4-D 3 mg/l 을 첨가한 조건이 가장 효율이 좋았다. 식물체 재분화 조건은 BOi2Y 배지에서 20일 간격으로 계대배양하며 재분화를 완성한 조건 2가 더 좋았으며, 캘러스로부터 완전한 식물체로 재분화되는데 필요한 시간은 약 60 일이었다.

V. 인용 문헌

- Bingham, E.T., L.V. Hurley, D.M. Katz and J.W. Saunders. 1975. Breeding alfalfa which regeneration from callus tissue in culture. *Crop Sci.* 15:719-721.
- Canpbell, C.T. and D.T. Tomas. 1984. Establishment and multiplication of red clover plants by in vitro shoot tip culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 3:49-57.
- Chu, C. 1978. The N6 medium and its applications to another culther of cereal crops. *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*, Science Press, Pecking pp. 43-50.
- George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. *Plant propagation by tissue culture*. Exegetics Ltd., England. pp. 150-153, pp. 172, pp. 236-239.
- Keyes, G. J., G.B. Collins and N. L. Taylor. 1980. Genetic variation in tissue culture of red clover. *Theor Appl. Genet.* 58:265-271.
- Kim, K.Y., Y.W. Rim, G.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.
- Kim, K.Y., J.S. Shin, Y.W. Rim, K.J. Choi, Y.S. Jang, W.H. Kim, B.H. Lee and J. Jo. 1999. Callus formation from alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed and plant regeneration from alfalfa calli. *J. Korean Grassl. Sci.* 19(1):23-30.
- Kumar, A.S., T.P. Reddy and G.M. Reddy. 1983. Plantlet regeneration from different callus cultures of pigeon pea. *Plant Sci. Lett.* 32:271-278.
- Mariotti, D. and S. Arcioni. 1983. Callus cultures of *Coronilla varia* L. plant regeneration through embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 2:103-110.
- Meijer, E.G.M. 1982. Shoot formation in tissue cultures of three cultivars of the tropical pasture legume *Stylosanthes guyanensis*. *Pflanzenzuchty* 89:169-172.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15:71-78.
- Novak, F.J. and D. Konecna. 1982. Somatic Embryogenesis in callus and cell suspension cultures of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 105:279-284.
- Pereira, L.F. and L. Erickson. 1995. Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment. *Plant Cell Reports* 14:290-293.
- Phillips, G.C. and G.B. Collins. 1980. Somatic embryogenesis from cell suspension cultures of red clover. *Crop Sci.* 20:323-326.
- Robbins, M.P., A.D. Bavage, C. Strudwicke and P. Morris. 1998. Genetic manipulation of condensed

- tannins in higher plants. II. Analysis of birdsfoot trefoil plants harboring antisense dihydroflavonol reductase constructs. *Plant Physiol.* 116(3):1133-1144.
16. Saunders, J.W. and E.T. Bingham. 1972. Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Sci.* 12:804-808.
17. Schenk, R.U. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199.
18. Shahin, E.A., A. Spielmann, K. Sukhapinda, R.B. Simpson and M. Yashar. 1986. Transformation of cultivated alfalfa using disarmed *Agrobacterium tumefaciens*. *Crop Sci.* 26:1235-1239.
19. Stuart, C.A. and S.G. Strikland. 1984. Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. *Plant Sci. Lett.* 34:165-174.
20. Thorpe, T.A. 1981. *Plant tissue culture*. Academic Press, Canada pp. 32-33.