韓草誌 (J. Korean Grassl. Sci.) 24(1) : 21~24, 2004

알팔파 (*Medicago sativa* L.)의 치사온도 결정

김기용 · 강경민 · 성병렬 · 김맹중 · 임용우 · 김원호 · 박근제 · 이병현*

Determination of Heat Killing Temperature of Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

K. Y. Kim, K. M. Kang, B. R. Sung, M. J. Kim, Y. W. Rim, W. H. Kim, G. J. Park and B. H. Lee*

ABSTRACT

To determine lethal temperature of alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Vernal) at heat-stressed conditions, seedlings grown in a small pots for 4 weeks were subjected to different temperature regimes of heat treatment. No apparent demage was observed when the plants were treated at 45, 50 or 60℃ for 1 h. Heat treatments at 60 and 65℃ for 1 h, several plants were withered and showed damage symptom on their leaves. When the plants were exposed to 70℃ for 1 h, most of leaves were severely withered, but it was not lethal conditions for the whole plants. By contrast, most of plants were died within one day after heat treatment at 80℃ for 1h. Furthermore, plants exposed to 80℃ for 50 min were also died within 7 days. It was found that new shoots were regenerated from the plants that had been treated at 80℃ within 45 min. These results indicate that heat treatment at 80℃ for 50 min is an optimum condition to distinguish the lethality of alfalfa plants. Simple viability assay system established in this study will be useful for selection and characterization of heat-tolerant transgenic alfalfa plants.
(**Key words** : 알팔파 (*Medicago sativa* L.), 고온내성, 치사온도, 생육조사)

Ⅰ. 서 론

알팔파 (*Medicago sativa* L.)의 생명공학 관련 연구는 국내 · 외에서 많이 연구되고 있는데, 국내에서는 90년대 후반부터 본격적인 연구가 시작되어 지금까지 여러 논문들이 발표되어 있으며 (Kim 등, 1999; Won 등, 1999; Lee 등, 2000; Son 등, 2001; Kim 등, 2001), 국외에서는 1970년대부터 연구가 시작되어 지금까지 다양한 연구결과가 발표되고 있다 (Saunders 및 Bingham, 1972; Sharp 등, 1980; Ammirato, 1983; Vidakovic 및 Jelaska, 1983; Stuart 및 Strikland, 1984; Brown 및 Atanassov, 1985; Kaul 및 Kochhar, 1985; Chen 및 Thomson, 1987; Litz 및 Gray, 1995). 최근 한국에서는 국가 주도의 '바이오그린21사업'을 추진하면서 벼, 밭작물, 사료작물 및 동물 등의 생명공학 분야 연구에 막대한 예산을 투입하고 있는데, 작물 분야의 연구에서 가장 많은 연구비가 투입되고 있는 것은 재해내성 및 질병 저항성 품종 육성 분야이다. 이러한 연구의 결과물로서 수 년 이후부터 다수의 형질전환 작물들이 개발될 것이고, DNA 수준의 확인뿐만 아니라 실질적인 포장 재배시험에서 확인 작업이 수행되어야 한다. 특히 국내에서 사료작물 생명공학 연구는 겨우 몇 년 전부터 시작되었기 때문에

"이 논문은 바이오그린21사업 연구비 지원에 의하여 수행된 결과임."
축산기술연구소 (National Livestock Research Institute, Suwon 441-350, Korea).
* 경상대학교 동물자원과학부(Division of Animal Sci. & Tech., Gyeongsang Natl. Univ., Jinju 660-701, Korea).
Corresponding author : Ph. D. Ki-Yong Kim, Tel: +82-31-290-1756, Fax: +82-31-290-1775, E-mail: kimky77@rda.go.kr

형질전환 사료작물을 개발하기 위해서는 많은 기초연구들이 동시에 수행되어야만 한다.

