

버즈풋 트레포일 절편체 종류의 배양에 따른 식물체 재분화

이상훈* · 이기원*,** · 김기용* · 최기준* · 김맹중* · 지희정* · 이종경* · 서 성* · 이병현**

Plant Regeneration from Different Explant Types of Birdsfoot Trefoil (*Lotus corniculatus* L.)

Sang-Hoon Lee*, Ki-Won Lee*,**, Ki-Yong Kim*, Gi Jun Choi*, Meing Jooung Kim*,
Hee Chung Ji*, Joung Kyong Lee*, Sung Seo* and Byung-Hyun Lee**

ABSTRACT

Efficient plant regeneration system of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) was development. The factors affecting the somatic embryo formation, its proliferation and regeneration capacity of leaf and stem explants of Empire cultivar was investigated. The highest number of somatic embryos was obtained on B5 medium supplemented with 1 mg/L NAA and 1 mg/L BA. Depending on different explants, highest frequency of embryogenic callus and regeneration were observed in Empire with leaf explants. The response from stem explants was slower and callus induction was less than that from leaf explants. Regenerated shoots formed complete plantlets in on 1/2 MS medium supplemented with 1 mg/L IBA. Regenerated plants were morphologically uniform with normal shape and growth pattern.

(**Key words** : Embryogenic callus, Regeneration, Explant, *Lotus corniculatus*)

I. 서 론

식물의 조직배양은 우량종묘 생산, 유용물질 생산, 유용유전자 도입을 통한 저항성 및, 기능성 신제품개발 등의 목적으로 널리 이용되고 있다 (Doran, 2000). 조직배양 기술에 의한 식물체 재분화 기술은 형질전환 식물체 개발에 매우 중요한 핵심 기술이다. 식물체의 조직배양 효율은 초종에 따라 큰 차이를 보이며 동일한 초종에서도 품종, 배양 조직, 식물생장조절물질의 종류와 농도, 배양 배지에 첨가되는 물질에 따라 많은 차이가 있다 (Somers et al., 2003;

Zhang and Rouf Mian, 2003).

전통적인 육종방법과 더불어 최근에는 생명공학 기술을 이용한 작물의 신제품 개발에 관한 연구가 활발하게 진행 되고 있다 (Vinocur and Altman, 2005; Cherian et al, 2006). 특히 축산선진국을 중심으로 분자유종에 의한 목초 및 사료작물의 신제품 개발이 활발하게 진행되고 있으며, 그 결과 알팔파 (Week et al., 2008; Montague et al., 2008), 화이트 클로버 (Voisey et al., 1994; Schmidt et al., 2004), 툴 페스큐 (Dong and Qu, 2005; Chen et al., 2003; Bettany et al., 2003), 페레니얼 라이그라스 (Sato and

* 농촌진흥청 축산과학원 (National Institute of Animal Science, RDA)

** 경상대학교 응용생명과학부 (Division of Applied Life Science (BK21 program), Gyeongsang National University)

Corresponding author : Ki-Yong Kim, National Institute of Animal Science, RDA, Cheonan 330-801, Korea.

Tel: +82-41-580-6751. Fax: +82-41-580-6779. E-mail: Kimky77@rda.go.kr

Takamizo, 2006; Hisano et al, 2004) 등의 형질전환에 의한 신품종 개발에 관한 많은 연구 결과가 보고되고 있다.

지금까지 유전자 변형 농산물의 안전성에 대한 국제적 논란이 제기되고 있음에도 불구하고 유전자 변형 작물의 재배면적은 점차 확대되고 있는 추세이며, 유전자원의 독점화 및 유전자원 확보의 국가 간 경쟁이 치열해지고 있는 상황에서 우리나라도 지적 재산권 보존의 강화와 미래 식량안보차원에서 축산선진국에 대한 비교우위를 확보하기 위한 미래기술 개발이 시급하다.

버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.)은 다년생 두과 목초로서 건초, 사일리지 등으로 많이 이용되며 척박한 토양이나 산성토양에서도 생육이 좋은 환경 적응성이 우수한 목초이다. 또한, 버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.)은 영양가치가 우수하며 타닌 성분을 함유하고 있어 고창증을 일으키지 않는 장점이 있다 (Miller and Ehlke, 2004).

