

알팔파 재분화에서 배지조성에 따른 뿌리 유도율 조사

김기용 · 강경민 · 박근제 · 배은경* · 이인애* · 이병현** · 곽상수*** · 조진기*

Examination of Root Induction Ratio for Regeneration of Alfalfa by Medium Component

Ki-Yong Kim, Kyung-Min Kang, Geun Je Park, Eun-Kyung Bae*, In-Ae Lee*,
Byung-Hyun Lee**, Sang-Soo Kwak*** and Jinki Jo*

ABSTRACT

The alfalfa (*Medicago sativa* L.) callus was induced from seeds on SH medium contained 3 mg/ℓ of 2,4-D. Several regenerated alfalfa plants and many shoots were obtained by procedure of Kim et al. (1999); 1) incubation for 28~30 days on SH medium added 5 mg/ℓ of NAA and 2 mg/ℓ of kinetin, 2) incubation for 3~5 days on SH medium added 11 mg/ℓ of 2,4-D and 1 mg/ℓ of kinetin, 3) incubation for 21~25 days on SH medium added 1.6 g/ℓ of ammonium sulfate and 5.75 g/ℓ of proline. To increase of root induction ratio on plant regeneration process of alfalfa, root induction ratio was examined on 8 kinds of medium, containing different amount of hormone and SH salt. Root induction ratio was higher on SH medium contained IBA than SH basal medium. In case 1.5 mg of IBA was added in SH medium, root induction ratio was the highest to 56.0% in this study. On the other hand, root induction ratio was higher on SH medium diminished SH salt amount to half volume and addition of IBA makes high root induction ratio, too. Thus, we conclude that the medium for root induction of alfalfa may be added 1.5 mg/ℓ of IBA and diminished SH salt amount to half volume.

(Key words : Alfalfa, Plant regeneration, Root induction, IBA (Indol-3-butyric acid))

I. 서 론

국내에서 알팔파(*Medicago sativa* L.)의 조직 배양 및 형질전환 관련 연구는 90년대 후반부터 시작되어 지금까지 여러 논문들이 발표되어

있으며(Kim 등, 1999; Won 등, 1999; Lee 등, 2000; Son 등, 2001; Kim 등, 2001), 국외에서는 1970년대에 연구가 시작되어 지금까지 다양한 연구결과가 발표되고 있다(Saunders 및 Bingham, 1972; Sharp 등, 1980; Ammirato, 1983;

“이 논문은 바이오그린21사업 연구비 지원에 의하여 수행된 결과임.”

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

* 경북대학교 농업생명과학대학 (College of Life Sci. & Agriculture, Kyungpook Natl. Uni., Daegu 702-701, Korea).

** 경상대학교 축산과학부 (Division of Animal Husbandary, Gyeongsang Natl. Uni., Jinju 660-701, Korea).

*** 한국생명공학연구원 (Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology (KRIBB), Taejon 305-333, Korea).

Corresponding author: Ph.D. Ki-Yong Kim, Tel: +82-31-290-1674, Fax: +82-31-290-1775, E-mail: kimky77@rda.go.kr

Vidakovic 및 Jelaska, 1983; Stuart 및 Strikland, 1984; Brown 및 Atanassov, 1985; Kaul 및 Kochhar, 1985; Chen 및 Thomson, 1987; Litz 및 Gray, 1995). 지금까지 알팔파 재분화에 대한 연구의 대부분은 재분화에 이용되는 배지 및 식물생장조절제의 조건을 달리하여 재분화율을 높이거나 품종간 재분화율의 차이를 조사하는 연구가 주축을 이루었다(Stuart와 Strikland, 1984; Brown과 Atanassov, 1985; Chen와 Thomson, 1987; Kim 등, 1999).