본 연구팀은 고온내성 유전자 등을 도입한 신품종 형질전환 사료작물이 개발되었을 경우를 대비하여, 실험실 조건에서 사료작물의 고온내성 정도를 유식물체를 이용하여 간편히 검정할 수 있는 효율적인 검정체계를 확립하고자, 국내에서 많이 재배 이용되고 있는 여러 가지 종류의 사료작물에 대해 치사온도를 결정하는 실험들을 진행하여 왔다. 본 연구에서는 알팔파가 어느 정도의 고온에서 얼마간 처리했을 때 죽게 되는지를 조사하여 정확한 치사온도를 결정하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 공시품종 및 재배

알팔파(*Medicago sativa* L.) 품종 중 "Vernal"을 시험재료로 공시하였으며, 종자를 Petri dish에서 발아시켜 작은 화분에 10 개체씩 이식 후 생장실에서 4주 동안 재배하였다. 생장실의 온도는 20℃로 고정하고, 16시간의 광조건과 8시간의 암조건이 되도록 조절하였다.

2. 열처리 조건

알팔파(Vernal)에 있어서 고온처리에 따른 치사온도를 결정하기 위해, 파종 후 4주령 된 식물체를 준비하였다. 열처리 온도는 45, 50, 55, 60, 65, 70 및 80℃로 7처리를 두었으며, 열처리 시간은 5분부터 60분까지 5분 간격으로 12처리를 두었다. 열처리는 각 온도별로 설정한 배양기에서 처리시간에 맞추어 실시하였으며, 열처리한 식물체는 적정 생육온도에서 배양하면서 생육조사를 실시하였다.

3. 생육조사

각 온도 및 시간별로 열처리한 식물체를 열처리하지 않은 대조구와 함께 적정 생육온도에서 배양하면서, 열처리 후 7일까지 매일 생육조사를 실시하여, 각각의 처리에 따른 식물체의 상태를 육안으로 관찰하는 방법으로 조사하였다. 이 때 처리에 따른 영향을 전혀 받지 않은 정상인 상태를 1로 표시하였으며, 열처리에 의해 식물체가 죽은 상태를 9로 표시하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 45, 50 및 55℃에서 처리시간별 생육상태

파종 후 4주령 된 알팔파 (*Medicago sativa* L.)를 45, 50 및 55℃에서 5분 간격으로 60분까지 처리한 결과, 온도 및 시간에 따른 외관상의 식물체 손상은 거의 없었다. Kim 등 (1997)이 담배(*Nicotiana tabacum* L.)에서 치사온도를 조사했을 때는 50℃에서 15분 이상 처리하면 치사온도에 도달하는 것으로 보고되어 있는데, 알팔파의 경우에는 55℃에서 60분간 처리하였을 때에도, 외관상으로 영향을 거의 받지 않은 것으로 나타났다(Table 1). 45, 50 및 55℃의 온도조건에서 60분까지 처리한 1차 실험에서 치사온도를 결정할 수 없었으므로, 온도를 더 높여 2차 실험을 실시하였다.

2. 60, 65 및 70℃에서 처리시간별 생육상태

알팔파를 60, 65 및 70℃에서 5분 간격으로 60분까지 처리한 결과, 60℃에서 60분간 처리했을 때에 잎이 약간 시든 현상이 있었으나, 식물체 손상은 거의 없는 상태였으며, 65℃에서 60분간 처리했을 때에도 60℃에서 처리한 결과와 마찬가지로 심한 손상은 받지 않았다. 70℃에서 60분간 처리했을 때에는 식물체 일부에서 잎만 약간 마른 현상이 나타났다 (Table 1). 하지만 60, 65 및 70℃의 온도조건에서 60분까지 처리한 2차 실험에서도 치사온도는 결정할 수 없었다. 그래서 온도를 10℃ 더 높여 3차 실험을 실시하였다.

3. 80℃에서 처리시간별 생육상태

Table 1. Effects of high temperature on heat damage of alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants at several temperature

Treatment / Observation (1~9)*	Temperature of heat treatment for 60 min (℃)						
	45	50	55	60	65	70	80
1 day later	1	1	2	2	2	3	8
2 days later	1	1	2	2	2	4	8
3 days later	1	1	2	2	2	4	9
4 days later	1	1	2	3	3	4	9
5 days later	1	1	2	3	3	5	9
6 days later	1	1	2	3	3	5	9
7 days later	1	1	2	3	3	5	9

