

알팔파의 하배축으로부터 다량의 이차 체세포배 발생과 식물체 재분화

원성혜 · 이병현 · 김기용* · 이효신 · 이현정 · 조진기*

Multi-secondary Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Hypocotyl Cultures of Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

S. H. Won, B. H. Lee, K. Y. Kim*, H. S. Lee, H. J. Lee and J. Jo*

Abstract

Hypocotyl explants of *Medicago sativa* cv. Vernal were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with various combinations of growth regulators. After six weeks of culture, somatic embryos were formed from calli on MS medium containing 4 mg/ℓ 2,4-D and 0.1 mg/ℓ kinetin, or 4 mg/ℓ 2,4-D and 0.5 mg/ℓ kinetin. The mature somatic embryos were developed to plantlets when subcultured on MS basal medium. In order to obtain secondary somatic embryogenic calli, cotyledon of regenerated plantlets were cultured on a callus induction medium. Embryogenic calli were formed on MS medium containing 4 mg/ℓ 2,4-D alone. For induction and development of secondary somatic embryogenesis, the embryogenic calli were transferred to MS basal medium containing either 2,4-D or NAA. Multi-secondary somatic embryogenesis was the most effective on MS basal medium with 0.1 mg/ℓ 2,4-D. The rate of secondary somatic embryo formation of regenerated plants was 18 times higher than that of seed grown plants. The mature secondary somatic embryo were germinated into plantlets on MS basal medium after six weeks of culture.

(Key words : Alfalfa (*Medicago sativa* L.), Somatic embryogenesis, Plant regeneration, Hypocotyl)

I. 서 론

알팔파 (*Medicago sativa* L.)는 서남아시아가 원산

지이며 한발과 더위에 강할 뿐만 아니라 높은 질소 고정력과 다량의 필수 아미노산을 함유하고 있어서, 가축에 의한 기호성이 우수하기 때문에 전세계적으

경북대학교 농과대학(College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea)

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

로 널리 사용되고 있는 목초종의 하나이다. 알팔파의 재분화에 대한 연구는 Saunders와 Bingham 등 (1972)에 의해 실시되어 처음으로 캘러스로부터 재분화 식물체를 획득하였다. 지금까지 알팔파 재분화에 대한 연구의 대부분은 재분화에 이용되는 배지 및 식물생장조절제의 조건을 달리하여 재분화율을 높이거나, 품종간 재분화율의 차이 등의 연구가 주축을 이루었다(Brown과 Atanassov, 1985; Chen와 Thomson, 1987; Stuart와 Strikland, 1984). 최근에는 알팔파의 목초로서의 우수성 때문에 유용유전자를 알팔파에 도입하기 위한 형질전환이 많이 시도되고 있다. 그러나 알팔파의 낮은 재분화율로 인하여 Saranac으로부터 재분화된 Regen-S와 같은 재분화율이 높은 품종들이 선택적으로 사용되고 있으나, 가축에 의한 기호성이 좋지 않은 문제점이 제기되고 있어서 다양한 품종에 대한 높은 재분화능을 가진 품종의 확립이 필요하다(McKersie 등, 1993). 본 연구에 사용한 Vernal은 알팔파의 국내 7가지 장려품종 중 하나이며 하고현상이 없어서 우리나라에서 생육하기 좋은 품종이나, 이에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 기내배양에서 알팔파는 대부분의 품종이 체세포배 발생과정을 거쳐 분화하며, 일반적으로 고농도의 오옥신에서 배발생이 유도되고 오옥신을 제거 또는 저농도로 처리했을 때 배발생이 증가한다(Ammirato, 1983). 기내 체세포배 발생은 두 가지 경로를 통하여 이루어지는데 직접적인 유도(direct induction)와 이미 결정된 배발생의 잠재력 유도(permissive induction)로 구분할 수 있다 (Sharp 등, 1980; Vidakovic와 Jelaska, 1983; Kaul와 Kochhar, 1985). 직접적인 유도는 최적 배양조건에서 오옥신 등에 의하여 빠른 세포분열이 유도되고 세포분열과정 중 유전자의 선택적 발현에 의해 일어난다. 잠재력 유도는 조직내 배발생 능력을 지닌 세포를 가지고 있어서, 이들 세포들의 배발생 잠재력이 발현되어 일어난다 (Litz와 Gray, 1995). 체세포배 발생에 관

