

알팔과 캘러스로부터 삼투압 스트레스 처리에 의한 효율적인 식물체 재분화

김진수 · 이동기 · 이상훈 · 우현숙 · 이병현

경상대학교 응용생명과학부, 낙농학전공

Efficient Plant Regeneration from Alfalfa Callus by Osmotic Stress Treatment

J. S. Kim, D. G. Lee, S. H. Lee, H. S. Woo and B. H. Lee

Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT

Effects of culture medium supplements and osmotic stress treatment on embryogenic callus induction and somatic embryogenesis were investigated in order to optimize tissue culture conditions of alfalfa(*Medicago sativa* L.). SH medium containing 5mg/L 2,4-D and 0.2mg/L kinetin was optimal for embryogenic callus induction from cotyledon tissue of alfalfa. Somatic embryos were formed when the embryogenic callus was cultured on SH medium supplemented with 1mg/L 2,4-D and 2mg/L BA. Supplementation of 5mM L-proline and 1g/L casein hydrolysate into the regeneration medium further increased plant regeneration frequency. Osmotic stress treatment of callus appeared to improve the frequency of somatic embryo formation, but the frequency of somatic embryo formation differed by the osmotic stress treatment using different osmotic stressors. The highest plant regeneration frequency of 30.7% was observed when embryogenic callus was treated with 0.7M sucrose for 18h. Efficient regeneration system established in this study will be useful for molecular breeding of alfalfa through genetic transformation.

(Key words : Alfalfa, Callus, Plant regeneration, Somatic embryogenesis)

I 서 론

알팔과(*Medicago sativa* L.)는 서남아시아의 산악지역이 원산지로서, 단백질, 비타민, 광물질 함량이 높고 기호성이 좋아서 청예용, 건조용, 방목용, 사일리지 및 분말사료용으로 널리 재배되고 있는 목초종 중의 하나이다. 기후와 토양조건에 대한 적응력은 비교적 높아서 한 발에 대한 저항성은 강하나, 습윤한 기후나 고온다습한 환경에서는 생육에 지장을 받으며, 산성토양에 매우 약한 단점을 지니고 있

다. 또한 알팔과 우점초지에 방목할 경우에는 과다 섭취로 인하여 고창증을 일으키기도 하는 단점이 있어서 화분과 목초와 혼파하여 이용하는 것이 권장되고 있다. 최근 축합형 탄닌(CT, condensed tannin)이 고창증을 방지해 줄 뿐만 아니라, 항산화물질로 작용하여 가축의 심장 및 면역계 관련 질병에 있어서 다양한 보호작용을 하는 것으로 알려져 있다 (Barry 등, 1999). 알팔과의 경우, 종피와 뿌리 조직에는 다양한 구조의 CT가 축적되는 것으로 알려져 있으나(Koupai-Abyazani 등, 1993;

Corresponding author : B. H. Lee, Division of Applied Life Science · Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea, Tel : 055-751-5418, Fax : 055-751-5410, E-mail: hyun@nongae.gsnu.ac.kr.

Dixon과 Sumner, 2003), 사료용으로 이용되는 부분인 잎 조직에서는 그 함량이 매우 낮거나 합성되지 않는 것으로 알려져 있다(Morris와 Robbins, 1997). 따라서 알팔파 잎 조직에서의 CT 함량을 높일 수 있다면 고장증을 예방할 수 있는 신품종 개발 가능성이 증가될 것이다.

지금까지 고품질 목초를 개발하기 위하여, 유전자 형질전환에 의한 사료작물의 CT 함량을 조절하고자하는 연구(Morris와 Robbins, 1997), 세포벽 성분을 변화시켜 소화율을 증진시킨 알팔파를 개발하고자하는 연구(Guo 등, 2001) 등의 분자유종 연구가 활발히 진행되고 있다. 이를 위해서는 먼저 알팔파에 대한 효율적인 조직배양 기술체계가 확립되어야 한다. 알팔파의 재분화에 관한 연구는 원형질체 배양(Jonson 등, 1981; Dos Santos 등, 1980), 캘러스 배양(Chen 등, 1987) 등에 의한 식물체 재분화가 보고된 바 있다. 그러나 아직까지 전체적으로 식물체의 재분화율이 비교적 낮고, 재분화능이 높은 'Regen-S'와 같은 특수한 품종(Saunders와 Bingham, 1972)을 이용해야 하는 등의 단점이 있다. 또한 실제로 널리 재배되고 있는 재배품종의 식물체 재분화에 관한 체계적인 연구는 미약한 실정으로서, 형질전환에 이용하기에는 효율적이지 못한 측면이 있다.

