

## 에틸렌 저해제에 의한 배추 자엽조직의 기내 재분화율 향상

이혜승 · 조화진 · 김병등\*

서울대학교 농업생명과학대학 원예학과

### Enhancement of Shoot Regeneration by Ethylene Inhibitors from Cotyledon Explant of *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*

Hye Seung LEE, Hwa Jin CHO, and Byung-Dong KIM\*

Department of Horticulture, College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon, 441-744.\*Corresponding author.

To improve regeneration efficiency of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (chinese cabbage) in vitro, the effect of ethylene inhibitors [ $\text{AgNO}_3$  and silver thiosulfate (STS)] and optimal age of explants were investigated. On the effect of ethylene inhibitor, either 100  $\mu\text{M}$  of  $\text{AgNO}_3$  or 5  $\mu\text{M}$  of STS enhanced shoot regeneration from cotyledons when it was added in basal shoot induction media (MS salts, B5 vitamins, sucrose 2%, BA 2.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L). But at higher concentrations,  $\text{AgNO}_3$  induced abnormal shoots, and STS greatly reduced regeneration frequency. On the other hand, the maximum regeneration rate was obtained from the cotyledons taken from 3-day old seedlings. However, there was no distinctive effect among the containers used for cultivation. The most optimal condition of root induction was a minimal Murashige and Skoog media containing 0.1 mg/L NAA. In order to induce bolting and flowering from in vitro regenerated chinese cabbage, the plants were treated at 4°C for 4 weeks in a cold chamber. When they were planted in pots, the plants produced phenotypically normal flowers and seeds. The overall results suggest that ethylene inhibitors promote regeneration of shoot from cotyledons of chinese cabbage without alleviating fertility.

**Key words:**  $\text{AgNO}_3$ , chinese cabbage, STS, vernalization

십자화과에 속하는 작물의 기내 재분화 능력은 종에 따라 차이가 있으며 유전적 영향을 크게 받는다. 또한 이들의 재분화율은 절편체의 종류, 배지에 첨가된 식물생장호르몬, 기타 보조첨가물질에 따라 달라진다(Fazekas et al., 1986; Minoru and Orton, 1987). 비록 기내에서의 식물체 재분화가 대부분의 십자화과 작물에서 어느 정도 이루어지고 있으나 우리나라에서 가장 널리 재배되고 있는 배추는 조직배양을 통한 기내 재분화가 다른 십자화과 작물에 비해 어려운 것으로 알려져 왔다.

1971년 Larue에 의해 식물의 기내배양과정에서 에틸렌이 배양체의 생육에 영향을 끼친다는 것이 보고되었고(Larue and Gamborg, 1971), 식물체에 사용 가능한 에틸렌 활성억제제들이 연구되기 시작하면서  $\text{Ag}^+$  이온이 식물체에서 발생하는 에틸렌의 활성억제에 가장 효과적이라는 것이 밝혀

졌다(Beyer, 1976). 이 결과를 바탕으로 에틸렌에 의해 기내 재분화가 억제되는 것으로 생각되는 꽃양배추, 배추, 감자 등의 작물에  $\text{AgNO}_3$ 와 STS를 첨가하여 에틸렌의 활성을 억제함으로써 재분화율 및 형질전환율을 향상시킨 사례가 보고되기 시작하였다(Perl et al., 1988; Sethi et al., 1990; Chi et al., 1991; Chang and Chan, 1991). 배추의 경우 에틸렌의 생성이 기내에서의 기관형성에 영향을 준다는 것이 Lentini에 의해 보고되었고(Lentini et al., 1988), 에틸렌 활성억제제로서  $\text{AgNO}_3$ , AOV 등을 사용하여 자엽이나 상배축으로부터 기내 재분화 식물체를 얻는 데 성공하였다(Chi and Pua, 1989; Chi et al., 1991; Palmer, 1992). 현재는 유전공학의 발달과 함께 식물체의 형질전환을 통한 외부유전자 도입으로 새로운 형질을 갖는 품종의 개발이 활발히 이루어짐에 따라 여러 작물에 대한 다양한 재분화 기술이 요구되고 있