한 지금까지의 연구는 직접적인 체세포배 유도가 대부분이며, 잠재력 유도에 의한 체세포배 발생에 관한 보고는 드문 편이다. 본 연구에서는 알팔파의 하배축 (hypocotyl)으로부터 배발생 캘러스를 통한 체세포배 발생과, 이들 체세포배로부터 재분화된 기내 식물의 어린 자엽으로부터, 잠재력 유도에 의한 다량의 이차 체세포배 발생을 유도할 수 있는 실험결과를 얻었으므로 이에 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료

알팔파(*Medicago sativa* L.)의 재분화를 위한 재료로 Vernal 품종을 사용하였다. Vernal종자를 70% 에탄올에 5분, 1% NaOCl에서 10분, 3% H₂O₂ 용액에서 3분간 소독한 다음, 멸균수로 3회 세정하여 agar 농도 0.8%로 조정한 MS (Murashige와 Skoog, 1962) 기본배지에 파종하였다. 26°C, 16시간 광조건 하에서 7일간 배양한 식물체를 재분화를 위한 재료식물로 사용하였다.

2. 캘러스 유도 및 식물체 재분화

재분화를 위한 기본배지로는 MS 배지에 gellite를 0.2% 첨가한 후 pH 5.8로 조정하여 사용하였고, auxin으로는 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)를 cytokinin으로는 kinetin (6-furfuryl-aminopurine)을 각각 0~4 mg/l 농도로 첨가하였다. 식물체의 재분화는 7일령된 식물체의 하배축을 0.5cm의 길이로 잘라 각 처리당 30개의 절편을 치상하여 25°C, 16시간 광조건하에서 배양하였다. 형성된 체세포배는 MS 기본배지에 옮겨 재분화 식물체로 유도하였다.

3. 이차 체세포배 발생과 식물체 재분화

이차 체세포배 발생을 유도하기 위하여, 먼저 재분화된 기내식물의 자엽을 2,4-D 0~5 mg/l 를 포함한 MS 고체 배지에 치상하여 이차 캘러스를 유도하였다. 형성된 이차 캘러스는 체세포배의 유도 및 증식을 위하여, 2,4-D 혹은 NAA의 농도를 각각 0, 0.1, 1.0, 2.0 및 4.0 mg/l 으로 조절한 MS 배지로 옮겨, 배양 6주 후 체세포배 발생율을 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 캘러스 유도 및 식물체의 재분화

알팔파의 하배축으로부터 캘러스 및 식물체 재분화를 유도하기 위하여, 절편체를 MS 기본배지에 2,4-D와 kinetin을 0~4 mg/l 농도로 단용 및 혼용 처리한 MS 배지에 치상하였다(Table 1). 배양 2주 후 2,4-D를 포함하고 있는 대부분의 조합에서 캘러스가 유도되기 시작하였으며, 배양 4주 후 조직전체에 캘러스가 형성되었으나, kinetin 단독 처리구에서는 캘러스가 전혀 형성되지 않고 조직이 괴사되었다. 배양 8주 후 2,4-D 2와 kinetin 0.1 mg/l, 2,4-D 4와 kinetin 0.1 mg/l 그리고 2,4-D 4와 kinetin 0.5 mg/l 의 세 처리구에서 캘러스로부터 구형상의 체세포배가 형성

되기 시작하였다. 같은 2,4-D 농도에서도 kinetin이 전혀 첨가되지 않았거나 1 mg/l 이상의 고농도로 첨가되었을 때는 체세포배 발생 없이 callus만 유도되었다(Table 1). 캘러스 유도과정 중 첨가된 호르몬의 농도에 따라 캘러스의 형태적 차이를 관찰할 수 있었는데, 배 발생률이 높은 캘러스는 유백색을 나타내며 세포들이 매우 치밀하고 점성이 높았고 주로 2,4-D 2 mg/l 이상의 농도에서 나타났다. 그러나 고농도의 kinetin에서 유도된 캘러스는 처음에는 녹색을 나타내다가 배양시간이 경과할수록 갈변 속도가 빨랐고, 점성이 적어 쉽게 부서졌으며 배 발생율도 낮았다. 형성된 체세포배는 MS 기본배지로 옮겨갈 때, 정상적인 발달단계를 거쳐 shoot와 뿌리가 형성되면서 완전한 식물체로 분화하였다.