따라서 본 연구는 유전자 형질전환을 통하여 고품질의 알팔파 신품종 개발을 목적으로, 우선 효율적인 조직배양체계를 확립하고자 하였다. 알팔파의 재배품종인 'Vernal'의 캘러스 배양에 있어서 배지첨가물질의 종류와 농도 및 삼투압 스트레스 처리가 식물체 재분화에 미치는 영향을 체계적으로 조사하여, 효율적인 재분화 시스템을 확립함으로써 고품질 알팔파의 분자유종 기반기술을 확립하고자 하였다.

II 재료 및 방법

1. 식물재료 및 종자 살균

식물재료로는 알팔파의 품종 중 'Vernal'

품종을 사용하였다. 종자 살균은 70% ethanol에서 30초간 살균한 후, 30% sodium hypochlorite 용액에서 30분간 교반하면서 표면살균 하였다. 살균한 종자는 멸균수로 3회 세정한 후 멸균된 filter paper에 옮겨 물기를 제거하고 MS 배지에 무균 파종하여 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 16시간 광조건의 생장실에서 10일간 배양한 유식물체를 캘러스 유도를 위한 식물재료로 이용하였다.

2. 배발생 캘러스의 유도

알팔파로부터 배발생능이 높은 캘러스가 유도되는 빈도는 예비실험을 통하여 확인한 결과, 종자유래의 캘러스보다 유식물체의 자엽유래 캘러스에서 높게 나타나 자엽으로부터 캘러스를 유도하였다. 무균 재배한 알팔파 유식물체의 자엽부분으로부터 배발생 캘러스를 유도하기 위한 기본적인 캘러스 유도배지는 30g/L sucrose와 0.25% gelrite가 첨가된 SH 배지(Shenk와 Hildebrandt, 1972)를 사용하였다. 배발생 캘러스 유도율은 예비실험을 통하여 재분화율이 높은 캘러스로 확인된 조직이 치밀하고 밝은 녹색을 띠고, 세포의 증식속도가 빠르며 윤기를 띠는 배발생 캘러스의 형성 비율로 조사하였다. 캘러스 유도시의 식물생장조절제의 종류와 농도에 따른 배발생 캘러스 유도효율을 조사하기 위하여, 80개의 자엽절편체를 상기의 캘러스 유도배지에 auxin(2,4-D, NAA, IAA)과 cytokinin(BA, kinetin)을 단용 또는 혼용하여 첨가한 배지에 치상한 다음, $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 16시간 광조건의 생장실에서 4주간 배양한 후 형성된 배발생 캘러스의 비율을 조사하였다.

3. 캘러스로부터 식물체 재분화

캘러스로부터 식물체로 재분화시키기 위해 기본적으로 사용한 재분화배지는 SH 기본배지에 1mg/L 2,4-D, 2mg/L BA, 30 g/L sucrose 및 2.5g/L gelrite가 첨가된 배지를 이용하였

다. 식물체 재분화를 위한 적정 성장조절물질의 종류와 농도를 조사하기 위하여, 4주간 배양한 배발생 캘러스를 식물성장조절물질 또는 배지첨가물질이 각각 조합처리된 재분화 배지에 옮겨 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 16시간 광조건에서 4주간 배양하여 체세포 배를 유도한 다음, 동일한 새 배지에 1회 계대하여 2주간 더 배양하여 각각의 처리구에서 형성된 체세포 배를 재분화개체로 조사하였다. 식물체 재분화에 미치는 삼투압 스트레스의 종류와 농도 효과 조사는 4주간 배양한 배발생 캘러스를 0.7M의 sucrose, sorbitol 또는 mannitol이 첨가된 SH 기본배지에 0~24시간 까지 시간별로 처리한 다음, 상기의 재분화 배지에 계대하여 6주 동안 배양한 후, 재분화된 체세포 배의 비율을 조사하였다. 재분화 배지에서 형성된 체세포 배는 충분히 성장시킨 다음, 1/2 MS 배지에 이식하여 유식물체로 분화시킨 후, 뿌리 발생을 유도하여 완전한 식물체로 분화시킨 후, 토양에 이식하여 온실에서 재배하였다.

