

器内培養에서 2,4-D 및 NAA處理와 繼代培養回數에 따른 딸기의 RAPD Band 變化

沈載成, 鄭海駿, 閔炳訓
培材大學校 園藝學科

Change in the RAPD Band of Strawberry Depending on 2,4-D and NAA Treatment and the Number of Subcultures In Vitro

Jai-Sung Shim, Hae-Joon Chung, Byung-Hoon Min
Dept. of Horticulture, Pai-Chai University Taejon 302-735, Korea

딸기의 3품종을 엽과 엽병을 배양한 결과 2,4-D + BA 처리에서는 치밀한 캘러스가 유기되었고 이 캘러스로부터 다수의 신초가 분화되었으며 NAA + BA 처리에서는 부취지기 쉬운 캘러스가 유기되었다. '수홍' 엽조직을 NAA나 2,4-D가 첨가된 배지에서 8개월간 배양하면 212번 primer에서 생산된 RAPD band가 모본 band와는 상이하게 나타났다. '보교'와 '여봉'의 엽에서 유기된 캘러스를 2,4-D가 첨가된 액체배지에 계대배양회수를 달리하여 배양하였을 때 12회 계대배양에서 모본과 상이한 RAPD band가 출현되었다.

The 2,4-D + BA combination in MS medium showed high regenerating ability and induced compact callus from leaf and petiole segments of three strawberry cultivars, 'Bokyo', 'Yeobong' and 'Suhong', whereas the NAA + BA combination resulted in friable callus. Band of RAPD products obtained with primer 212 from the callus was different from the band of mother plant when callus induced from leaf segment of 'Suhong' cultivar was maintained in MS medium containing NAA or BA for 8 months. The RAPD bands obtained from mother plants of 'Bokyo' and 'Yeobong' were different from that of callus maintained in the presence of MS liquid medium containing 2,4-D(0.2mg/ℓ) subcultured every two weeks for 6 months(12 subcultures).

Key words : Strawberry, RAPD, Subculture, Plant Growth Regulator

I. 서론

1993년도 딸기 재배면적은 7.296 ha로서 육성 및 반육성으로 많이 재배되고 있으며 소득성 및 노동생산성이 높아 국내농가에서 중요한 작물로 취급되고 있으나 농가에서 재배되고 있는 딸기는 대부분 virus에 감염된 묘를 이용하여 재배되고 있는 실정으로 이러한 문제점을 해결하기 위하여 기내배양을 이용한 無病株를 생산하고 신품종을

육성하려는 연구들이 수행되고 있다. 그러나 無病한 우량개체로부터 이를 대량증식하여 상업적 목적으로 실제 종묘산업에 도입하거나 농가에 보급하기 위한 기내배양의 체계확립에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이다.

기내배양이 실제 종묘산업에 이용되기 위해서는 수량적인 大量增殖의 체계확립 뿐만 아니라 질적인 증식의 體系確立이 필요하다. 즉, 대량증식하고자 하는 식물체(母本)와 기내배양을 통하여 생

산된 식물체와의 遺傳性的 同一性 與否, 재배과정 중 발생하는 변이의 出現頻度와 식물체의 活力 등에 관한 체계확립이 중요하다. 이러한 연구의 일환으로 Priydarshi와 Sen⁵⁾은 대량증식 후에 유전성의 동일성 여부를 판단하기 위하여 염색체의 수와 형태적인 변화를 분석하였으며 Jemmal^{2,4)} 등은 계대배양 回數에 따른 花數, 生體重 등의 변화와 peroxidase의 활성 등을 연구한 바 있다.

그러나 식물유전자의 작은 부분의 변화는 염색체의 형태적인 변화를 크게 유기시키지 않을 것으로 판단되며 동위효소의 변화는 식물체의 연령, 부위, 배양시기(발육상태) 등에 따라 차이가 있으며 실제 종묘산업에 적용하여 marker로서 활용하는 데는 많은 문제점이 있다고 판단된다. 최근 분자생물학의 발전과 더불어 특정 DNA부분을 빠른 시간내에 증폭할 수 있는 Polymerase Chain Reaction 기술과 random primer를 이용하는 Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 기술을 이용하여 특정 유전자의 변화를 인지할 수 있는 marker^{3,6)}를 찾아낸다면 유전성의 동일성 여부를 빠른 시간내에 기내에서 확인할 수 있어 대량증식 기술개발을 효과적으로 수행할 수 있다고 판단된다.