알팔파의 하배축으로부터 재분화에 대한 연구는 Bingham과 Saunder (1975)에 의해 보고되었는데, Saranac 등 알팔파 9품종에 대한 재분화율을 조사한 결과, Vernal은 6% 정도로 아주 낮았다. Nagarajan 등 (1986)은 *Medicago* 속의 뿌리와 하배축으로부터 재분화율을 조사한 결과, 고농도의 2,4-D와 저농도의 cytokinin 조합에서 *M. media* 품종들은 체세포배 발생율이 높았으나, *M. sativa* 품종들은 전혀 체세포배가 발생하지 않았는데, 이러한 차이는 체세포가 지

Table 1. Effect of 2,4-D and kinetin combinations on somatic embryogenesis in hypocotyl tissue culture of *M. sativa* cv. Vernal

Kinetin (mg/l)	2,4-D (mg/l)					
	0	0.1	0.5	1	2	4
0		R	R, C	C	C	C
0.1	R	C	C	C	SE	SE
0.5	R	C	C	C	C	SE
1	R	C	C	C	C	C
2	N	N	C	C	C	C
4	N	N	N	N	N	N

R ; Rooting. SE ; Somatic embryo. N ; Necrosis. C ; Callus.

닌 유전적 요인과 밀접한 관련이 있다고 보고하였다. 이러한 알팔파의 낮은 체세포배 형성능의 유전적 요인을 개선하고자, 재분화된 식물체의 자엽으로부터 이차 체세포배를 유도하였다.

2. 이차 체세포배 발생과 식물체 재분화

이차 체세포배 발생을 유도하기 위하여, 먼저 일차로 재분화된 식물체의 자엽으로부터 캘러스를 유도하였다. 이차 캘러스 유도는 일차 재분화된 기내 식물의 자엽을 2,4-D 0~5 mg/l 와 0.2% gellite를 포함한 MS 배지에 치상하여 26°C, 16시간의 광조건에서 실시하였다. 배양 4주 후 2,4-D 2 mg/l 이상의 농도에서 캘러스가 형성되기 시작하였으며, 배양 6주 후에는 조직 전체가 캘러스화 하였다. 대부분의 캘러스가 유백색의 점성이 높은 캘러스의 형태를 가졌고, 일차 캘러스 유도때 볼 수 있었던 녹색의 점성이 낮은 캘러스는 거의 형성되지 않았다. 계대배양 없이 배양기일이 경과함에 따라 유도된 캘러스 표면에 녹색의 반점을 띄는 배발생 원기가 나타나기 시작하였는데, 육안으로 그 형태적 차이의 구분이 가능하였다. 배지에 첨가되는 2,4-D 농도에 따른 배발생 캘러스의 발생율을 조사한 결과 Table 2와 같았다. 배발생 캘러스의 발생률은 2,4-D 농도에 따라 차이를 보여 2,4-D 농도가 적을수록 배발생 캘러스의 발생률이 낮았고 2,4-D 4 mg/l 처리구에서는 모든 캘러스에서 100%로 가장 높았으며, 2,4-D 4 mg/l 이상에서는 오히려 감소하였다(Table 2). 이차 체세포배 분화는 배분화가 직접 일어나지는 않고, 반드시 캘러스화를 거친 후 배분화가 일어났다. 이와 같이 체세포배 분화를 위해 고농도의 2,4-D가 요구되는 것은 오옥신 특히, 2,4-D가 체세포배 발생에 있어서 조직을 탈분화시키고 탈분화된 미분화세포에 배발생을 자극하는 일반적인 기능으로 이해되었다. 배발생 캘러스로부터 이차 체세포배의 유도시 2,4-D와

NAA의 영향을 조사하였다(Table 3). 배발생 캘러스의 효율이 가장 좋았던 2,4-D 4 mg/l 의 조건에서 배

Table 2. Effect of 2,4-D on the induction of embryogenic callus from cotyledon explants of primary embryos-derived *M. sativa* cv. Vernal after six weeks of culture

Conc. of 2,4-D (mg/l)	Frequencies of embryogenic calli ^{a)}
0.0	-
0.1	-
1.0	+
2.0	++
4.0	+++
5.0	+

^{a)} -, none ; +, poor (5~30%) ; ++, moderate (31~70%) ; +++, high (71~100%).

Table 3. Effect of plant growth regulators on the induction of secondary somatic embryos from embryogenic calli of *M. sativa* cv. Vernal after six weeks of culture

Plant growth regulator (mg/l)		Frequencies of somatic embryo ^{a)}
2,4-D	NAA	
0.0		+++
0.1		+++
1.0		++
2.0		+
4.0		+
	0.1	+++
	1.0	++
	2.0	+
	4.0	-

^{a)} -, none ; +, poor (5~30%) ; ++, moderate (31~70%) ; +++, high (71~100%).