III 결과 및 고찰

1. 성장조절물질이 캘러스 배양에 미치는 영향

알팔파의 자엽으로부터 캘러스 유도시에 첨가되는 성장조절물질의 종류와 농도가 배발생 캘러스 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 예비실험을 통하여 조사해 본 결과, 2,4-D와 cytokinin(BA 또는 kinetin)과의 혼용 처리가 가장 효율적이었다. 여러 가지 조합 처리 중 배발생 캘러스 형성에 비교적 효율적이었던 2,4-D와 BA 또는 kinetin과의 단용 또는 혼용 처리시의 배발생 캘러스 유도율을 조사해 본 결과는 Table 1과 같다. 알팔파의 자엽조직을 5mg/L 2,4-D 단용처리구에서 배양한 결과 대부분의 유도된 캘러스 조직이 수분을 많이 함유한 상태로 증식되었으며, 배발생능이 높은 캘러스의 형성율이 7.7% 내외로 낮은 비율을 나타내었다. 이와 반면 5mg/L

Table 1. Effect of growth regulators on induction of embryogenic callus from cotyledon of alfalfa

Growth regulators	Frequency of embryogenic callus (%) [†]
5 mg/L 2,4-D	7.7 ± 1.5 ^c
5 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L kinetin	23.7 ± 2.5 ^a
5 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L BA	13.3 ± 3.5 ^b

Values represent the mean(±SD) of three independent experiments. Different letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

[†]Callus was cultured for 4 weeks on SH medium containing each growth regulator, 3% sucrose and 0.25% gelrite.

2,4-D와 kinetin 또는 BA를 조합 처리한 결과, 배발생 캘러스의 유도율이 증가되었다. 즉, 5mg/L 2,4-D와 0.2mg/L kinetin이 혼용 첨가된 배지에서 유도된 캘러스의 경우, 배발생 캘러스의 형성율이 23.7%로 가장 높은 효율을 나타내었으며, 5mg/L 2,4-D와 0.2mg/L BA가 혼용 첨가된 배지의 경우 13.3%의 배발생 캘러스 형성율을 나타내었다. 이와 같이 캘러스 유도배지에 고농도의 2,4-D와 저농도의 kinetin을 첨가해 줌으로서 알팔파의 배발생 캘러스의 비율이 증가한 결과가 Mijer와 Brown (1987)에 의해서 보고된 바 있다. 따라서 이후의 캘러스로부터 식물체 재분화를 위한 실험에는 5mg/L 2,4-D와 0.2mg/L kinetin이 혼용 첨가된 배지에서 유도된 배발생능이 높은 캘러스를 이용하였다.

2. 성장조절물질과 배지첨가물질이 식물체 재분화에 미치는 영향

알팔파의 캘러스로부터 식물체 재분화시에 배지에 첨가되는 식물성장조절물질의 영향을 조사하기 위하여, SH 기본배지에 30g/L sucrose 및 2.5g/L gelrite가 첨가된 배지를 기

본으로 하여 2,4-D 단용 또는 BA와 kinetin과의 혼용 첨가한 배지에 캘러스를 배양한 후, 체세포배의 형성율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 1mg/L 2,4-D 단용 처리구의 경우 6주간 배양한 후의 체세포배의 형성율은 0.7%로 아주 낮은 효율을 보인 반면, 1mg/L 2,4-D와 2mg/L BA 처리구에서는 10.7%의 체세포 배 형성율을 나타내어 2,4-D 단용처리구에 비해 15배 이상의 높은 재분화 효율을 나타내었다. 그러나 1mg/L 2,4-D와 2mg/L kinetin 처리구에서는 이 보다 낮은 3.6%의 체세포 배 형성율을 나타내었다. Trinh 등(1998)은 알팔파 'Falcata' 품종의 경우, 캘러스로부터 재분화시에 2mg/L 2,4-D와 1mg/L BA를 첨가한 배지에서 가장 높은 재분화율을 나타낸다고 보고하였다. 이러한 차이는 품종에 따른 최적 식물체 재분화조건이 서로 다름을 나타내는 결과로 사료되며, 본 실험의 'Vernal' 품종의 경우는 'Falcata'에 비해 보다 낮은 농도의 2,4-D와 높은 농도의 BA를 첨가해 주는 것이 식물체 재분화에 효율적인 것으로 판단되었다.

