

감자의 잎 절편 배양시 몇 가지 배지의 첨가물이 식물체 재분화에 미치는 영향

최경화 · 전재홍 · 김현순 · 정영희 · 정 혁*
한국과학기술연구원 생명공학연구소 식물조직배양 R.U.

Effects of Several Additives on Plant Regeneration from Leaf Disc Culture of *Solanum tuberosum* L.

CHOI, Kyung Hwa* · JEON, Jae Heung · KIM, Hyun Soon · JOUNG, Young Hee · JOUNG, Hyouk
Plant Tissue Culture Research Unit, KRIBB, KIST, Taejon, 305-600 *Corresponding author.

The effects of several additives on plant regeneration were investigated from leaf disc culture of *S. tuberosum* cv. Atlantic which is known as poor in regeneration ability. The presence of 2 g/L casein hydrolysate significantly enhanced shoot regeneration. Addition of 10-20 μ M AgNO₃, not only increased the frequency of shoot regeneration but also maintained the leaf disc green presumably by the inhibitory action of ethylene accumulation in vitro. Decrease of sucrose levels to below 3% significantly increased the degree of regeneration. The addition of CuSO₄ had no effect on shoot regeneration.

Key words: regeneration, ethylene, *S. tuberosum*

감자는 세계 4대 식량작물중의 하나로서 인간이 필요로 하는 대부분의 필수 영양분을 골고루 가지고 있는 매우 이상적인 알칼리성 건강식량자원이다. 더욱이 최근 식생활 습관의 다양화 추세에 따라 감자칩, 프렌치프라이, 감자녹말 등 다양한 형태의 가공용 감자 소비가 급증하면서 그 중요성이 전세계적으로 더욱 더 증대되고 있다. 따라서 감자를 주식으로 하고 있는 세계 각국에서는 오래 전부터 전통적인 교배육종 방법을 통해 보다 더 다수확이면서 동시에 원하는 품질의 감자를 생산할 수 있는 새로운 품종을 획득하기 위해 엄청난 노력을 기울여 왔고 또 그 결과로 인해 상당수의 우량 품종을 육종해내는데 성공한 바 있지만 대부분의 재배종 감자는 4배체로서 복잡한 유전적 구조를 가지고 있기 때문에 기존의 전통적인 교배육종법으로는 한계가 뚜렷한 것이 사실이다. 그러나 다행히도 최근에 *Agrobacterium*을 이용하여 원하는 특정 유용 유전자만을 인위적으로 도입할 수 있는 유전공학적 기법이 발달하면서 종래의 고전적인 교배 육종에서는 찾아볼 수 없는 새로운 형태의 첨단육종기술이 개발되었고 이 기술을 사용하여 많은 종류의 형질전환 식물체가 단시간 내에 만들어지고 있다. 그러나 이와 같은 새로운 형태의 첨단육종기술을 사용