다. 특히 *Agrobacterium*을 이용한 작물의 형질전환을 효과적으로 작물의 품종개량에 이용하기 위해서는 일차적으로 재분화율이 높은 조직배양기술이 선행되어야 하며, 식물체 재분화를 위한 과정이 단순하고, 단시일에 많은 식물체를 얻는 기술이 확립되어야 한다. 따라서 본 실험에서는 배추의 형질전환을 위한 전 단계로서 이미 보고한 배추의 재분화 조건을 기반으로(Hachey et al., 1991; Kim et al., 1991) 에틸렌 활성 억제제인  $AgNO_3$ 와 STS를 농도별로 배지에 첨가하여 그 효과를 알아보고, 치상 재료로 사용된 배추자엽의 연령 및 배양용기의 차이에 따른 재분화율을 비교하여 배추에 있어 가장 적절한 재분화 조건을 구명하고자 하였다. 이와 함께 재분화된 식물체의 뿌리유기조건을 알아보고, 순화된 재분화식물체를 춘화처리함으로써 추대를 유도하여 임성을 갖는 식물체를 얻어 배추의 형질전환을 위한 기내 배양 및 순화, 춘화처리 조건을 확립하고자 하였다.

**재료 및 방법**

**식물체 재료**

배추종자는 F1 시판종 '장미' (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv Jang Mi)를 사용하였다. 배추종자를 1.5% sodium hypochlorite로 15분 동안 소독한 뒤 멸균수로 5-6회 잘 씻어 주고 1회용 페트리디시의 발아용배지(MS salts, MS vitamine, sucrose 3%, agar powder 0.8%, pH 5.8)에 25개씩 치상하였다. 치상한 종자는 2500 lx, 25°C, 상대습도 40-50%, 16시간 명/8시간 암 상태로, 처리에 따라 3-6일 동안 배양하여 발아시키고 엽병이 1-2 mm 포함된 상태로 자엽을 절단하여 치상재료로 사용하였다.

**에틸렌 활성억제제를 이용한 배추의 재분화**

배추 기내재분화에 대한  $AgNO_3$ 와 STS의 농도별 효과를 알아보기 위하여 기본 재분화 배지(MS salts, B5 vitamine, sucrose 2%, Bacto agar 0.8%, BA 2.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L, pH 5.8)에  $AgNO_3$ 와 STS를 0, 1, 5, 25, 100 M씩 단독처리로 첨가하여 파종 후 5일 경과한 자엽을 성장점이 제거된 상태로 엽병이 약 2 mm 포함되게 잘라서 삼각플라스크에 10개씩 치상하였다. 동일한 실험을 3 반복으로 수행하였으며 배양조건은 27 ± 2°C, 1,500-2,000 lx, 상대습도 40-50%로 하였고 3주 후에 계대배양한 다음 치상 6주 후에 싹이 나온 자엽을 조사하여 재분화율을 구하였다.

**자엽의 연령 및 배양용기의 효과**

배추 기내재분화에 미치는 자엽의 연령과 배양 중에 사용

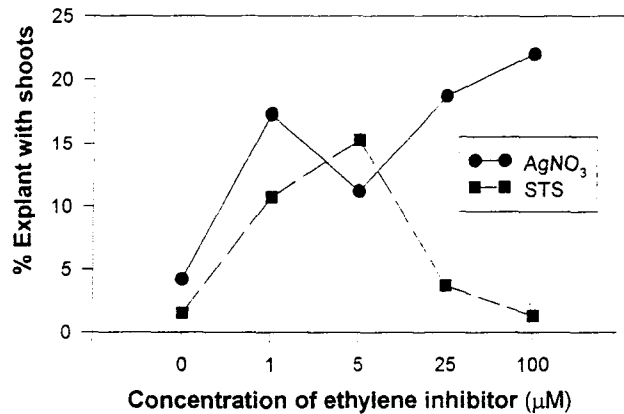
되는 용기별 효과를 알아 보기 위하여 파종 후 3, 4, 5, 6일 지난 유포로부터 자엽을 채취하여 신초유기배지(MS salts, B5 vitamine, sucrose 2%, BA 2.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L,  $AgNO_3$  30 μM, pH 5.8)에 위와 동일한 방법으로 실험을 수행하였다. 또한 유리병(지름 83 mm, 높이 10 cm), 100 mL 삼각플라스크, 1회용 페트리디시(지름 83 mm)로 용기를 달리하여 파종 후 3.5일 지난 자엽을 사용하여 3 반복으로 실험을 수행하였다.