본 연구에서는 두과 목초인 버즈풋 트레포일에 *Agrobacterium*에 의한 유용유전자 형질전환을 통하여 신품종 개발을 목적으로 배양조직에 따른 효율적인 재분화 시스템을 확립하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 종자소독

식물재료로는 버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.)의 Empire 품종을 사용하였다. 공시재료의 성숙종자를 70% ethanol에서 30초간 표면을 살균하고 멸균수로 3회 세정한 후, 다시 10% (v/v) sodium hypochlorite 용액을 첨가하여 30분간 교반하면서 표면을 살균 하였다. 살균된 종자를 멸균수로 3회 이상 세정한 다음 멸균된

filter paper로 옮겨 물기를 완전히 제거한 후, 30 g/L sucrose 및 0.8% agar가 포함된 1/2 MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지에 20립씩 파종한 다음, 24±2°C, 16 h light/8 h dark 조건에서 2-3주간 생육시킨 후 발아된 신프를 실험에 사용하였다.

2. 배양배지 및 배양조건

기내에서 생육한 약 5~7 cm 크기의 신프로부터 잎과 줄기를 0.3~0.5 cm 크기로 절단하여 plate에 20절편씩 3반복으로 치상하였다. 캘러스를 유도하기 위하여 B5 (Gamborg et al., 1968) 배지에 30 g/L sucrose, 0.8% agar를 기본으로 첨가한 다음 auxin류로 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 또는 NAA (naphthaleneacetic acid)와 cytokinin류로 BA (benzyladenine)를 혼용으로 처리한 CM1 (0.5 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BA), CM2 (1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L BA), CM3 (0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L BA) 및 CM4 (1 mg/L NAA + 1 mg/L BA) 배지를 사용하였다. 배양조건은 24±2°C, 16 h light/8 h dark 조건에서 3주간 배양한 후 동일한 배지에 1회 계대배양하여 각각의 조직으로부터 캘러스 유도율과 캘러스 증식정도를 조사하였다. 배양 6주 후 형성된 캘러스로부터 식물체로의 재분화 유도와 유도된 shoot을 신장시키기 위하여 성장조절물질이 첨가되지 않은 B5 배지에 30 g/L sucrose, 0.8% agar를 첨가하여 3주 간격으로 계대 배양하였다. 줄기 신장 후 2~3 cm 이상의 재분화 식물체는 다양한 농도의 IBA (indolebutyric acid)가 첨가된 1/2MS 배지에 20 g/L sucrose, 0.8% agar가 첨가된 rooting 배지에 이식하여 뿌리를 유도한 다음, 뿌리 발육이 충분히 일어난 완전한 식물체는 토양에 이식하여 순화시킨 후 온실에서 재배하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 캘러스유도 및 식물체 재분화

버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.) Empire 품종의 잎과 줄기 절편체를 이용한 캘러스 유도 효율과 캘러스 증식정도를 조사한 결과 Table 1, 2와 같이 나타났다. 잎과 줄기 절편체를 배지에 치상한 후 (Fig. 1A, B), 배양한 결과 모든 처리구에서 5~7일 후부터 캘러스 형성이 시작되었다. 잎과 줄기 절편체를 이용한 조직별 캘러스 유도 효율은 auxin류로 2,4-D를 첨가한 처리구 보다 NAA를 첨가한 처리구에서 높게 나타났다 (Table 1). 1 mg/L NAA와 1 mg/L