한편 재분화 과정에서 얻은 shoot와 일반 식물체의 shoot를 각각 절단하여 직접 뿌리를 유도한 Son 등 (2001)의 연구보고에 의하면, SH 배지에 다양한 농도의 IBA를 처리하여 뿌리 유도율을 조사한 결과, IBA 농도를 1.0~1.5 mg/l로 첨가한 처리구에서 뿌리유도 정도가 70~75%로서 가장 좋았다. 하지만 이 보고에서 SH 기본배지를 사용한 경우와 SH salt 양을 1/2로 줄인 배지를 사용했을 경우를 비교해 보면, 뿌리 유도율이 같거나 비슷한 수준이었다. 본 연구에서는 알팔파 재분화 과정에서 뿌리 유도 조건을 좀 더 확실히 밝힐 목적으로, Son 등 (2001)이 보고한 처리조건에서 뿌리 유도율이 가장 높았던 처리를 기준으로, 호르몬 농도가 낮은 처리 1개와 호르몬 농도가 높은 처리 2개를 제외하고, SH salt 양을 1/2로 줄이고 호르몬을 농도별로 달리한 처리를 추가하여 실험을 진행하였다. 뿌리 유도를 위한 재료는 캘러스로부터 완전히 재분화되지 않은 초기 shoot와 완전히 재분화된 shoot를 동일한 비율로 처리하여 뿌리 유도율을 계산하였다.

II. 재료 및 방법

1. 종자소독 및 캘러스 유도

본 연구에서는 알팔파 품종 중 "Vernal"을

시험재료로 공시하였으며, 종자를 70% 에탄올에서 1분, 0.1% SDS/HgCl₂ 용액에서 15분, 1% NaOCl 용액에서 5분간 소독한 다음, 멸균수로 2회 씻어내어 살균처리 하였다.

종자로부터 캘러스를 유도하기 위해 SH 배지(Schenk 및 Hildebrandt, 1972)에 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)를 3 mg/l 농도로 첨가한 배지를 사용하였으며 (Kim 등, 1999), 배지의 pH는 5.8, agar 농도는 0.8%로 조절하였다. 소독한 종자를 준비한 캘러스 유도배지에 치상하여 25±2℃의 암조건에서 캘러스를 유도하였으며, 동일한 배지를 이용해 20일 간격으로 계대배양하면서 증식시켰다.

2. 식물체 재분화 및 뿌리 유도

캘러스로부터 식물체 재분화를 유도하기 위해 Kim 등 (1999)의 방법으로 실험을 전개하였다. 캘러스를 NAA 5 mg/l와 kinetin 2 mg/l을 첨가한 SH 배지에서 28일간 광조건으로 배양시키고, 2,4-D 11 mg/l와 kinetin 1 mg/l을 첨가한 SH 배지에서 3일간 배양한 다음, (NH₄)₂SO₄ 1.6 g/l와 L-proline 5.75 g/l을 첨가한 SH 배지에서 21일간 배양하였다.

이 후에는 재분화가 진행되고 있는 캘러스 및 shoot로부터 뿌리를 유도하기 위한 최적의 조건을 알아보기 위해, SH 배지에서 salt의 양을 조절하거나 첨가되는 호르몬 량을 조절하는 방법으로 8가지 배지 조건을 설정하여 뿌리를 유도하였다. 알팔파의 뿌리를 유도하기 위한 배지는, Table 1에서 보여주는 바와 같이 SH 배지에 IBA를 0~2 mg/l 농도로 첨가한 배지 4종과 SH salt의 양을 1/2로 줄인 배지에 IBA를 0~2 mg/l 농도로 첨가한 배지 4종 등 모두 8종의 배지를 사용하였다. 뿌리 유도를 위한 모든 배지의 phyto-agar 농도는 0.8%로 조절하였으며, 빛 조건은 16시간의 광조건과 8시간

Table 1. The medium components for root induction from regenerated alfalfa stems and calli

Medium	Amount of SH salt	Addition of IBA (mg/ℓ)
SH-0	Full	0
SH-1.0IBA	Full	1.0
SH-1.5IBA	Full	1.5
SH-2.0IBA	Full	2.0
1/2 SH-0	Half	0
1/2 SH-1.0IBA	Half	1.0
1/2 SH-1.5IBA	Half	1.5
1/2 SH-2.0IBA	Half	2.0

의 압조건으로 처리하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 캘러스 유도 및 식물체 재분화

알팔파 품종 중에서 “Vernal” 종자를 소독하여 2,4-D 3 mg/ℓ 을 첨가한 SH (Schenk 및 Hildebrandt, 1972) 배지에서 20일 이상 배양하여 캘러스를 유도하였다. Kim 등 (1999)의 보고에 의하면 알팔파 품종 중에서 “Vernal” 품종이 캘러스 유도 및 식물체 재분화에 있어 효율이 높기 때문에, 본 연구에서도 공시품종을 “Vernal”로 하여 실험을 진행하였다.