**뿌리유기 및 춘화처리**

기내에서 유기된 싹으로부터 뿌리를 유기하기 위한 적정 조건을 구명하기 위하여 생장조절제가 포함되지 않은 기본 배지(MS salt, B5 vitamine, sucrose 2%, pH 5.8)와 NAA(0.1, 0.5, 2.0 mg/L), IAA(0.1, 0.5, 2.0 mg/L), IBA(0.1, 0.5, 2.0 mg/L), kinetin(0.1, 0.5, 2.0 mg/L)이 각각 포함된 배지를 이용하여 치상 6주 후에 유기된 싹을 재료로 하여 실험을 수행하였다. 배양조건은 위와 동일하게 하였다. 또한 완전히 재분화된 식물체를 4주간 4°C에서 처리한 후 온실로 옮겨 추대를 유도하였다.

**결과 및 고찰**

$AgNO_3$ 의 처리농도에 따른 재분화율은  $AgNO_3$  무처리구에 비해 1 μM에서 100 μM까지 단계적으로 처리하였을 때 배추자엽으로부터의 싹재분화율이 3배에서 최고 6배까지 증가되었다(Figure 1).  $AgNO_3$  농도가 5, 25, 100 μM로 증가



**Figure 1.** Effect of ethylene inhibitors ( $AgNO_3$  and STS) on shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*. This experiment was performed by using 5-day old cotyledons.  $AgNO_3$  or STS was added to the media after autoclaving. Each value was average of three replicates. Each treatment consisted of 50 cotyledon explants. The total number of explants with shoots was scored after 6 weeks.

함에 따라 처리간에 유의성은 없었으며 농도가 증가함에 따라 재분화되는 신초가 비정상적인 형태를 나타내었다. STS의 경우는 5  $\mu$ M에서 가장 높은 재분화율을 보였으며 25  $\mu$ M과 100  $\mu$ M이 첨가되었을 경우에는 재분화율이 현저히 낮아졌다(Figure 1). AgNO<sub>3</sub>와 STS를 비교해 보았을 때 AgNO<sub>3</sub>는 고농도에서 신초의 유기와 절편체당 유기되는 신초의 수를 증가시키는 효과가 있으나 비정상적인 형태의 신초가 대부분으로 실제 이용에는 1-25  $\mu$ M 농도로 첨가되는 것이 가장 적당할 것으로 생각되었다. STS는 농도 증가에 따라 AgNO<sub>3</sub>의 경우와 같은 비정상적인 신초의 출현은 없으나 재분화율이 현저히 감소되어 100  $\mu$ M이 첨가된 경우에는 무처리보다 더 낮은 재분화율을 보였다. 따라서 실제 배지에 첨가되는 STS의 농도는 5  $\mu$ M이 적정하며 이 농도에서 좀 더 정상적인 형태를 갖는 신초를 얻을 수 있을 것으로 생각되었다. 앞선 AgNO<sub>3</sub>와 STS의 농도에 따른 재분화율 비교실험은 모두 기내파종 후 5일이 경과된 배추유묘에서 자엽을 채취하여 사용하였고, 여기서 얻어진 결과를 바탕으로 배추자엽의 채취시기에 대한 재분화율의 변화를 알아 보았다. 에틸렌 활성억제제로써 STS를 5  $\mu$ M로 고정하고, 파종 후 서로 다른 시기에 자엽을 채취하여 자엽의 연령에 따른 재분화율을 조사하였을 때 파종 후 3일된 유묘로부터 채취한 자엽에서 가장 높은 재분화율을 보였고, 유묘의 연령이 많아질수록 재분화율은 낮아졌다(Figure 2). 그러나 파종 후 3일된 배추의 유묘는 성장점과 자엽이 가까이 붙어 있어 성장점이 배제된 상태의 자엽을 얻기 힘들며 따라서 이와 유사한 재분화율을 갖는 3.5일(78  $\pm$  4 hr)된 자엽이 배추자엽으로부터의 신초유기에 가장 적절한 것으로 생각되었다. 배추의 기내 재분화에 있어 배지를 제외한 배양용기내의 공간이 재분화에 미치는 영향을 알아보기 위해 유리병(용적 700 mL), 삼각플라스크(용적 150 mL), 1회

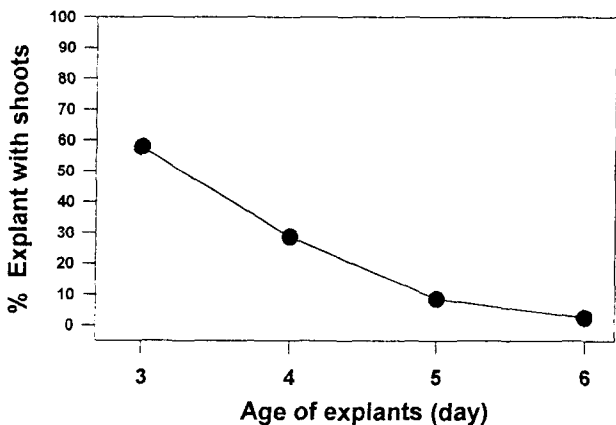


Figure 2. Effect of age of cotyledons on regeneration from *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*. The media was supplemented with 5  $\mu$ M STS as an ethylene inhibitor. Each value was average of three replicates. Each treatment consisted of 50 cotyledon explants. The total number of explants with shoots was scored after 6 weeks.