BA가 첨가된 CM4 배지에서 잎 절편체는 92%, 줄기 절편체는 88%로 캘러스 유도효율이 가장 높게 나타났다. 또한, 모든 처리구에서 잎 절편체 배양하는 것이 더 줄기 절편체를 배양하는 것 보다 캘러스 유도 효율이 높게 나타났다. 모든 처리구에서 auxin의 농도가 높을수록 캘러스 형성 효율이 높았으며 특히 BA 농도가 높아질수록 캘러스 형태가 더욱 밀집형으로 형성되었다 (Fig. 1C, D). 2,4-D 처리구의 경우 배양기간이 길어질수록 캘러스의 갈변화가 많이 일어났고 황색의 부스러지기 쉬운 캘러스가 많이 형성되었다. 반면 NAA 처리구에서는 캘러스 증식 속도가 2,4-D 처리구에 비해 더 우수하였으며 조직적으로 치밀하고 재분화능이 우

Table 1. Callus induction from leaves and stems using different medium

Medium name	Combinations of plant growth regulator (mg/L)	Ration of callus induction (%) of different explants	
		Leaves	Stems
CM1	2,4-D (0.5) + BA (0.5)	57 ± 1.5	36.7 ± 1.5
CM2	2,4-D (1) + BA (1)	60 ± 2.6	56.7 ± 2.5
CM3	NAA (0.5) + BA (0.5)	87 ± 1.2	76.7 ± 1.5
CM4	NAA (1) + BA (1)	92 ± 1.5	88.3 ± 0.6

Mean ± SE of three independent experiments with three replicates.

^aThe basal medium was B5 medium supplemented with 30 g/L sucrose and 0.8% agar.

Table 2. Effect of callus induction from leaves and stems using different medium

Medium ^a	Combinations of plant growth regulator (mg/L)	Leaves	Stems
		Callus area (mm)	Callus area (mm)
CM1	2,4-D (0.5) + BA (0.5)	0.8 ± 0.15	0.7 ± 0.15
CM2	2,4-D (1) + BA (1)	1.3 ± 0.20	1.1 ± 0.25
CM3	NAA (0.5) + BA (0.5)	1.2 ± 0.15	1.0 ± 0.10
CM4	NAA (1) + BA (1)	1.8 ± 0.15	1.4 ± 0.15

Mean ± SE of three independent experiments with three replicates.

^aThe basal medium was B5 medium supplemented with 30 g/L sucrose and 0.8% agar.

수한 캘러스가 많이 형성 되었다. 이상의 결과로 볼 때, 버즈풋 트레포일의 조직 절편체를 이용하여 캘러스를 유도함에 있어 B5 배지에 1 mg/L NAA와 1 mg/L BA를 첨가한 CM4 배지가 가장 우수함을 알 수 있었다.

캘러스 배양 6주 후 캘러스로부터 shoot이 유도되기 시작하였으며 생장조절물질이 첨가되지 않는 배양배지에서 3주 간격으로 계대배양하여 shoot을 신장시킨 후 shoot의 형태를 조사한 결과, 잎 절편체를 치상하여 배양한 것은 대부분 multiple shoot으로 유도 되었으나 줄기 절편체를 치상하여 배양한 것은 2~3개의 shoot이 유도되었다(Fig. 1E, F). 이러한 결과는 배양배지에 의한 영향보다 조직의 절편에 따라 shoot의 형성에 크게 영향을 받는 것임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Akash 등의 결과와 일치하였다.

2. 발근유도 및 기내순화

줄기신장 후 2~3 cm 이상의 재분화 식물체의 shoot을 메스로 대각선 방향으로 절단하여 다양한 농도의 IBA가 첨가된 배지에 이식하여 뿌리 유도율을 조사한 결과 Table 3과 같이 나타났다. 배양 2주 후 IBA가 첨가되지 않는 1/2 MS 배지에서도 78.3%의 뿌리가 유도되었다(Table 3). 반면 IBA가 첨가된 모든 처리구에서 무첨가구에 비해 뿌리의 유도가 더 높았으며, IBA 농도가 높아질수록 잎과 줄기 절편체에서 유도된 shoot에서 뿌리 유도율이 높게 나타났다. 특히 1 mg/L IBA 첨가구의 경우 잎 절편체에서 유도된 shoot에서 98.3%, 줄기 절편체에서 유도된 shoot에서 93.3%로 뿌리가 유도되었으며 캘러스의 형성 없이 직접 뿌리를 내리고 뿌리의 발달도 잘 되었다. Rooting 배지에서 배양하여 뿌리 발육이 완전한 식물체는 pot에 이

식하여 기내순화 시킨 후 온실에서 정상적인 식물체로 재배할 수 있었다 (Fig. 1H).