따라서 본 연구는 대량증식의 체계적인 연구의 일환으로 딸기의 성장점, 엽 및 엽병배양을 실시하였고 성장조절제나 계대배양 회수에 따라서 식물체에 발현되는 형질의 변화를 인지할 수 있는 RAPD marker를 탐색하여 대량증식의 한계성을 구명하고 체계적인 대량증식의 기술을 확립하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

본 실험의 재료는 '보교조생', '수홍', '여봉'의 3개 품종의 딸기를 공시하여 7월에 발생된 포복경에서 성장점, 엽, 엽병을 채취하여 배양재료로 이용하였다.

각각의 품종을 흐르는 물로 충분히 씻어내고 70% 에탄올에 순간 침지한 다음 멸균수로 수세한 후 1%의 sodium hypochlorite용액에 Tween 20을 소량 첨가하여 15분간 표면살균한 후 멸균수로 4회 세척하였다. 성장점은 0.2-0.3mm 크기로 하여서 배양하였다.

MS 배지(pH 5.7)를 이용하였고 성장조절물질은 indole acetic acid (IAA), α -naphthalene

acetic acid(NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)와 6-benzylamino purine(BA)을 이용하였다. 치상한 재료는 25°C 배양실에서 일장을 16시간으로 하여 배양하였다.

실험1. 딸기의 성장점, 엽, 엽병배양

上記 3品種의 성장점을 IAA 1.0 mg/l와 BA 1.0 mg/l가 혼용처리된 MS 배지에 test tube 당 1개체씩 치상하여 한 품종당 10개씩의 성장점을 치상하여 4반복을 하였다. 엽과 엽병의 절편체를 이용한 배양에서는 BA농도를 0.2 및 0.5 mg/l로 고정하고 NAA 농도는 0.2, 0.5 및 1.0 mg/l로 하였고 2,4-D 농도는 0.1, 0.2, 0.5 mg/l로 하여 BA와 NAA, BA와 2,4-D를 상호조합 처리하였다. 그리고 이들을 각 처리당 10개체씩 3반복으로 하여 삼각플라스크에 치상하였다. 또한 엽과 엽병에서 유기된 캘루스를 동일배지에서 4주 후에 계대배양하여 캘루스 생체중과 신초의 분화수를 조사하였다.

실험 2. 식물성장조절제 및 계대배양 회수에 따른 RAPD band 양상

NAA 0.5 mg/l + BA 0.2 mg/l와 2,4-D 0.2 mg/l + BA 0.2 mg/l의 농도에 엽조직을 MS 고체배지에 치상하여 4주마다 동일 배지에서 계대배양 하였다. 배양 8개월후 분화된 식물체의 엽조직에서 total DNA를 추출하여 PCR를 행한 후 모식물체와 banding pattern을 비교 분석하였다. 또한 2,4-D와 BA를 각각 0.2 mg/l씩 복합 처리된 MS 고체배지에 엽조직을 치상하여 유기된 callus를 동일한 액체배지에 2주마다 계대배양하여 8회와 12회 계대배양된 callus에서 total DNA를 추출하여 PCR를 행한 후 모식물체와 banding pattern을 비교 분석하였다.

Table 1. Designated identification number and the sequence of 10-mer primers.

Primer No.	Sequence
212	5'-GCTGCGTGAC-3'
224	5'-TCTCCGGTAT-3'
253	5'-CCGTGCAGTA-3'

PCR에 사용된 10mer 임의 primers는 University of British Columbia(UBC)에서 구입한 200개의 primer를 이용하여 이중 재현성이 있고 품종간에 동일한 banding pattern을 나타내는 211, 224, 253번 primer를 이용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 딸기의 성장점, 엽 및 엽병 배양

‘보교’, ‘수홍’, ‘여봉’의 포복경에서 성장점과 엽 및 엽병을 배양하여 캘러스의 생체중과 신초수를 조사한 결과는 표 2, 3, 4와 같다.

성장점으로 부터 분화된 신초의 수는 ‘보교’에서 12.8개, ‘수홍’은 9.1개 ‘여봉’은 3.0개로 품종간에 현저한 차이를 보이고 있다(표 2). ‘여봉’은 ‘보교’와 ‘수홍’에 비하여 성장점의 생존율도 크게 낮았으며 분화된 신초의 수도 가장 적었다.

Table 2. The number of shoots regenerated from shoot tip of strawberry.

Plant growth regulator (mg/l)	Cultivar		
	Bokyo	Suhong	Yeobong
IAA 1.0 + BA 1.0	12.8±5.58 ^z	9.1±1.69	3.0±1.0

^z : Standard error.