재분화의 일반적 과정은 cytokinin이 포함된 배지에서 shoot 형성을 유도한 후, NAA, IBA (Indol-3-butyric acid) 혹은 IAA (Indol-3-acetic acid) 등과 같은 rooting 호르몬이 첨가되거나 첨가되지 않은 배지에서 뿌리를 내리게 함으로써 완전한 식물체를 형성하게 하는 것이다 (Thorpe, 1981). Kim 등 (1999) 방법에 따라, 모든 처리를 광조건으로 하여 SH 배지에 NAA 5 mg/ℓ 과 kinetin 2 mg/ℓ 을 첨가한 배지에서 28-30일간 배양하고, 2,4-D 11 mg/ℓ 과 kinetin

1 mg/ℓ 을 첨가한 배지에서 3-5일간 배양 후, (NH₄)₂SO₄ 1.6 g/ℓ 과 proline 5.75 g/ℓ 을 첨가한 배지에서 21-25일간 배양한 결과, 완전히 재분화된 일부 식물체와 많은 수의 shoot를 얻을 수 있었다.

하지만 대부분의 경우에 식물체 재분화 과정에서 가장 문제가 되는 부분이 정상적인 뿌리를 유도하는 과정이다. 알팔파의 재분화 과정에서도 Kim 등 (1999)의 방법으로 많은 shoot를 얻을 수는 있었지만, 정상적으로 유도된 뿌리의 비율은 매우 낮기 때문에 최종적으로 재분화된 식물체의 수는 매우 제한적이었다.

2. 알팔파의 뿌리유도 효율

알팔파의 재분화 과정에서 뿌리가 유도되는 효율을 높이기 위해, SH salt의 양과 호르몬 양을 달리한 8종의 배지에서 각각 뿌리가 유도되는 정도를 조사해 본 결과, 뿌리 유도는 SH salt의 양에 따라서도 달라지며, 호르몬 첨가량에 의해서도 차이가 나타났다.

SH 기본배지에 IBA의 첨가량을 다르게 하여 뿌리 유도율을 조사했을 때, Table 2에서와 같이 SH-0 배지에서 34.5%, SH-1.0IBA 배지에서

Table 2. Root induction ratio of alfalfa on SH media contained IBA

Medium	Number of treated sample	Number of root induction	Ratio of root induction (%)
SH-0	200	69	34.5
SH-1.0IBA	200	104	52.0
SH-1.5IBA	200	112	56.0
SH-2.0IBA	200	75	37.5

52.0%, SH-1.5IBA 배지에서 56.0%, SH-2IBA 배지에서 37.5%의 뿌리 유도율을 나타내었다. SH 기본배지를 사용한 것에 비해 IBA를 첨가했을 때 뿌리 유도율이 높았으며, 배지에 1.5 mg/ℓ의 IBA를 첨가했을 때 뿌리 유도율이 56.0%로서 가장 높았다. 또한 IBA 첨가량이 1.5 mg/ℓ을 초과할 경우 뿌리 유도율은 오히려 낮아지게 됨을 확인하였다.

한편 SH salt의 양을 1/2로 줄이고 IBA 첨가량을 다르게 하여 뿌리 유도율을 조사한 결과, Table 3에서와 같이 1/2 SH-0 배지에서 41.0%, 1/2 SH-1.0IBA 배지에서 55.5%, 1/2 SH-1.5IBA 배지에서 60.0%, 1/2 SH-2IBA 배지에서 48.5%의 뿌리 유도율을 나타내었다. SH 기본배지를 사용한 것에 비해 SH salt의 양을 1/2로 줄인 배지에서 뿌리 유도율이 높았으며, Table 1의 결과와 마찬가지로 IBA를 첨가했을 때 뿌리 유도율이 높았다. 여기에서도 역시 배지 1 리

터당 1.5 mg의 IBA를 첨가했을 때 뿌리 유도율이 60.0%로서 가장 높았으며, IBA 첨가량이 1.5 mg을 초과할 경우 뿌리 유도율은 낮아지는 것으로 나타났다.

