

IBA 처리에 의한 버즈풋 트레포일 줄기 절단면에서 뿌리 분화

김기용 · 최기준 · 성병렬 · 임용우 · 임영철 · 장요순 · 김원호

Root Initiation in Cut Birdsfoot trefoil Stems by Treatment of IBA

K. Y. Kim, G. J. Choi, B. R. Sung, Y. W. Rim, Y. C. Lim, Y. S. Jang and W. H. Kim

Abstract

When root initiation ratio of cut Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) stems was examined in several medium conditions containing different IBA concentration, the higher IBA concentration of medium was elucidated superior than lower IBA concentration. Highest root initiation ratio was confirmed at 2.5 mg/ℓ of IBA and the ratio was 90~95%. When the stems from regenerated shoots from callus were treated at 8 kinds of medium for 12 days, the root initiation result was 9 (45%) at 1/2 SH-0 medium, 10 (50%) at SH-0 medium, 10 (50%) at SH-0.5IBA medium, 10 (50%) at SH-1.0IBA medium, 13 (65%) at SH-1.5IBA medium, 14 (70%) at SH-2.0IBA medium, 19 (95%) at SH-2.5IBA medium and 14 (70%) at SH-3.0IBA medium.

(Key words : Birdsfoot trefoil, Root initiation, Plant regeneration)

I. 서 론

버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.)은 1916년에 한국에 처음 도입되었으며, 전국 산야에 흩어져 있는 벌노랑이 (*Lotus corniculatus* var. *japonicus* REGEL.)도 여기에 속하며, 환경적응성이 매우 큰 목초로서 내서성과 내한성이 아주 강하고, 비가 많은 다습한 지역에서도 잘 적응한다. 또한, 배수가 불량한 토양, 건조하고 메마른 땅 또는 산성에서 약알칼리성에 이르는 대부분의 토양에까지 적응하는 능력이 다른 어떤 클로버 종류보다 크다. 단점으로는 재생력이 낮아서 자주 베거나 낮게 베면 재생에 극히 불리하다.

지금까지 세계적으로 버즈풋 트레포일의 육종연

구는 다른 목초나 사료작물에 비해 대단히 미미한 정도이며, 더욱이 외래의 유용유전자를 도입하여 형질전환을 시도한 연구는 Robbins 등 (1998)이 dihydroflavonol reductase의 역서열 (antisense sequences)을 도입해 본 것이 전부이다. 국내에서는 Kim 등 (1999b)이 버즈풋 트레포일 종자로부터 캘러스를 유도하여, BOi2Y 배지에서 식물체를 재분화하는데 성공한 보고가 전부이다. 그 외 콩과식물의 재분화에 관한 연구로는 *Arachis*, *Glycine*, *Mellilotus*, *Vicia* (Phillips와 Collins, 1980), *Trifolium* (Campbell와 Tomas, 1984; Kim 등, 1999a), *Cajanus* (Kumar 등, 1983), *Caronilla* (Mariotti와 Arcioni, 1983), *Phaseolus*, *Stylasanthus* (Meijer, 1982), *Lotus* (Keyes 등, 1980), 그리고 *Medicago* spp. (Saunders

와 Bingham, 1972) 등에 대한 보고가 있다.

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

II. 재료 및 방법

1. 식물재료 및 종자소독

버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.) 품종 중 Empire 품종을 공시하였다. Empire 품종의 종자를 70% 에탄올에서 1분, 0.1% SDS/HgCl₂ 용액에서 15분, 1% NaOCl 용액에서 5분간 소독 한 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 뿌리유도 정도를 조사하기 위해, Kim 등 (1999b)이 버즈풋 트레포일의 재분화에 사용한 동일한 BOi2Y 배지를 이용하여 shoot를 유도하였다. Shoot 유도 시 캘러스 형성 후 2~3회 계대배양하여 증식한 캘러스를 사용하였으며, BOi2Y 배지에서 60일 이상 배양하여 shoot를 유도하였다. 유도된 shoot가 붙어 있는 캘러스를 그대로 2개월 이상 키워 뿌리유도를 위한 식물체재료로 이용하였다.

