

## IBA 처리에 의한 알팔파 줄기 절단면에서 뿌리 분화

손대영 · 김기용\* · 장요순\* · 이효신\*\* · 원성혜\*\* · 이병현 · 김미혜\*\* · 조진기\*\*

## Root Initiation in Cut Alfalfa Stems by Treatment of IBA

D. Son, K. Y. Kim\*, Y. S. Jang\*, H. Lee\*\*, S. H. Won\*\*, B. H. Lee\*\*, M. H. Kim\*\*  
and J. Jo\*\*

### Abstract

When root initiation ratio of cut alfalfa (*Medicago sativa* L.) stems was examined in several medium conditions containing different IBA concentration, Highest root initiation ratio was confirmed at 1.0~1.5 mg/ℓ of IBA and the ratio was 70~75%. When the stems from regenerated shoots from callus were treated at 8 kinds of medium for 10 days, the root iniation result was 10 (50%) at 1/2 SH-0 medium, 10 (50%) at SH-0 medium, 12 (60%) at SH-0.5IBA medium, 15 (75%) at SH-1.0IBA medium, 15 (75%) at SH-1.5IBA medium, 10 (50%) at SH-2.0IBA medium, 9 (45%) at SH-2.5IBA medium and 8 (40%) at SH-3.0IBA medium.

(Key words : Alfalfa, Root initiation, Plant regeneration)

### I. 서 론

알팔파 (*Medicago sativa* L.)는 이란을 중심으로 한 서남아시아의 산악지역이 원산지로서, 한발과 더 위에 매우 강하며, 가축에 의한 기호성이 좋을 뿐만 아니라, 높은 질소고정력과 다량의 필수 아미노산을 함유한 단백질 함량이 타 목초에 비하여 높다 (Smith, 1981). 하지만 대부분의 다른 목초들과 마찬가지로, 현재 한국에서 재배·이용되는 알팔파 품종은 모두 외국으로부터 도입된 것으로서 한국의 기후풍토에 적합하지 못한 것이 사실이다.

지금까지 알팔파의 육종연구는 다른 목초나 사료작물에 비해 대단히 미미한 정도이며, 외래의

유용유전자를 도입하여 형질전환을 시도한 연구는 다소 있는 편이나, 대부분이 직접 응용을 위한 연구가 아니라, 모델 식물체로서 형질전환을 시도한 정도이다. 이러한 응용이 가능하게 되기 위해서는 목적으로 하는 식물체의 조직배양을 통한 재분화 체계 확립이 절대적으로 요구되는데, *Arachis*, *Glycine*, *Mellilotus*, *Vicia* (Phillips와 Collins, 1980), *Trifolium* (Canpbell와 Tomas, 1984), *Cajanus* (Kumar 등, 1983), *Caronilla* (Mariotti와 Arcioni, 1983), *Phaseolus*, *Stylasanthos* (Meijer, 1982), *Lotus* (Keyes 등, 1980), 그리고 *Medicago* spp. (Saunders와 Bingham, 1972) 등 콩과목초에 대한 여러 보고가 있다. 국내에서도 알팔파 재분화에 관한 몇몇 연

경상대학교 대학원 응용생명과학부(Graduate School of Applied Life Sciences, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea)

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

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

구가 보고되어 있지만 (Kim 등, 1999; Won 등, 1999), 목초의 형질전환 연구에는 재분화율을 획기적으로 높이는 것이 대단히 중요하다.

본 연구에서는 알팔파 줄기를 절단하여, IBA를 첨가한 배지에서 줄기 절단면으로부터 직접 뿌리를 유도하는 연구를 수행하였다. 이는 알팔파 재분화 실험에서 재분화 초기의 가근을 절단하고 곧바로 shoot로부터 뿌리를 유도할 수 있게 하는 유용한 자료가 될 것이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 식물재료 및 종자소독

알팔파 (*Medicago sativa* L.) 품종 중 Anchor 품종을 공시하였다. Anchor 품종의 종자를 70% 에탄올에서 1분, 0.1% SDS/HgCl<sub>2</sub> 용액에서 15분, 1% NaOCl 용액에서 5분간 소독한 다음, 멸균수로 2회 씻어내어 살균처리 하였다. 살균한 종자를 SH 배지(Schenk와 Hildebrandt, 1972)를 넣은 배양병에 10립씩 파종하여, 28℃에서 배양하므로써 무균상태의 식물체를 얻었다.