Son 등 (2001)의 보고에서도 배지 1 리터에 IBA를 1.5 mg 첨가한 처리에서 뿌리 유도율이 가장 높게 나타났는데, 본 실험에서도 동일한 결과가 도출되었다. 한편 Son 등 (2001)에서는 IBA를 첨가하지 않은 조건에서, SH salt 양을 정상적으로 넣은 처리와 1/2로 줄인 처리간에 뿌리 유도율이 거의 같았으나, 본 실험에서는 SH salt를 1/2로 줄인 모든 처리에서 뿌리 유도율이 더 높게 나타났다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, 알팔파의 뿌리 유도를 위한 최적 배지 조건은 IBA 첨가량을 1.5 mg/ℓ로 하고 SH salt의 양을 1/2로 줄여서 사용하는 것이 좋을 것으로 판단된다.

Table 3. Root induction ratio of alfalfa on SH media with reduced salt and different volume of IBA

Medium	Number of treated sample	Number of root induction	Ratio of root induction (%)
1/2 SH-0	200	82	41.0
1/2 SH-1.0IBA	200	111	55.5
1/2 SH-1.5IBA	200	120	60.0
1/2 SH-2.0IBA	200	97	48.5

IV. 요약

알팔파 종자를 3 mg/l의 2,4-D를 첨가한 SH 배지에서 배양하여 캘러스를 유도하였으며, 캘러스를 SH 배지에 5 mg/l의 NAA와 2 mg/l의 kinetin을 첨가한 배지에서 28~30일간 배양하고, 11 mg/l의 2,4-D와 1 mg/l의 kinetin을 첨가한 배지에서 3~5일간 배양 후, 1.6 g/l의 (NH₄)₂SO₄와 5.75 g/l의 proline을 첨가한 배지에서 21~25일간 배양하여 완전히 재분화된 식물체와 많은 수의 shoot를 얻었다. 알팔파의 재분화 과정에서 뿌리가 유도되는 효율을 높이기 위해, SH salt의 양과 호르몬 양을 달리한 8종의 배지에서 각각 뿌리가 유도되는 정도를 조사해 본 결과, SH 기본배지를 사용한 것에 비해 IBA를 첨가했을 때 뿌리 유도율이 높았으며, 배지 1 리터당 1.5 mg의 IBA를 첨가했을 때 뿌리 유도율이 56.0%로서 가장 높았다. 또한 SH salt의 양을 1/2로 줄이고 IBA 첨가량을 다르게 하여 뿌리 유도율을 조사했을 때, SH 기본배지를 사용한 것에 비해 SH salt의 양을 1/2로 줄이면 뿌리 유도율이 높아졌으며, IBA를 첨가했을 때 뿌리 유도율이 높았다. 이상의 결과에서 알팔파의 뿌리를 유도하기 위한 배지는, IBA 첨가량을 1.5 mg/l로 하고 SH salt의 양을 1/2로 줄여서 사용하는 것이 좋을 것으로 판단된다.

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. 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.
3. 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.
4. Kaul, K. and T.S. Kochhar. 1985. Growth and differentiation of callus cultures of pinus. Plant Cell Reports 4:180-183.
5. Kim, K.Y., B.R. Sung, Y.W. Rim, G.J. Choi, Y.C. Lim, Y.S. Jang, S. Seo, S.H. Yoon, G.J. Park and J. Jo. 2001. Transformation of Alfalfa by *BcHSP17.6* Gene using *Agrobacterium tumefaciens*. J. Korean Grassl. Sci. 21(3):151-156.
6. 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.
7. Lee, B.H., S.H. Won, H. Lee, K.Y. Kim and J. Jo. 2000. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of alfalfa using secondary somatic embryogenic callus. J. Korean Grassl. Sci. 20(1): 13-18.
8. Liz, R.E. and D.J. Gray. 1995. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. World Microbio Biotechnol 11:416-425.
9. Saunders, J.W. and E.T. Bingham. 1972. Production of alfalfa plants from callus tissue. Crop Sci. 12:804-808.
10. 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. 50:199-210.
11. 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.
12. Son, D., K.Y. Kim, Y.S. Jang, H. Lee, S.H. Won, B.H. Lee, M.H. Kim and J. Jo. 2001. Root initiation in cut alfalfa stems by treatment of IBA. J. Korean Grassl. Sci. 21(1):27-30.
13. Stuart, C.A. and S.G. Strikland. 1984. Somatic

- embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L.. Plant Sci. Lett. 34:165-174.
14. Thorpe, T.A. 1981. Plant tissue culture. Academic Press, Canada pp.32-33.
15. Vidacovic, M. and S. Jelaska. 1983. Preservation of gene pool of forest tree species. Genetica 15:369-375.
16. 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.