2. 뿌리 유도를 위한 배지조건

버즈풋 트레포일의 줄기로부터 직접 뿌리를 유도하기 위한 배지로는 Table 1에서 보여주는 바와 같이 SH salt의 양을 절반으로 줄인 배지, SH 기본 배지, 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. 버즈풋 트레포일의 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 Birdsfoot trefoil 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

버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.) 품종 중 Empire 품종의 종자를 살균처리한 다음, 살균한 종자를 SH 배지 (Schenk 와 Hildebrandt, 1972)를 넣은 배양병에 10립씩 파종하여, 28℃에서 배양하므로써 무균상태의 식물체를 얻었다. 식물체는 배양병에서 분얼이 8개 이상씩 되도록 자랐을 때, 줄기부분을 절단하여 실험에 이용하였다. 또한 캘러스에서 shoot를 유도한 것 중에서도 줄기부분을 취하여 함께 처리하였다. 캘러스로부터 얻은 shoot는 Kim 등 (1999b)이 버즈풋 트레포일의 재분화에 사용한 동일한 BOi2Y 배지를 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. 버즈풋 트레포일의 줄기를 잎이 최소 3개 이상씩 포함되도록 절단하여, 16시간의 광조건과 8시간의 암조건으로 처리하였을 때, 7일 이후부터 뿌리가 유도되기 시작하여, 12일이 경과했을 때는 배양병 바닥에 퍼지는 형태로 많이 유도되었다. 표 2는 처리 12일째에 뿌리가 유도되는 정도를 조사한 결과이다.

처리 8일째에 5개의 처리구에서 처음으로 뿌리유도를 확인하였는데, SH-0, SH-0.5IBA, SH-1.0IBA, SH-2.0IBA, SH-2.5IBA 배지조건에서 약간씩의 뿌리 유도를 확인할 수 있었다. 종자를 파종하여 얻은 줄기의 경우에는, 처리 12일째에 1/2 SH-0

배지에서 8개 (40%), SH-0 배지에서 8개 (40%), SH-0.5IBA 배지에서 10개 (50%), SH-1.0IBA 배지에서 11개 (55%), SH-1.5IBA 배지에서 12개 (60%), SH-2.0IBA 배지에서 14개 (70%), SH-2.5IBA 배지에서 18개 (90%), SH-3.0IBA 배지에서 13개 (65%)의 뿌리유도가 확인되어, SH 배지에 2.5 mg/ℓ의 IBA를 첨가한 처리구에서 뿌리 유도 정도가 90%로서 가장 좋았다.

한편, 캘러스로부터 shoot를 유도한 다음 줄기를 취하여 처리한 경우에는, 처리 12일째에 1/2 SH-0 배지에서 9개 (45%), SH-0 배지에서 10 (50%), SH-0.5IBA 배지에서 10개 (50%), SH-1.0IBA 배지에서 10개 (50%), SH-1.5IBA 배지에서 13개 (65%), SH-2.0IBA 배지에서 14개 (70%), SH-2.5IBA 배지에서 19개 (95%), SH-3.0IBA 배지에서 14개 (70%)의 뿌리유도가 확인되어, 역시 SH 배지에 2.5 mg/ℓ의 IBA를 첨가한 처리구에서 뿌리 유도 정도가 95%로서 가장 좋았다.

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

Medium	Root initiation (%) ^a	Root initiation (%) ^b
1/2 SH-0	40	45
SH-0	40	50
SH-0.5IBA	50	50
SH-1.0IBA	55	50
SH-1.5IBA	60	65
SH-2.0IBA	70	70
SH-2.5IBA	90	95
SH-3.0IBA	65	70

a) Grown stems from seeds.
b) Regenerated stems from callus.

종자로부터 얻은 줄기나 캘러스로부터 유도한 줄기 모두에서 뿌리 유도 정도는 비슷하게 나타났으며, SH salt의 양을 절반으로 줄인 1/2 SH-0 배지와 IBA를 첨가하지 않은 SH-0 배지에서도 40% 이상의 뿌리 유도를 나타냈지만, IBA의 첨가량이 많아질수록 뿌리 유도 정도가 높아지다가, 2.5 mg/ℓ의 IBA를 첨가한 처리구에서 뿌리 유도 정도가 가장 좋았으며, 3.0 mg/ℓ의 IBA를 첨가한 처리구까지 실험을 하였지만, IBA 첨가농도가 2.5 mg/ℓ

을 초과할 경우에는 뿌리 유도 정도가 낮을 것으로 예상된다.