양한 캘러스를 이차 체세포배의 유도 및 증식을 위하여 MS 기본배지에 2,4-D와 NAA를 0~4 mg/l의 농도로 첨가한 배지에 옮겼다. 배양 6주 후 배발생 캘러스로부터 이차 체세포배가 유도되기 시작하였으며, 배발생율을 조사한 결과 NAA 4.0 mg/l을 제외한 모든 처리구에서 배발생을 보였다. 오옥신의 농도가 증가할수록 배발생율이 낮았고 NAA 보다는 2,4-D 처리구에서 더 높은 배발생율을 보였으며, 2,4-D 0.1 mg/l을 처리하였을 때 모든 치상 캘러스로부터 이차 체세포배가 유도되어 가장 높은 배발생율을 보였다(Table 3). 한편 2,4-D 4 mg/l의 처리구에서는 체세포배가 형성되기는 하였으나 지속적인 배양시 형성된 체세포배가 더 이상 증식을 하지 못하고 다시 캘러스로 되는 경향을 나타내었다.

일반적으로 체세포배 발생에는 캘러스 형성을 거쳐서 일어나는 경우와 식물조직에서 직접적으로 일어나는 경우가 있으며 (Williams와 Maheswaran, 1986), 캘러스 형성을 유도시킨 후 이로부터 체세포배를 발생시키는 경우는 2,4-D와 같은 오옥신을 제거하여야만 체세포배가 형성된다(Ammirato, 1983). 알팔파 품종은 캘러스 형성을 통한 배분화가 대부분

이며, 품종간 차이가 있기는 하나 배분화를 위하여 고농도의 2,4-D를 요구하는 것으로 알려져 있다 (Saunders와 Bingham, 1972; Nagarajan 등, 1986). 본 실험에서도 알팔파의 캘러스 유도시 고농도의 2,4-D를 요구하였으며, 이 때 처리된 고농도의 2,4-D가 세포내 배분화능을 자극하고, 다시 저농도로 처리했을 때 체세포배가 형성되는 현상을 볼 수 있었다. 한편 일차 체세포배 형성에는 저농도의 kinetin이 요구되었으나, 이차 체세포배 발생에서는 kinetin을 전혀 요구하지 않았으며 이는 Nolan 등 (1989)의 결과와 일치하였다. 또한 체세포배 발생시 잦은 계대배양 보다는 지속적인 배양이 더 효율적이었는데, 그 이유는 체세포배를 단기간 계대배양하면 거듭된 2,4-D 첨가로 인하여 배발생 능력이 감소되기 때문인 것으로 생각되었다 (Kochba와 Button, 1974).

일차 및 이차 체세포배 발생율을 비교해 보면, 종자로부터 자란 식물의 캘러스로부터 일차 체세포배의 평균 발생율은 5.1%이고, 일차 체세포배로부터 재분화된 식물체 자엽의 캘러스로부터 발아된 이차 체세포배에서의 평균 배발생율은 92%로 18배 증가하였다(Table 4). Nolan 등 (1989)은 *Medicago trun-*

Table 4. Comparison of embryo production from explants of seed grown and regenerated plants

Plant	No. of calli	No. of embryo	No. of calli producing embryo	% of calli producing embryo	Mean no. embryo / callus
S1 ^{a)}	30	5	2	6.6	0.16 ± 0.08 ^{c)}
S2	28	1	1	3.6	0.04 ± 0.06
S3	32	0	0	0	0
R1 ^{b)}	17	135	17	100	7.9 ± 1.8
R2	15	212	15	100	14.1 ± 4.3
R3	13	70	10	77	7.0 ± 2.4

^{a)} S1-S3 ; Three different seed grown plants.

^{b)} R1 ~ R3 ; Three different regenerated plants derived from a single primary embryo.

^{c)} Standard error of the mean.

*catula*의 재분화된 식물체의 종자로부터 이차 체세포배 분화 증가에 대한 보고를 하였는데, 재분화된 식물체의 캘러스에서 유도된 배분화율이 일차 캘러스보다 9배 증가 하였다고 보고하였다. 이와 같이 이차 체세포배에서 높은 재분화율을 나타내는 것은 일차 재분화된 식물이 가진 유전적인 높은 배발생 능력때문인 것으로 생각되며, 지속적인 배양시 다량의 체세포배 증식이 가능한 것으로 추측된다(Litz와

Gray, 1995). 이차 체세포배의 발생 경로도 일차 체세포에서와 같이 구형배, 심장형 및 어뢰형 배로 발달하였으며, 자연시기의 체세포배는 성장조절물질이 첨가되지 않은 MS 기본배지에서 배향하였을 때 뿌리가 유도되었고 정상적인 식물체로 발달하였다 (Fig. 1).