지금까지 *Medicago* 속에 속하는 식물의 체세포 배발생에 있어서 질소원으로서 여러 가

지 아미노산 또는 casein hydrolysate를 배지에 첨가해 줌으로서 배발생율이 증가했다는 연구결과가 보고된 바 있다(Hita 등, 2003; Gallego 등, 2001). 본 실험에 사용된 'Vernal' 품종에 있어서 캘러스로부터 체세포 배발생에 미치는 질소원의 효과를 조사하기 위하여, 재분화 배지에 L-proline과 casein hydrolysate를 첨가한 후의 배발생 효율을 각각 비교해 본 결과는 Table 3과 같다. 재분화 배지에 L-proline을 첨가해준 경우, 5mM 농도로 첨가해주었을 때가 13.7%의 재분화율을 나타내어 무첨가구에 비해 유의적인 차이는 없었으나 1.4배 정도 증가한 비율을 나타내었으며, 10mM 첨가구의 경우 12%의 재분화율을 나타내었다. 이와 같이 캘러스 또는 현탁배양세포로부터 식물체 재분화에 있어서 L-proline을 첨가해 줌으로서 재분화율을 증가시킨 결과가 *Medicago arborea* (Hita 등, 2003), 기장(Eapan과 George, 1990) 및 수수(Rao 등, 1995) 등에서도 보고되었다. 한편 casein hydrolysate의 경우 1g/L의 농도로 첨가해 주었을 때가 12.3%의 재분화율을 나타

Table 2. Effect of growth regulators on somatic embryo formation from cotyledon-derived embryogenic callus of alfalfa

Growth regulators	Frequency of somatic embryo formation (%) [†]
1 mg/L 2,4-D	0.7 ± 0.3 ^c
1 mg/L 2,4-D + 2 mg/L BA	10.7 ± 2.1 ^a
1 mg/L 2,4-D + 2 mg/L kinetin	3.6 ± 1.2 ^b

Values represent the mean(±SD) of three independent experiments. Different letters indicate significant differences at P < 0.05.

[†]Embryogenic callus was cultured on SH medium containing each growth regulator, 3% sucrose and 0.25% gelrite.

Table 3. Effect of proline and casein hydrolysate on somatic embryo formation in alfalfa

Medium supplements	Frequency of somatic embryo formation (%) [†]
None	9.7 ± 3.1 ^b
5 mM L-proline	13.7 ± 3.2 ^{ab}
10 mM L-proline	12.0 ± 2.1 ^{ab}
1 g/L Casein hydrolysate	12.3 ± 2.1 ^{ab}
2 g/L Casein hydrolysate	11.3 ± 3.5 ^{ab}
5 mM L-proline + 1 g/L Casein hydrolysate	15.7 ± 2.5 ^a

Values represent the mean(±SD) of three independent experiments. Different letters indicate significant differences at P < 0.05.

[†]Embryogenic callus was cultured on SH medium containing 1 mg/L 2,4-D, 2 mg/L BA, 3% sucrose and 0.25% gelrite.

내어 무첨가구 또는 2g/L 첨가구의 11.3% 보다 유의적인 차이는 없었으나 약간 높게 나타났다. 이들 두 첨가물질을 동시에 첨가해준 경우는 15.7%의 가장 높은 재분화율을 나타내어, 무첨가 또는 각각의 첨가물질을 단독 첨가해주는 것보다 체세포 배형성에 있어서 효율적인 것으로 판단되었다.