Kim 등 (1999b)이 식물체 재분화하는데 이용한 BOi2Y 배지에서도 뿌리 유도를 실시하였지만, SH-2.5IBA 배지조건에서 2배 정도의 효율이 높은 것으로 나타났다. 따라서 버즈풋 트레포일을 재분화하거나, 줄기로부터 뿌리를 유도할 경우에는 IBA를 첨가해 주는 것이 뿌리 유도 효율을 높일 수 있는 것으로 판단되며, 2.5 mg/ℓ의 IBA를 첨가해 줄 때 뿌리 유도 효율이 가장 좋을 것으로 예상된다.

Fig. 1의 A는 2.5mg/ℓ의 IBA를 첨가한 SH-2.5 IBA 배지에서 뿌리를 유도하고 있는 사진이며, Fig. 1의 B는 뿌리가 완전히 유도된 다음, 배양병에서 꺼내어 물로 세척후의 사진이다. 본 실험에서 버즈풋 트레포일의 뿌리 유도 정도를 개선함으로써, 외래의 유용유전자를 도입하여 형질전환 버즈풋 트레포일을 생산할 경우, 식물체 재분화 효율을 월등히 높일 수 있을 것으로 확신한다.

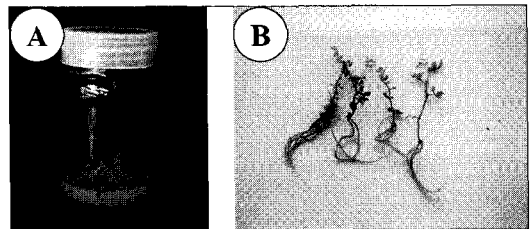


Fig. 1. Root initiation of cutted Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L. cv. Empire) stems. A, Root initiation treatment in SH-2.5IBA medium; B, Root initiated birdsfoot trefoil plant.

IV. 적 요

버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.)의 줄기 부분을 절단하여, SH 배지에 IBA를 첨가한 농도 별로 뿌리 유도 정도를 조사한 결과, IBA 농도가 높을수록 뿌리 유도가 좋았으며, 2.5 mg/ℓ의 IBA를 첨가한 처리구에서 뿌리 유도 정도가 90~95%로서 가장 좋았다. 캘러스로부터 shoot를 유도한 다음 줄기를 취하여 처리한 경우에는, 처리 12일째에 1/2 SH-0 배지에서 9개 (45%), SH-0 배지에서 10 (50%), SH-0.5IBA 배지에서 10개 (50%),

SH-1.0IBA 배지에서 10개 (50%), SH-1.5IBA 배지에서 13개 (65%), SH-2.0IBA 배지에서 14개 (70%), SH-2.5IBA 배지에서 19개 (95%), SH-3.0IBA 배지에서 14개 (70%)의 뿌리유도를 나타내었다.

V. 인 용 문 헌

1. Campbell, 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. 1999a. Callus formation from alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed and plant regeneration from alfalfa calli. *J. Korean Grassl. Sci.* 19(1):23-30.
4. Kim, K.Y., Y.W. Rim, K.J. Choi and B.R. Sung. 1999b. Callus induction from seeds of birdsfoot trefoil and plant regeneration on BOi2Y medium. *J. Korean Grassl. Sci.* 19(4):303-308.
5. 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.
6. Mariotti, D. and S. Arcioni. 1983. Callus cultures of *Coronilla varia* L. plant regeneration through embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 2:103-110.
7. Meijer, E.G.M. 1982. Shoot formation in tissue cultures of three cultivars of the tropical pasture legume *Stylosanthes guyanensis*. *Pflanzenzüchty* 89:169-172.
8. Phillips, G.C. and G.B. Collins. 1980. Somatic embryogenesis from cell suspension cultures of red clover. *Crop Sci.* 20:323-326.
9. Robbins, M.P., A.D. Bavage, C. Strudwicke and P. Morris. 1998. Genetic manipulation of condensed tannins in higher plants. II. Analysis of birdsfoot trefoil plants harboring antisense dihydroflavonol reductase constructs. *Plant Physiol.* 116(3):1133-1144.
10. Saunders, J.W. and E.T. Bingham. 1972. Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Sci.* 12:804-808.
11. 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.