알팔파로의 유용 유전자 도입을 위해서는 조직 또는 캘러스로부터의 재분화는 필수적인 단계이다. 본

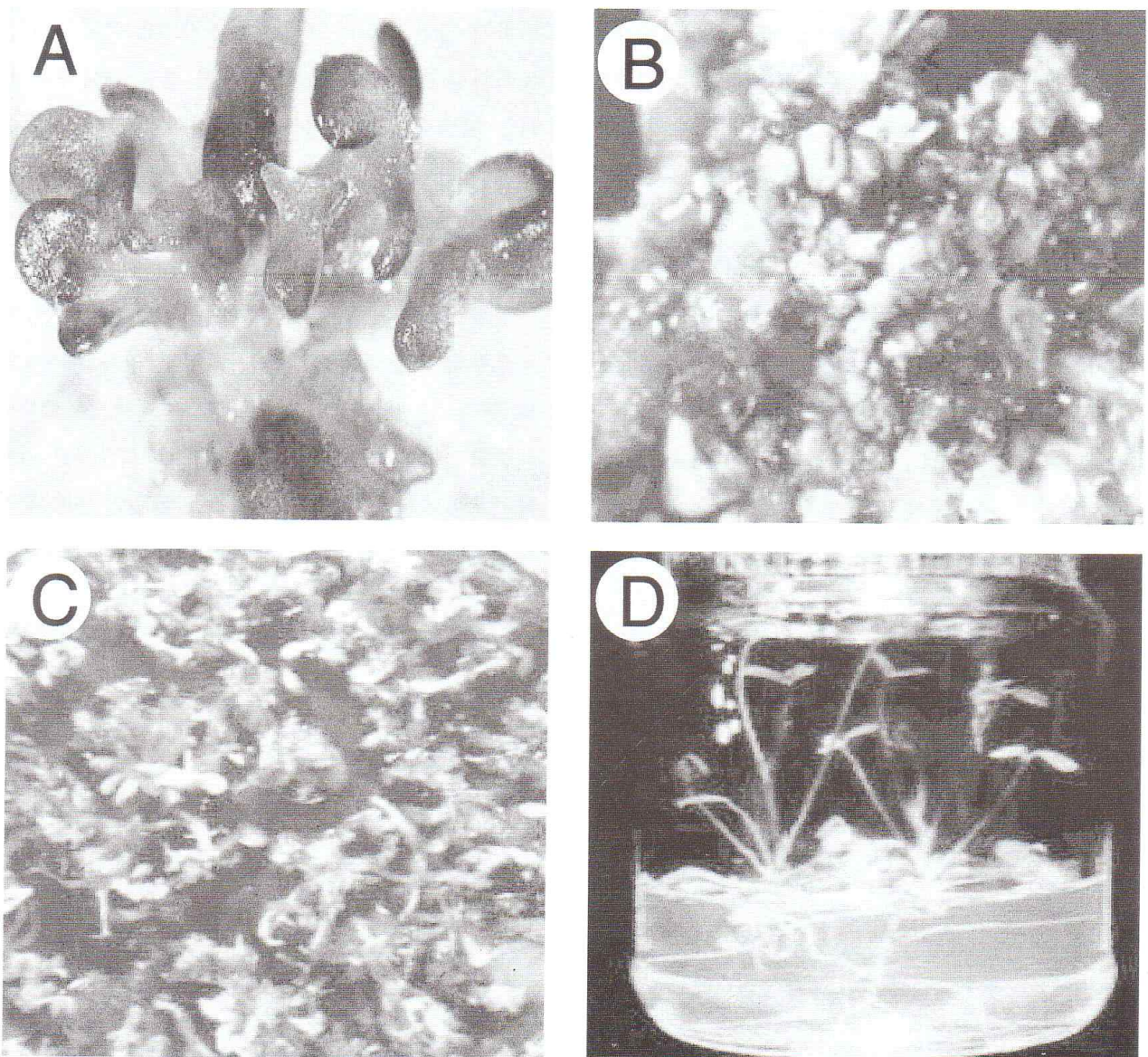


Fig. 1. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon explants of primary embryo-derived *Medicago sativa* plants. A, secondary somatic embryos after six weeks of culture ; B, Multi-somatic embryos on MS medium with 0.1 mg/l 2,4-D ; C, Somatic embryo-derived plantlets in MS medium ; D, Regenerants with leaves and roots.