3. 삼투압 스트레스 처리가 재분화에 미치는 영향

알팔파의 캘러스로부터 식물체 재분화에 있어서 삼투압 스트레스 처리가 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사하기 위하여, sucrose, mannitol 및 sorbitol을 0~1M 농도로 처리한 후의 재분화율을 예비실험을 통하여 조사해본 결과, 세 종류의 삼투압 스트레스 처리 모두 0.7M에서 가장 효율적인 것으로 나타났다. 각각의 삼투압 스트레스 유발물질의 처리 시간에 따른 식물체 재분화율을 조사한 결과, 무처리구에 비해 높은 식물체 재분화율을 나타내었다(Table 4). 배발생 캘러스를 0.7M sucrose가 첨가된 SH 배지에 치상하여 24시간 까지 배양한 후, 다시 식물체 재분화 배지에서 배양한 후의 체세포 배 형성율을 조사한 결과, 18시간 처리했을 때 30.7%의 가장 높은 재분화율을 나타내어 무처리구에 비해 2배 높은 재분화율을 나타내었으며, 24시간 처

리에서는 17.3%로 오히려 감소하였다. Mannitol 처리의 경우는 12시간 처리구에서 20.4%의 재분화율을, sorbitol 처리의 경우는 18시간 처리에서 24.3%의 재분화율을 각각 나타내었으며, 이보다 짧거나 긴 시간 동안의 스트레스 처리에서는 재분화율이 감소하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과는 알팔파의 캘러스로부터 식물체 재분화에 있어서 삼투압 스트레스의 일시적인 처리가 재분화율을 효율적으로 증가시키며, 삼투압 스트레스 유발물질의 종류뿐만 아니라, 처리시간이 체세포 배형성에 있어서 매우 중요한 요인으로 작용함을 나타내는 결과이다. 지금까지 보고된 바에 의하면, 당근의 경우, 0.7M sucrose나 0.3M NaCl을 이용한 삼투압 스트레스 처리, 또는 0.6mM CdCl과 같은 중금속 스트레스 처리 등과 같은 다양한 스트레스 처리가 체세포 배의 형성율을 증가시키는 것으로 보고되었다(Kamada 등, 1990; Kiyosue 등, 1990). 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 경우는 0.7M mannitol에서 6~9시간 삼투압 스트레스를 처리했을 때, 체세포 배의 형성율이 현저히 증가되는 것으로 보고되었다(Ikeda-Iwai 등, 2003). 이와 같은 결과들은 다양한 스트레스의 일시적인 처리가 캘러스로부터 체세포 배형성에 있어서 필요한 일반적인 반응기작을 유도시킴으로서 식물체 재분화율을 증가시키는 것으로 사료된다. 본 실험을 통하여 재분

Table 4. Effect of osmotic stress on frequency (%) of somatic embryo formation in alfalfa

Kind of stresses	Duration of stress treatment (h) [†]				
	0	9	12	18	24
0.7 M Sucrose	15.3 ± 2.0 ^d	16.3 ± 3.1 ^{cd}	22.7 ± 3.2 ^{bc}	30.7 ± 4.5 ^a	17.3 ± 4.2 ^{cd}
0.7 M Mannitol	15.3 ± 2.0 ^d	16.0 ± 3.5 ^{cd}	20.4 ± 4.0 ^{bcd}	16.7 ± 3.8 ^{cd}	14.7 ± 2.5 ^d
0.7 M Sorbitol	15.3 ± 2.0 ^d	17.3 ± 6.1 ^{cd}	20.0 ± 2.7 ^{bcd}	24.3 ± 3.1 ^b	15.0 ± 1.0 ^d

Values represent the mean(±SD) of three independent experiments. Different letters indicate significant differences at P < 0.05.

[†] Embryogenic callus was cultured on growth regulator-free SH medium containing 0.7 M sucrose, 0.7 M mannitol or 0.7 M sorbitol for 0-24 h, and then transferred to SH medium containing 1 mg/L 2,4-D, 2 mg/L BA, 5 mM L-proline, 1 g/L casein hydrolysate, 3% sucrose and 0.25% gelrite.