葉의 切片體로 부터 캘러스는 모두 유기되었으며 생존율도 양호하였다. NAA처리구에서는 ‘보교’와 ‘여봉’은 NAA 0.2 mg/l + 0.5 mg/l 처리에서 캘러스의 생체중이 가장 무거웠으나 ‘수홍’은 NAA 1.0 mg/l + BA 0.5 mg/l에서 가장 무거웠다(표 3). 2,4-D 처리구에서는 2,4-D 0.1 mg/l + BA 0.2 mg/l 처리에서 ‘여봉’의 캘러스중이 높았고 2,4-D의 농도가 0.2 mg/l 와 0.5 mg/l 로 높아지면 각각 ‘수홍’과 ‘보교’의 캘러스중이 높게 나타났다. 葉배양에서 신초의 분화는 2,4-D 0.1 mg/l + BA 0.2 mg/l 처리에서만 유기되었다. ‘보교’와 ‘수홍’ 절편체당 각각 7개와 9개씩의 신초가 분화되었으며 ‘여봉’에서는 2개의 신초가 분화되었다.

Table 3. The fresh weight of callus and number of shoot formed from leaf segments of strawberry as influenced by plant regulators for 7 weeks.

Plant growth regulators (mg/l)			Cultivar		
NAA	2,4-D	BA	Bokyo	Suhong	Yeobong
Callus fresh weight (g/explant)					
0.2		0.5	0.40±0.13 ^z	0.29±0.05	0.47±0.12
0.5		0.5	0.24±0.04	0.50±0.04	0.35±0.14
1.0		0.5	0.20±0.03	0.54±0.06	0.26±0.09
	0.1	0.2	0.25±0.03	0.40±0.02	0.31±0.03
	0.2	0.2	0.31±0.02	0.60±0.08	0.28±0.01
	0.5	0.2	0.33±0.09	0.53±0.11	0.21±0.02
Number of shoots ^y					
	0.1	0.2	7	9	2

^z : Standard error.

^y : Number of shoots regenerated from of leaf segments of strawberry on MS medium.

Table 4. The fresh weight of callus and number of shoot formed from petiole segments of strawberry as influenced by plant regulators for 7 weeks.

Plant growth regulators (mg/l)			Cultivar		
NAA	2,4-D	BA	Bokyo	Suhong	Yeobong
Callus fresh weight (g/explant)					
0.2		0.5	0.49±0.11 ^z	0.33±0.09	0.04±0.01
0.5		0.5	- ^y	0.32±0.04	0.04±0.00
1.0		0.5	-	0.33±0.02	0.05±0.01
	0.1	0.2	0.11±0.03	0.17±0.02	0.05±0.00
	0.2	0.2	0.16±0.00	0.15±0.02	0.07±0.01
	0.5	0.2	0.14±0.01	0.22±0.01	0.06±0.01
Number of shoots ^x					
	0.1	0.2	3	5	0
	0.2	0.2	7	0	0

^z : Standard error.

^y : No data collected.

^x : Number of shoots regenerated from petiole segments of strawberry on MS medium.

엽병배양에서도 캘러스의 생체중은 葉배양에서와 유사하게 나타났다(표4). 신초의 분화도 葉배양에서와 유사하여 2,4-D 0.2 mg/l + BA 0.2 mg/l 처리에서만 shoot가 유기되었으나 葉배양에서와는 다르게 '여봉'에서는 신초가 유기되지 않았다.

계대배양된 캘러스는 전반적으로 2,4-D보다 NAA가 첨가된 처리구에서 캘러스 증식이 더 잘 되었으며 2,4-D가 첨가된 처리구에서는 치밀한 캘러스와 신초의 分化가 이루어지고 NAA가 첨가된 처리구에서는 부쉬지기 쉬운 캘러스의 증식이 이루어지는 경향이였다. Bios¹⁾는 NAA + BA 혼합처리구에서는 치밀한 캘러스와 신초가 分化되었고 2,4-D + BA 혼합처리구에서는 부쉬지기 쉬운 캘러스가 증식되었다고 보고하여 본 실험의 결과와는 상반되었다.

2. 식물생장조절제 및 계대배양 회수에 따른 RAPD band 양상

그림 1a는 대조구로서 3개 품종의 성장점으로 부터 유기된 신초의 엽조직을 대상으로 PCR를 수행한 결과 3개의 primer에서 6개의 polymorphic band를 얻었다.