* Damage index: 1, normal; 9, death

Table 2. Determination of killing temperature of alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Treatment / Observation (1~9)*	Heat treated time at 80℃ (min)											
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
1 day later	2	2	2	5	5	6	6	7	7	8	8	8
2 days later	2	2	3	5	5	6	6	7	7	8	8	8
3 days later	2	2	3	5	6	6	7	7	8	8	9	9
4 days later	2	2	4	6	6	7	7	8	8	9	9	9
5 days later	2	3	4	6	7	7	8	8	8	9	9	9
6 days later	2	3	4	7	7	7	8	8	8	9	9	9
7 days later	2	3	4	7	7	7	8	8	8	9	9	9

* Damage index: 1, normal; 9, death

열처리 온도를 10℃ 더 높여 알팔파를 80℃에서 5분부터 60분까지 5분 간격으로 처리한 결과, 처리 후 1일 이내에 60분 처리에서 거의 죽어가는 현상이 나타났다. 처리 후 3일에는 55 및 60분 처리에서 모두 죽었으며, 처리 후 4일에는 50분 처리에서 모두 죽었고, 처리 후 7일부터는 완전히 죽지 않은 식물체의 경우 새로운 shoot가 재생됨을 확인하였다. 결론적으로 알팔파의 치사온도는 80℃에서 50분 처리하는 것으로 결정되었다 (Table 2). 앞으로 고온내성 및 재해저항성 유전자를 도입한 형질전환 알팔파가 개발될 경우, 1차적으로 실험실 조건에서

Fig. 1. Determination of killing temperature of alfalfa (*Medicago sativa* L.).

고온내성 정도를 조사할 수가 있으며, 이 때 치사온도(80℃에서 50분)보다 조금 약하게 처리하여(80℃에서 40분 또는 45분) 서로 비교할 수 있을 것으로 판단된다.

Fig. 1에서 A는 생장실에서 4주 동안 재배한 상태의 알팔파이며, B는 알팔파를 80℃에서 5분 간격으로 60분까지 처리 7일 후 생육상태이고, C는 80℃에서 50분 처리 후 7일 된 알팔파와 처리하지 않은 알팔파를 촬영한 사진이다.

Ⅳ. 요 약

알팔파(*Medicago sativa* L.)의 치사온도를 결정하기 위하여, "Vernal" 품종을 시험재료로 하여 종자를 Petri dish에서 발아시켜 작은 화분에 10 개체씩 이식, 생장실에서 4주간 재배하였다. 45, 50 및 55℃에서 처리한 경우에는 60분간 처리했을 때에도 거의 식물체 손상이 없었다. 60℃에서 60분간 처리했을 때에는 잎이 약간 시든 듯한 현상이 있었으나 식물체의 손상은 거의 없는 상태였으며, 65℃에서 60분간 처리했을 때에도 60℃에서 처리한 결과와 마찬가지로 심한 손상은 받지 않았다. 70℃에서 60분간 처리했을 때에 알팔파는 일부에서 잎만 조금 마른 현상이 나타났으나, 치사온도에는 도달하지 않았다. 80℃에서 처리한 결과에서는 처리 후 1일 이내에 60분 처리에서 거의 죽어가는 현상이 나타났다. 처리 후 7일에는 50분 처리에서 모두 죽었으며, 45분 이하의 처리에서는 새로운 shoot가 재생됨을 확인하였다. 결론적으로 알팔파의 치사온도는 80℃에서 50분 처리하는 것으로 결정되었다.

Ⅴ. 인 용 문 헌

1. Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis. *In DA* Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (eds). Handbook of Plnt 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., M.S. Chung and J. Jo. 1997. Acquisition of thermotolerance in the transgenic plants with BcHSP17.6 cDNA. J. Korean Grassl. Sci. 17(4):379-386.
7. 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.
8. 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.
9. Litz, R.E. and D.J. Gray. 1995. Somatic embryogenesis for agricultural improvement. World Microbio Biotechnol 11:416-425.
10. Saunders, J.W. and E.T. Bingham. 1972. Production of alfalfa plants from callus tissue. Crop Sci. 12:804-808.
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. Vidacovic, M. and S. Jelaska. 1983. Preservation of gene pool of forest tree species. Genetica 15:369-375.
15. 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.