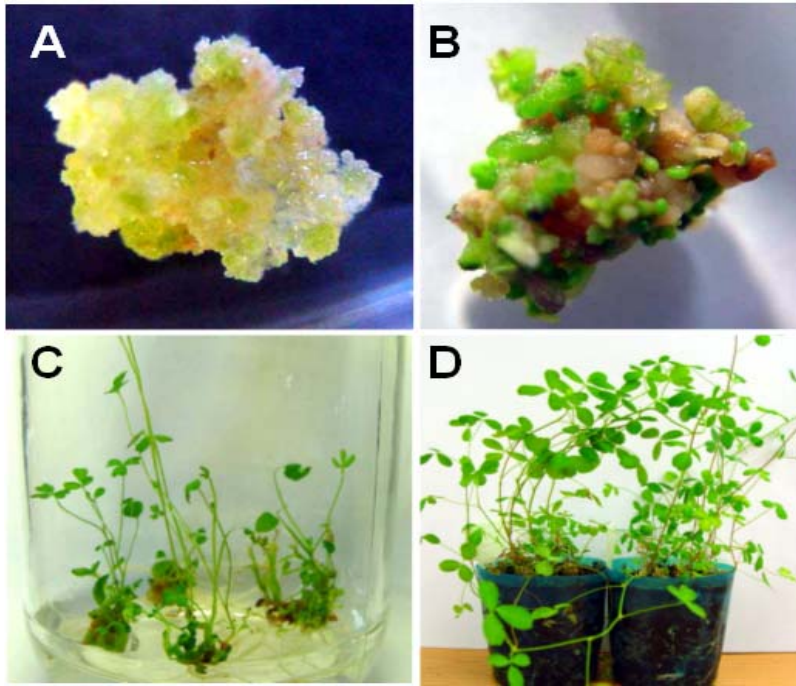


Fig. 1. Plant regeneration from osmotic stress-treated callus of alfalfa.

A, Embryogenic callus induced from cotyledon of alfalfa on the callus induction medium. B, Osmotic stress-treated embryogenic callus with multiple somatic embryos that were cultured in the regeneration medium. C, Regenerated plantlets cultured in the rooting medium. D, Whole plants grown in pots under green house.

화 효율이 극히 낮아 유전자 형질전환을 통한 유용물질 생산에 있어서 장해요인이었던 재배품종 알팔파의 캘러스로부터 식물체 재분화에 있어서 재분화 효율을 증가시켰으며, 캘러스유도로부터 16주 이내에 식물체로 재분화시킬 수 있는 효율적인 조직배양 체계를 확립하였다. 일반적인 재배품종인 ‘Vernal’ 유 식물체의 절편체를 캘러스 유도배지에서 배양한 결과, 배발생능이 높은 캘러스를 얻을 수 있었으며(Fig. 1A), 0.7M의 sucrose가 첨가된 SH 배지에서 18시간 삼투압 스트레스를 처리한 후, 재분화 배지에서 배양했을 때, 많은 수의 체세포 배가 형성되었으며(Fig. 1B), 분화된 체세포 배는 1/2 MS rooting 배지에서 2주간 배양하여 완전한 식물체로 분화시킨 후, 포트에 이식하여 재배할 수 있었다(Fig. 1C, D). 이와 같은 알팔파에 대한 효율적인 재분화 체계

는 유용물질 생산 관련 유전자의 도입에 의한 신품종 형질전환 알팔파 개발 등에 있어서 유용하게 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

IV 요 약

알팔파의 최적 조직배양 조건을 확립하기 위하여 자엽으로부터 배발생 캘러스 유도 및 캘러스로부터 식물체 재분화에 미치는 배지첨가물질과 삼투압 스트레스 처리의 영향을 조사하였다. 배발생 캘러스 유도시에 첨가되는 식물생장조절물질로는 5mg/L 2,4-D와 0.2mg/L kinetin이 혼용 첨가된 SH 배지에서 배발생 캘러스가 가장 높은 빈도로 유도되었다. 배발생 캘러스를 1mg/L 2,4-D와 2mg/L BA가 첨가된 SH 배지에서 배양했을 때 체세포 배가 형성되었다. 재분화 배지에 첨가되는 질소원

으로 5mM L-proline과 1g/L casein hydrolysate를 동시에 첨가해주었을 때, 식물체 재분화율이 증가되었다. 배발생 캘러스를 0.7M 농도의 삼투압 스트레스 조건에서 12~18시간 처리한 후, 재분화 배지에서 배양한 결과 재분화율이 현저히 증가되었다. 가장 높은 식물체 재분화율은 0.7M sucrose가 첨가된 배지에서 18시간 처리한 후, 재분화 배지에서 배양했을 때 30.7%의 효율을 나타내었다. 본 연구를 통하여 확립된 알팔파의 효율적인 배발생 캘러스의 유도 및 식물체 재분화체계는 분자육종을 통한 신품종 알팔파의 개발에 유용하게 이용되어질 수 있을 것이다.