그림 1a의 대조구에서는 212번 primer에서 발현된 band가 500bp 부근에 한 개의 band가 출현되었으나 '수홍'의 NAA 처리구(그림 2b)에서는 이 band가 출현되지 않았다. 또한 2,4-D 처리구에서도 500bp와 1700bp 사이에서 2개의 band만이 출현되어 대조구와는 차이가 있었다. 이러한 결과는 NAA와 2,4-D가 함유된 배지에 오렌기간 동안 배양을 하였기 때문에 total DNA의 염기배열 중 일부가 대조구와는 다른 것으로 추정된다. 그러나 좀더 자세한 연구를 수행하기 위하여 NAA나 2,4-D가 첨가된 배지에서 생산된 shoot를 포장재배하여 후기의 생육과도 비교하여 볼 필요성이 있다 하겠다.

'보교'(그림 2c)와 '여봉'(그림 2d)에서는 224번 primer에서 생산된 RAPD band를 대조구와 비교하여 보면 8회 계대배양에서는 대조구와 동일하였으나 12회 계대배양에서는 1,700bp에 새로운 band가 출현되어 대조구와는 차이가 있었다. 2,4-D를 사용한 액체 배지에서 (그림 2e) 8회(희석 배수로는 10배)와 12회(희석배수 100배) 계대배양된 수홍의 캘러스로부터 생산된 RAPD band는 다소 희미한 band가 있기는 하나 동일한 banding pattern를 나타내었다. 즉, '수홍'은 12

회의 계대배양에서도 모본과 동일한 RAPD banding pattern을 나타내었으나 '여봉'과 '보교'는 8회 계대배양에서만 동일한 banding pattern을 나타내었다.

이상의 결과에서 '보교'와 '여봉'에서는 224번 primer를 marker로 이용하여 total DNA의 염기배열이 변하는 것을 쉽게 판별할 수 있어 상업적인 대량증식을 수행할 때 효율적으로 변이주를 미리 제거하여 종묘사고를 미연에 방지하는 것이 가능할 것으로 추정되나 이에 관해서는 좀 더 연구가 이루어져야 할 것이다.

조직배양으로 생산된 식물체는 절편체의 종류, 배지에 첨가되는 성장조절제 등에 따라 착과가 지연되거나 과일이 작아지는 경향이 있으며 염색체의 수도 변화된다. 특히 배지에 첨가되는 2,4-D는 체세포변이를 유기시킨다고 보고되고 있다. Jemmal²⁾은 딸기를 조직배양하면 계대배양 회수에 따라 엽병이 짧아지거나 뿌리발육이 늦고 peroxidase activity등이 변화한다고 보고한 바 있으며 Kinet와 Parmentier⁴⁾는 계대배양 회수가 증가되면 꽃의 크기가 작아지고 꽃의 수가 많아진다고 보고한 바 있다. 본 실험에서 조직배양에서 생산된 유식물체 또는 캘러스의 계대배양 회수에 따라 모본과의 RAPD band가 차이가 있었다. 이러한 결과를 이들의 보고와 비교하여 볼 때 본 실험에서 생산된 식물체나 캘러스도 계대배양의 회수나 성장조절제에 영향을 받아 total DNA의 염기배열 중 일부가 변화되었던 것으로 추정할 수 있었다. 그러나 본 연구에서는 기내에서 생산된 신초는 모본과의 형태적인 차이는 없었으나 포장재배 후의 생육은 조사하지 않아서 이에대한 좀더 세밀한 연구가 필요하다 하겠다.

감사의 글

이 논문은 95년도 배재대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 수행된 연구의 일부로 이에 감사드립니다.

V. 참고문헌

1. Bois, F. 1992. The influence of some natural cell-wall derived precursors on organogenesis and differentiation of wild strawberry