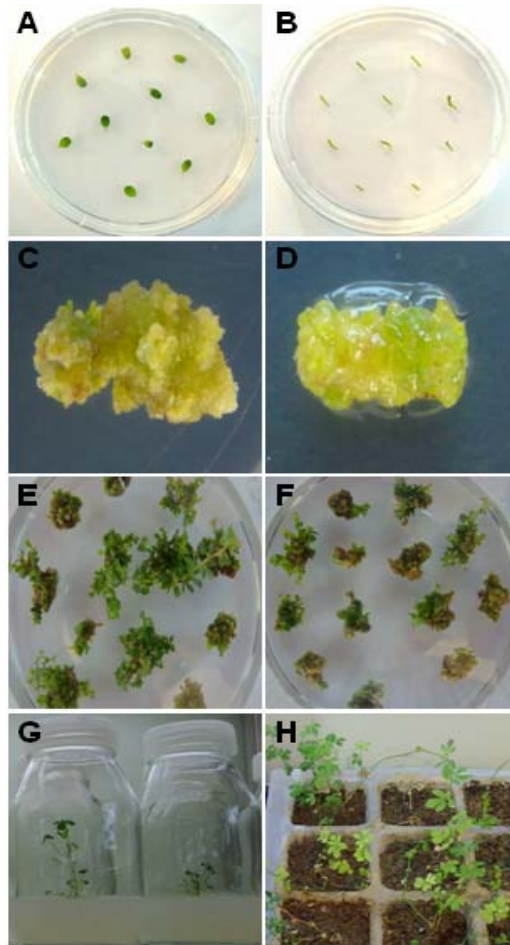


Fig. 1. High-frequency multiple shoot regeneration from leaf and stem explants of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) cv. Empire. A, Leaf explants preparation. B, Stem explants preparation. C, Compact callus derived from leaf explants. D, compact callus derived from stem explant. E, Multiple shoots obtained from leaf explants at the end of initial culture. F, Multiple shoots from stem explants at the end of initial culture. G, Rooted shoots in IBA containing medium. H, Hardened plantlet in plastic pot after 3 weeks.

Table 3. Rate of rooting shoots of birdsfoot trefoil after 3 weeks of culture on rooting medium

Medium ^a	Plant growth regulator (mg/L)	Rate of rooting shoot (%)	
		Leaves	Stems
RM1	0	78.3 ± 1.2	75.0 ± 1.0
RM2	IBA (0.5)	88.3 ± 1.5	91.7 ± 1.2
RM3	IBA (1)	98.3 ± 0.6	93.3 ± 0.6

Mean ± SE of three independent experiments with three replicates.

^aThe basal medium was 1/2 MS medium supplemented with 30 g/L sucrose and 0.8% agar.

IV. 요약

본 연구에서는 버즈풋 트레포일의 Empire 품종을 이용하여 조직 절편체의 종류 및 식물생장조절물질 첨가가 캘러스로부터 식물체 재분화에 미치는 영향을 조사하였다. 각각의 잎과 줄기 절편체를 배지에 치상한 후 배양한 결과, 모든 처리구에서 5-7일 후부터 캘러스 형성이 시작되었다. 캘러스를 유도함에 있어 첨가되는 auxin류로 NAA를 첨가 우수한 결과가 나타났다. 1 mg/L NAA와 1 mg/L BA가 첨가된 CM4 배지에서 잎 절편체 92%, 줄기 절편체 88%로 가장 높게 나타났으며 잎 절편체 배양하는 것이 더 줄기 절편체를 배양하는 것 보다 더 우수한 결과가 나타났다. 캘러스 배양 6주 후 캘러스로부터 shoot이 유도되기 시작하였으며 잎 절편체를 치상하여 배양한 것은 대부분 multiple shoot으로 유도 되었다. 줄기신장 후 뿌리 유도를 위해 2~3 cm 이상 재분화 식물체의 shoot을 절단하여 1 mg/L IBA 첨가된 처리구에서 배양한 결과, 잎 절편체에서 유도된 shoot에서 98.3%, 줄기 절편체에서 유도된 shoot에서 93.3%로 조사되었다. 또한, 캘러스의 형성 없이 직접 뿌리를 내리고 뿌리의 발달도 잘 되었다.