캘러스로부터 얻은 shoot에서도 뿌리 유도 정도를 조사하기 위해, Kim 등 (1999)이 알팔파의 재분화에 사용한 SH-nk, SH-11b, SH-sp 배지 등을 이용하여 shoot를 유도하였다. Shoot 유도시 캘러스 형성후 2~3회 계대배양하여 증식한 캘러스를 사용하였으며, 유도된 shoot가 붙어 있는 캘러스를 그대로 2개월 이상 키워 뿌리 유도를 위한 식물재료로 이용하였다.

### 2. 뿌리 유도를 위한 배지조건

알팔파의 줄기로부터 직접 뿌리를 유도하기 위한 배지로는 Table 1에서 보여주는 바와 같이 SH salt의 양을 절반으로 줄인 배지, SH 기본배지, SH 배지에 IBA를 0.5 mg/l 농도부터 3.0 mg/l 농도까지 조절해 준 배지를 제조하여 사용하였다. Phyto-agar의 농도를 모두 0.8%로 조절하였으며, 하나의 배지조건에 대해 절단한 줄기를 20개씩 꽂아 뿌리가 유도되는 정도를 조사하였다. 이 때 빛 조건은 16시간의 광조건과 8시간의 암조건으로 처리하였다. 알팔파의 줄기를 절단 시에는 잎이 최소

3개 이상씩 포함되도록 절단하였으며, 줄기 끝 부분의 너무 어린 줄기는 사용하지 않았다.

Table 1. The medium conditions for root initiation in cutted alfalfa stems

Medium	Added IBA (mg/ l )
1/2 SH-0	0
SH-0	0
SH-0.5IBA	0.5
SH-1.0IBA	1.0
SH-1.5IBA	1.5
SH-2.0IBA	2.0
SH-2.5IBA	2.5
SH-3.0IBA	3.0

## III. 결과 및 고찰

알팔파 (*Medicago sativa* L.) 품종 중 Anchor 품종의 종자를 살균처리한 다음, 살균한 종자를 SH 배지(Schenk와 Hildebrandt, 1972)를 넣은 배양병에 10립씩 파종하여, 28℃에서 배양하므로써 무균상태의 식물체를 얻었다. 식물체는 배양병에서 본엽이 8개 이상씩 되도록 자랐을 때, 줄기부분을 절단하여 실험에 이용하였다. 또한 캘러스에서 shoot를 유도한 것 중에서도 줄기부분을 취하여 함께 처리하였다. 캘러스로부터 얻은 shoot는 Kim 등 (1999)이 알팔파의 재분화에 사용한 SH-nk, SH-11b, SH-sp 배지 등을 이용하여 얻을 수 있었다.

뿌리를 유도하기 위한 줄기부분은 종자로부터 얻은 것이나 캘러스로부터 유도한 것 모두 한 처리당 20개씩 준비하여 처리하였다. 각 처리별로 뿌리가 유도되는 정도는 표 2와 같다. 알팔파의 줄기를 잎이 최소 3개 이상씩 포함되도록 절단하여, 16시간의 광조건과 8시간의 암조건으로 처리하였을 때, 4일 이후부터 뿌리가 유도되기 시작하여, 10일이 경과했을 때는 배양병 바닥에 퍼지는 형태로 많이 유도되었다. 표 2는 처리 10일째에 뿌리가 유도되는 정도를 조사한 결과이다.

처리 5일째에 3개의 처리구에서 처음으로 뿌리 유도를 확인하였는데, 1/2 SH-0, SH-1.0IBA, SH-1.5IBA 배지조건에서 약간의 뿌리 유도를 확인할

Table 2. Root initiation of cutted alfalfa stems in several medium conditions

Medium	Root initiation (%) <sup>a</sup>	Root initiation (%) <sup>b</sup>
1/2 SH-0	50	50
SH-0	45	50
SH-0.5IBA	60	60
SH-1.0IBA	70	75
SH-1.5IBA	75	75
SH-2.0IBA	50	50
SH-2.5IBA	30	45
SH-3.0IBA	45	40

a) Grown stems from seeds.

b) Regenerated stems from callus.

수 있었다. 종자를 파종하여 얻은 줄기의 경우에는, 처리 10일째에 1/2 SH-0 배지에서 10개 (50%), SH-0 배지에서 9개 (45%), SH-0.5IBA 배지에서 12개 (60%), SH-1.0IBA 배지에서 14개 (70%), SH-1.5IBA 배지에서 15개 (75%), SH-2.0IBA 배지에서 10개 (50%), SH-2.5IBA 배지에서 6개 (30%), SH-3.0IBA 배지에서 9개 (45%)의 뿌리유도가 확인되어, SH 배지에 1.5 mg/l의 IBA를 첨가한 처리구에서 뿌리유도 정도가 75%로서 가장 좋았다.