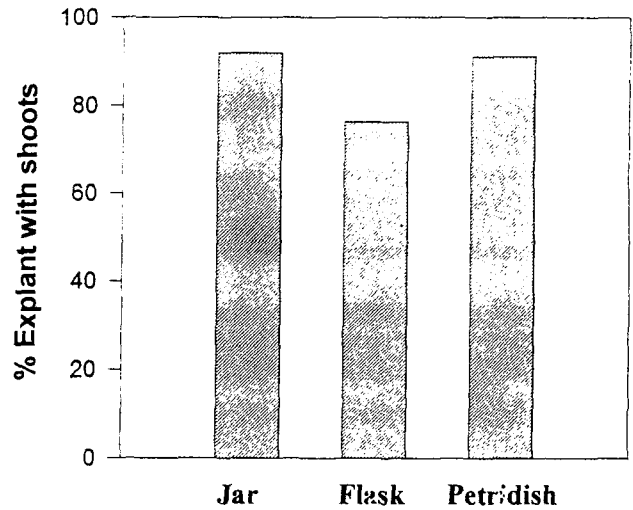


Figure 3. Effect of container on regeneration from cotyledon of *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*. The jar was made of glass and the petridish was disposable plastic. Explants were 3.5-day old cotyledons. The media was supplemented with 5  $\mu$ M STS. Each value was average of three replicates. Each treatment consisted of 50 cotyledon explants. The total number of explants with shoots was scored after 6 weeks.

용 페트리디쉬(용적 70 mL)를 이용하여 용기별 재분화율을 알아 보았다. 그 결과 1회용 페트리디쉬가 가장 높은 재분화율을 보였으나 각 용기별 유의성은 나타나지 않았다(Figure 3). 재분화된 신초로부터의 뿌리유기조건은 NAA가 0.1 mg/L 농도로 첨가된 배지에서 뿌리형성이 그 형태 및 밀도, 활력에서 가장 우수하였으며 IAA 0.1 mg/L, kinetin

Table 1. Rooting response to growth regulators and its concentrations of cotyledons from *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*.

Hormone	Concentration (mg/L)	Total scored	Rooted	Root vigor <sup>a</sup>
NAA	0.1	6	6	*****
	0.5	6	5	***
	2.0	5	3	*
IAA	0.1	5	4	****
	0.5	3	1	**
	2.0	3	1	**
IBA	0.1	4	1	***
	0.5	3	1	**
	2.0	1	0	*
Kinetin	0.1	4	3	***
	0.5	3	2	****
	2.0	4	1	*
Hormone free		5	5	****

a \*: weak ~ \*\*\*\*\*: most vigorous.



Figure 4. Regenerated whole plant from cotyledones of chinese cabbage. A) On the left plant was treated at 4°C for 4 weeks and on the right not. Cold treated plant produced normal flowers and pods. B) Close-up of the chinese cabbage inflorescence.

0.5 mg/L, 기본배지도 우수하였다(Table 1). 반면 처리한 모든 auxin 계통의 호르몬(NAA, IAA, IBA)에서 고농도일 때는 뿌리형성이 되지 않거나 극히 미비하였다. 기내에서 배추자엽을 절편체로 하여 재분화를 유도한 앞선 실험에서 종합적으로 80-90%의 재분화율을 얻었으나 유기되는 대부분의 신초의 줄기가 짧아 뿌리유기를 위해 신초를 절단하는 경우 작업이 수월하지 않을 뿐만 아니라 뿌리유기배지에서 뿌리를 유도하지 못하고 죽어 버리는 경우가 많았다. 이러한 문제를 해결해 보고자 신초유기배지에 GA를 각각 0.01, 0.1, 0.5, 2.0 mg씩 처리하여 실험을 수행하였다. 그 결과 유기된 신초의 줄기신장을 유도하는 효과는 없었으며 오히려 무처리구와 비교하였을 때 신초유기율을 저하시켜 0.5 mg과 2.0 mg이 첨가된 처리구에서는 거의 신초유기가 안되는 것을 볼 수 있었다. 또한 STS 제거시기에 따른 재분화율의 변화를 보았을 때 치상 후 28일 후에 배지에서 STS를 제거해 주는 것이 계속적으로 STS가 첨가된 배지에서 배양하는 것보다 2배 정도 높은 재분화율을 나타내었다. 위의 조직배양과정에서 얻은 기내식물체를 순화하는 과정에서 추대를 유도하여 종자를 얻기 위해 뿌리가 완전히 유기된