본 연구를 통하여 확립된 재분화 시스템은 분자육종을 통한 신품종 버즈풋 트레포일의 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

V. 인용 문헌

1. Akashi, R., T. Uchiyama, A. Sakamoto, O. Kawamura and F. Hoffmann. 1998. High-frequency embryogenesis from cotyledons of bird's-foot trefoil (*Lotus corniculatus*) and its effective utilization in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. J plant Physiol. 152:84-91.
2. Bettany, A.J.E., S.J. Dalton, E. Timms, B. Manderyck, M.S. Dhanoa and P. Morris. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Festuca arundinacea* (Schreb.) and *Lolium multiflorum* (Lam.). Plant Cell Rep. 21:437-444.
3. Chen, L., C.K. Auh, P. Dowling, J. Bell, F. Chen, A. Hopkins, R.A. Dixon and Z.Y. Wang. 2003. Improved forage digestibility of tall fescue (*Festuca arundinacea*) by transgenic down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. Plant Biotechnol. J. 1:437-449.
4. Cherian, S., M.P. Reddy and R.B. Ferreira. 2006. Transgenic plants with improved dehydration-stress tolerance: progress and future prospects. Biologia plantarum. 50:481-495.
5. Dong, S. and R. Qu. 2005. High efficiency transformation of tall fescue with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Sci.. 168:1453-1458.
6. Doran, P.M. 2000. Foreign protein production in plant tissue cultures. Current Opinion in Biotech. 11:199-204.
7. Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Exp. Cell. Res. 50:151.
8. Hisano, H., A. Kanazawa, A. Kawakami, M. Yoshida, Y. Shimamoto and T. Yamada. 2004.

- Transgenic perennial ryegrass plants expressing wheat fructosyltransferase genes accumulate increased amounts of fructan and acquire increased tolerance on a cellular level to freezing. *Plant Sci.* 167: 861-868.
9. Miller, P.R. and N.J. Ehlke. 2004. Condensed tannin relationships with *in vitro* forage quality analyses for birdsfoot trefoil. *Crop Sci.* 34: 1074-1079.
 10. Montague, A., A. Ziauddin, R. Lee, W.M. Ainley and J. Strommer. 2008. High-efficiency phosphinothricin-based selection for alfalfa transformation. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. DOI 10.1007/s11240-007-9274-8.
 11. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15:473-497.
 12. Sato, H. and T. Takamizo. 2006. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of forage-type perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Grassland Sci.* 52:95-98.
 13. Schmidt, M.A., G.S. Martin, B.J. Artelt and W. A. Parrott. 2004. Increased transgene expression by breeding and selection in white clover. *Crop Sci.* 44:963-967.
 14. Somers, D.A., D.A. Samac and P.M. Olhoft. 2003. Recent advances in legume transformation. *Plant Physiol.* 131:892-899.
 15. Vinocur, B. and A. Altman. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotech.* 16: 123-132.
 16. Voisey, C.R., D.W.R. White, B. Dudas, R.D. Appleby, P.M. Ealing and A.G. Scott. 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of white clover using direct shoot organogenesis. *Plant Cell Rep.* 13: 309-314.
 17. Weeks, J.T., J. Ye and C.M. Rommens. 2008. Development of an *in planta* method for transformation of alfalfa. *Transgenic Res.* 10.1007/s11248-007-9132-9.
 18. Zhang, Y. and M.A. Rouf Mian. 2003. Functional genomics in forage and turf-present status and future prospects. *African J. of Biotech.* 12: 521-527.
- (접수일: 2008년 6월 30일, 수정일 1차: 2008년 8월 22일, 수정일 2차 9월 8일, 게재확정일: 2008년 9월 22일)