V 사 사

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2003-003-F00027).

VI 인용 문헌

- Barry, T. N. and McNabb W. C. 1999. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *Br. J. Ntri.* 81:263-272.
- Chen, T., Marowitch, J. and Thompson, B. 1987. Genotypic effect on somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of alfalfa. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 8:73-81.
- Dixon, R. A. and Summer, L. W. 2003. Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiol.* 131:878-885.
- Dos Santos, A., Outka, D., Cocking, E. and Davey, M. 1980. Organogenesis and somatic embryogenesis in tissue derived from leaf protoplasts and leaf explants of *Medicago sativa*. *Z. Pflanzenphysiol.* 99:261-270.
- Epan, S. and George, L. 1990. Influence of phytohormones, carbohydrates, amino acids, growth supplements and antibiotics on somatic embryogenesis and plant differentiation in finger millet. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 22:87-93.
- Gallego, P., Hita, O., Villalobos, N., Dorado, A. and Martin, L. 2001. Somatic embryogenesis and plant regeneration with *Medicago arborea* L. plantlets. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:199-203.
- Guo, D., Chen, F., Inoue, K., Blout, J. W. and Dixon, R. A. 2001. Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa. *Plant J.* 13:73-88.
- Hita, O., Gallego, P., Villalobos, N., Lanás, I., Blázquez, A., Martín, P. J., Fernández, J., Martín, L. and Guerra, H. 2003. Improvement of somatic embryogenesis in *Medicago arborea*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 72:13-18.
- Ikeda-Iwai, M., Umehara, M., Satoh, S. and Kamada, H. 2003. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 34:107-114.
- Jonson, L., Stuteville, D., Higgins, K. and Skinner, K. 1981. Regeneration of alfalfa plants from protoplasts of selected Regen S clones. *Plant Sci. Lett.* 20:297-304.
- Kamada, H., Ishikawa, K., Saga, H. and Harada, H. 1990. Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. *Plant Tiss. Cult. Lett.* 10:38-44.
- Kiyosue, T., Takano, K., Kamada, H. and Harada, H. 1990. Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions. *Can. J. Bot.* 68:2301-2303.
- Koupai-Abyazani, M. R., McCallum, J., Muir, A. D., Lees, G. L., Bohm, B. A., Towers, G. H. N. and Gruber, M. Y. 1993. Purification and characterization of a proanthocyanidin polymer from seed of alfalfa (*Medicago sativa* cv. beaver). *Agric. Food Chem.* 41:565-569.
- Mijer, E. and Brown, D. 1987. A novel system for rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Physiol. Plant.* 69:591-596.
- Morris, P. and Robbins, M. P. 1997. Manipulating condensed tannins in forage legumes. In McKersie BD, Brown DCW, eds, *Biotechnology and the improvement of forage legumes*. CAB international, Wallingford, CT, pp. 147-173.
- Rao, A. M., Padma, S. K. and Kavi, K. P. B. 1995. Enhanced plant regeneration in grain and sweet sorghum by asparagine, proline and cefotaxime. *Plant Cell Rep.* 15:72-75.

17. Saunders, J. and Bingham, E. 1972. Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Sci.* 26: 1235-1239.
18. Shenk, R. U. and Hildebrandt, A. C. 1972. Medium techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.
19. Trinh, T. H., Ratet, P., Kondorosi, E., Durand, P., Kamate, K., Bauer, P. and Kondorosi, A. 1998. Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* ssp. *Falcata* lines improved in somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 17:345-355.

(접수일자 : 2004. 3. 24. / 채택일자 : 2004. 9. 13.)