한편, 캘러스로부터 shoot를 유도한 다음 줄기를 취하여 처리한 경우에는, 처리 10일째에 1/2 SH-0 배지에서 10개 (50%), SH-0 배지에서 10 (50%), SH-0.5IBA 배지에서 12개 (60%), SH-1.0IBA 배지에서 15개 (75%), SH-1.5IBA 배지에서 15개 (75%), SH-2.0IBA 배지에서 10개 (50%), SH-2.5IBA 배지에서 9개 (45%), SH-3.0IBA 배지에서 8개 (40%)의 뿌리 유도가 확인되어, SH 배지에 1.0 mg/l의 IBA를 첨가한 처리구와 1.5 mg/l의 IBA를 첨가한 처리구에서 뿌리 유도 정도가 75%로서 가장 좋았다.

종자로부터 얻은 줄기나 캘러스로부터 유도한 줄기 모두에서 뿌리 유도 정도는 비슷하게 나타났으며, 전체 처리구별로도 뿌리 유도의 정도는 35~75%로서 대단히 큰 차이는 나타나지 않았지만, IBA의 첨가량이 1.0~1.5 mg/l의 농도로 첨가한 처리구에서 뿌리유도 정도가 가장 좋았으며, IBA

첨가농도가 2.0 mg/l 이상일 경우에는 뿌리 유도 정도가 낮은 것으로 나타났다. 따라서 알팔파를 재분화하거나, 줄기로부터 뿌리를 유도할 경우에는 IBA를 첨가해 주는 것이 뿌리 유도 효율을 높일 수 있는 것으로 판단되며, 1.0~1.5 mg/l의 IBA를 첨가해 줄 때 뿌리 유도 효율이 가장 좋을 것으로 예상된다.



Fig. 1. Root initiation of cutted alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Anchor) stems.

Fig. 1은 1.5 mg/l의 IBA를 첨가한 SH-1.5IBA 배지에서 뿌리를 유도 후 배양병에서 키우고 있는 사진이다. 본 실험에서 알팔파의 뿌리 유도 정도를 개선함으로써, 외래의 유용유전자를 도입하여 형질전환 알팔파를 생산할 경우, 식물체 재분화 효율을 월등히 높일 수 있을 것으로 확신한다.

#### IV. 적 요

알팔파 (*Medicago sativa* L.)의 줄기부분을 절단하여, SH 배지에 IBA를 첨가한 농도별로 뿌리 유도 정도를 조사한 결과, IBA 농도를 1.0~1.5 mg/l로 첨가한 처리구에서 뿌리 유도 정도가 70~75%로서 가장 좋았다. 캘러스로부터 shoot를 유도한 다음 줄기를 취하여 처리한 경우에는, 처리 10일째에 1/2 SH-0 배지에서 10개 (50%), SH-0 배지에서 10 (50%), SH-0.5IBA 배지에서 12개 (60%), SH-1.0IBA 배지에서 15개 (75%), SH-1.5IBA 배지에서 15개 (75%), SH-2.0IBA 배지에서 10개 (50%),

SH-2.5IBA 배지에서 9개 (45%), SH-3.0IBA 배지에서 8개 (40%)의 뿌리 유도를 나타내었다.

## V. 인 용 문 헌

1. 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.
2. 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.
3. Kim, K.Y., Y.W. Rim, K.J. Choi, Y.S. Jang, W.H. Kim, S. Seo, 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.
4. 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.
5. Mariotti, D. and S. Arcioni. 1983. Callus cultures of *Coronilla varia* L. plant regeneration through embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 2:103-110.
6. Meijer, E.G.M. 1982. Shoot formation in tissue cultures of three cultivars of the tropical pasture legume *Stylosanthes guyanensis*. *Pflanzenzucht* 89:169-172.
7. Phillips, G.C. and G.B. Collins. 1980. Somatic embryogenesis from cell suspension cultures of red clover. *Crop Sci.* 20:323-326.
8. Saunders, J.W. and E.T. Bingham. 1972. Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Sci.* 12:804-808.
9. 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.
10. Smith, D. 1981. Forage management in the north. 4th ed., Kendal/Hunt Publishing Company pp. 71-91.
11. Won, S.H., B.H. Lee, K.Y. Kim, H. Lee, H.J. Lee and J. Jo. 1999. Multi-secondary somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl cultures of *Medicago sativa* L. *J. Korean Grassl. Sci.* 19(3):273-280.