식물체 일부를 4°C에서 4주간 저온처리한 결과 무처리구와 달리 저온처리구에서는 온실로 옮긴 후 15일이 경과되었을 때 생식생장으로의 전환을 관찰할 수 있었고 화기의 구조는 외형적으로 정상이었으며 이로부터 종자를 얻을 수 있었다(Figure 4).

### 적 요

배추의 기내재분화율을 향상시키기 위하여 자엽을 치상 재료로 하여 에틸렌 억제제인 AgNO<sub>3</sub>와 STS를 첨가하여 그 영향을 조사하였다. AgNO<sub>3</sub>의 경우에는 100 μM이 첨가되었을 때, STS에서는 5 μM이 첨가되었을 때, 무처리구의 4%, 2%에 비해 각각 가장 높은 22%와 15.3%의 재분화율을 보였다. 자엽연령에 대해서는 파종 후 3일 지난 자엽을 사용하였을 때 58%의 재분화율을 나타내었다. 배양용기에 따른 효과는 1회용 페트리디쉬에서 가장 높았으나 처리간에 뚜렷한 차이는 없었다. 뿌리유기 조건은 성장조절제가 포함되지 않은 처리와 NAA가 0.1 mg/L 농도로 첨가된 배지에서 가장 좋은 결과를 얻었으며 그 형태 및 밀도, 활력에서 가장 우수하였다. 기내에서 뿌리가 형성된 식물체를 4°C에서 4주간 처리하여 추대를 유기하였고 형태적으로 정상적인 화기를 볼 수 있었으며 이들로부터 종자를 얻을 수 있었다.

### 인용문헌

Beyer EM, Jr (1976) A Potent Inhibitor of Ethylene Action in Plants. *Plant Physiol* 58: 268 - 271

Chang HH, Chan MT (1991) Improvement of potato (*Solanum tuberosum* L.) transformation efficiency by *Agrobacterium* in the presence of silver thiosulfate. *Bot Bull Academia Sinica* 32: 63 - 70

Chi GL, Pua EC (1989) Ethylene inhibitor enhanced de novo shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* (chinese cabbage) in vitro. *Plant Science* 64: 243 - 250

Chi GL, Pua EC, Goh CJ (1991) Role of Ethylene on de Novo Shoot Regeneration from Cotyledonary Explants of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson in vitro. *Plant Physiol* 96: 178 - 183

Fazekas GA, Sedmach PA, Palmer MV (1986) Genetic and environmental effects on in vitro shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica juncea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 6: 177 - 180

Hachey JE, Sharma KK, Moloney MM (1991) Efficient shoot regeneration of *Brassica campestris* using cotyledon explants cultured in vitro. *Plant Cell Reports* 9: 549 - 554

Kim BD, Kim SJ, Cho HJ (1991) Study of transformation technique for *Brassica* species. *Res Rept RDA (Agri. Institutional Cooperation)* 34:

266 - 272

**Larue TAG, Gamborg OL** (1971) Ethylene Production by Plant Cell Cultures. *Plant Physiol* 48:394 - 398

**Lentini Z, Mussell H, Mutschler MA, Earle ED** (1988) Ethylene generation and reversal of ethylene effects during development in vitro of rapid -cycling *Brassica campestris* L. *Plant Science* 54: 75 - 81

**Minoru M, Orton TJ** (1987) Callus initiation and regeneration capacities in *Brassica* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 11: 111 - 123

**Palmer CE** (1992) Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate. *Plant Cell Reports* 11: 541 - 545

**Perl A, Aviv D, Galun E** (1988) Ethylene and in vitro culture of potato: suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, plating efficiency and transient expression of an alien gene. *Plant Cell Reports* 7: 403 - 406

**Sethi U, Basu A, Sipra GM** (1990) Control of cell proliferation and differentiation by modulators of ethylene biosynthesis and action in *Brassica hypocotyl* explants. *Plant Science* 69: 225 - 229

(1995년 9월 18일 접수)