실험은 지금까지 재분화율이 극히 낮은 것으로 보고 되었던 알팔파로부터 이차 체세포배 형성율을 향상 시켜, 높은 재분화율을 얻어 알팔파의 효율적인 재분화 체계를 확립하였다. 따라서 본 실험의 결과는 형질전환기법을 통한 유용 유전자의 알팔파로의 도입에 있어서 필수적인 단계인, 형질전환 식물체의 재분화에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

IV. 적 요

알팔파의 하배축(hypocotyl)으로부터 캘러스 유도 및 식물체 재분화를 위하여 2,4-D와 kinetin이 조합 처리된 MS 배지에 조직을 치상하였을 때 4주 후 캘러스가 유도되었으며, 2,4-D 4 mg/l 와 kinetin 0.1 mg/l 그리고 2,4-D 4 mg/l 와 kinetin 0.5 mg/l 조합에서 체세포배가 형성되었다. 성숙한 체세포배를 MS 기본배지로 계대배양하였을 때 정상적인 식물체로 재분화 하였다. 이차 체세포배 발생을 위하여 재분화된 기내식물의 자엽으로부터 이차 캘러스를 유도하였다. 2,4-D의 농도에 따라 배발생 캘러스의 형성률에 차이를 보였으며, 2,4-D 4 mg/l 의 MS 배지에서 배양하였을 때 배발생 캘러스의 유도가 가장 좋았다. 배발생 캘러스로부터 이차 체세포배의 발생률을 2,4-D 0.1 mg/l 첨가한 MS 배지에서 가장 좋았으며, 캘러스당 배 발생률이 일차 캘러스 보다 평균 18배 증가하여, 이차 체세포배 배양에 의한 재분화 식물체의 대량증식이 가능하였다. 성숙한 이차 체세포배는 MS 기본배지에 계대배양 하였을 때 뿌리가 유도되었으며 정상적인 식물체로 발달하였다.

V. 인용 문헌

1. Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis. In *DA* Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (eds). Handbook of Plant cell Culture, Vol 1, Collier MacMillan, London, pp. 82-123.
2. Bingham, E.T. and J.W. Saunders. 1975. Breeding alfalfa which regeneration from callus tissue in culture. *Crop Sci.* 15:712-719.
3. 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.
4. 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.
5. Kaul, K. and T.S. Kochhar. 1985. Growth and differentiation of callus cultures of pinus. *Plant Cell Reports* 4:180-183.
6. Kochba, J. and J. Button. 1974. The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the "Shamouti" orange (*Citrus sinensis*). *Z. Pflanzenzuecht* 69:156-162.
7. Litz, R.E. and D.J. Gray. 1995. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. *World Microbio Biotechnol* 11:416-425.
8. Mckersie, B.D., M. Y. de Beus, S.R. Bowley, C. Bowler, D. Inze, K. D'Halluin and J. Botterman. 1993. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) *Plant physiol.* 103:1155-1163.
9. Murashige, Y. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15:71-78.
10. Nagarajan, P., J.S. McKenzie and P.D. Walton. 1986. Embryogenesis and plant regeneration of *Medicago* spp. in tissue culture. *Plant Cell Reports*

- 5:77-80.
11. Nolan, K.E., R.J. Rose and J.R. Gorst. 1989. Regeneration of *Medicago truncatula* from tissue culture: increased somatic embryogenesis using explants from regenerated plants. *Plant Cell Reports*. 8:278-281.
 12. Saunders, J.W. and E.T. Bingham. 1972. Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Sci*. 12:804-808.
 13. Sharp, W.R., M.R. Sondahl, L.S. Caldas and S.B. Maraffa. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Hort Rev* 2:268-310
 14. Stuart, C.A. and S.G. Strikland. 1984. Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. *Plant Sci. Lett.* 34:165-174.
 15. Vidacovic, M. and S. Jelaska. 1983. Preservation of gene pool of forest tree species. *Genetica* 15:369-375.
 16. Williams, E.G. and G. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behavior of cell as an embryogenesis group. *Anal. of Botany* 57:443-462.