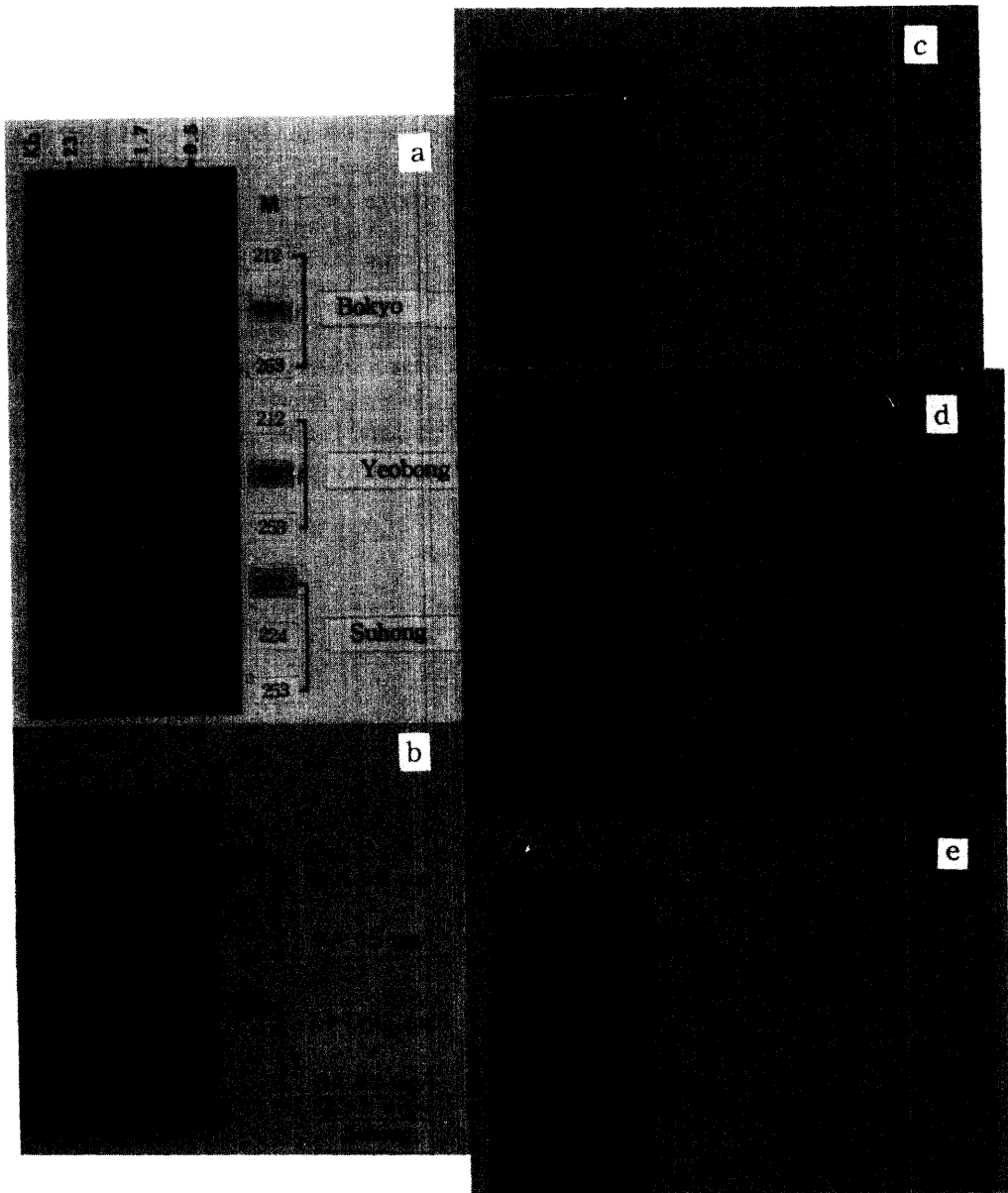


Fig. 1. (a) Electrophoretic patterns of RAPD products obtained with 212, 224 and 253 as primer in 3 cultivars of strawberry; 'Bokyo', 'Yeobong' and 'Suhong'. Lane M is a mixture of molecular marker.
 (b) RAPD patterns of total DNA isolated from shoot maintained in the presence of MS agar medium containing 0.5 mg/l of NAA and BA and 0.2 mg/l of 2,4-D and BA for 8 months by regular subcultures every 4 weeks.
 (c-d) RAPD patterns of total DNA isolated from calli, formed from leaf explant of strawberry, maintained in the presence of liquid MS medium containing 0.5 mg/l of NAA and BA and 0.2 mg/l of 2,4-D and BA and subcultured every 2 weeks.

- (*Fragaria vesca* L.) callus cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 28 : 91-96.
2. Jemmali, A., PH. Boxus, CL. Kevers and Th. Gaspar. 1994. Flowering abundance of strawberry depending on the number of subculture *in vitro*. In : Lumsden P. J., J. R. Nicholas and W. J. Davies, eds. Physiology, Growth and Development of Plants in Cultures, Kluwer Academic Publishers, pp. 356-362.
 3. Kelly, J. D. 1995. Use of random amplified polymorphic DNA markers in breeding for major gene resistance to plant pathogens. Hortscience 30(30) : 461-465.
 4. Kinet, J. M. and A. Parmentier. 1989. The flowering behaviour of micro-propagated strawberry plants cv Gorella : the influence of the number of subcultures on the multiplication medium. Acta Hort. 265 : 327-334.
 5. Priyadarishi, S. and S. Sen. 1992. A revised scheme for mass propagation of Easter lily. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 30 : 193-197.
 6. Willians, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalksi, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18 : 6531-6535.