하는 과정 중에서 외부 유전자가 성공적으로 식물세포에 도입되어졌다 할지라도 식물세포로부터 재분화가 되지 않는다면 궁극적인 목표를 달성하는 것이 불가능하므로 식물체의 재분화체계 확립은 가장 중요하면서 선행되어야 할 과제이다. 현재 감자의 경우 괴경조직이나 (Stiekema et al., 1988), 잎조직(Horsch et al., 1986), 줄기(Ooms et al., 1987)를 재료로 하여 형질전환시킨 후 shoot를 유기 하는 실험이 수행되고 있으나 감자의 품종에 따라서 재분화율이 낮아서 오랜 시간이 지난 후에야 겨우 재분화가 된다가나 심지어는 아예 재분화가 안되는 품종도 있는 실정이다(Sheerman et al., 1988). 그러므로 재료 식물의 생육상태나 품종, 배지 첨가물, 호르몬 등 좀더 세분화된 실험조건들을 적용할 필요가 있다. 따라서 본 실험은 가공용으로 수요가 급증하고 있으나 재분화가 잘 안되는 애틀란틱 품종을 재료로 하여 감자 잎 절편의 기관재분화에 미치는 여러 가지 첨가제의 효과를 조사하고 이를 토대로 하여 보다 더 효율적인 재분화체계를 확립하고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료로 사용한 감자는 에틀란틱(*Solanum tuberosum* cv Atlantic) 품종으로 MS (Murashige & Skoog, 1962) 기본 배지에서 광도 4000 lux, 16시간 광주기, 23°C의 온도 하에서 2내지 3주 동안 배양된 감자 줄기의 잎을 사용하였다. 실험재료의 생육상태에 따른 재분화 효과의 차이를 없애기 위하여 동일한 상태로 생육된 잎만을 채취하였다. 채취한 잎은 멸균여과지가 깔린 샐레에서 1 cm² 크기로 절단하였으며 잎의 건조를 방지하기 위하여 멸균수를 첨가하여 습도를 유지시켰다. 카세인 가수분해물이 shoot 형성에 미치는 영향을 조사하고자 1-10 g/L로 농도를 달리하여 첨가하였고, AgNO₃는 1-20 μM 농도로, sucrose는 1, 2, 3%로 달리 첨가하였으며 CuSO₄는 1-100 μM로 조절하였다. 이들 첨가제가 농도별로 처리된 재분화배지(MS + 0.1 mg/L GA₃ + 2 mg/L Zeatin + 0.01 mg/L NAA)에 1 cm²로 잘라놓은 잎 절편을 접종하였다. 잎절편은 동일한 배지에 2주마다 계대 배양 하였으며 배양 후 1주일마다 shoot 분화를 관찰하였다. 배양 후 8 주후에 shoot형성율과 절편당 shoot수, 건물중을 조사하였다.

결과 및 고찰

MS배지 내에 카세인 가수분해물 농도를 달리하여 에틀란틱 품종의 잎절편을 배양한 후 8주가 경과한 다음 기관형성 정도를 조사해 본 결과는 Table 1과 같다. Shoot형성은 카세인 가수분해물 농도가 2 g/L 일 때 가장 양호하였고 절편당 shoot의 수도 3.25개로 다른 농도의 처리구보다 높았다. 그러나 배양기간이 길어질수록 잎절편은 갈변하였으며 5 g/L를 첨가한 처리구에서는 캘러스가 형성된 잎의 절단면에서 작은 shoot들이 많이 형성되기는 하였으나 잘 자라지 않고 노랗게 고사되는 것이 대부분이었다(Figure 1). 그러므로 에틀란틱 품종의 재분화를 촉진시키기 위한 카세인 가수분해물 농도는 2 g/L가 적당한 것으로 생각된다.

잎절편의 재분화에 미치는 AgNO₃의 효과를 보면 (Table 2) 5 μM 이상의 AgNO₃를 처리했을 때 shoot 분화가 양호

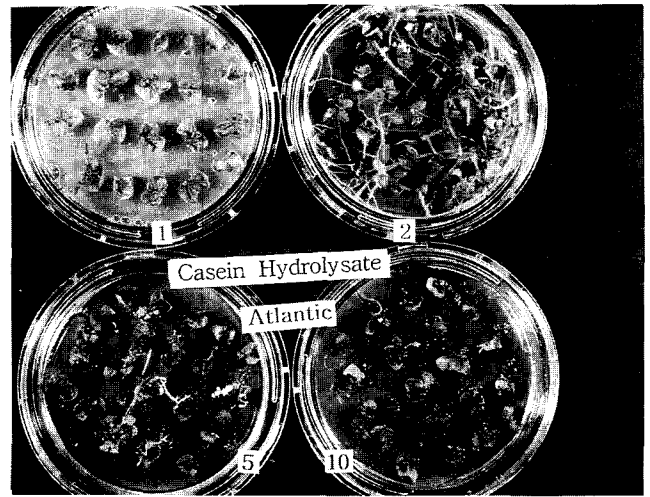


Figure 1. Shoot formation from leaf disc cultures of *Solanum tuberosum* cv. Atlantic in MS medium containing casein hydrolysate after 8 weeks in culture.

하였으며 특히 10 μM과 20 μM 농도에서 shoot형성이 더 잘 되었지만 10 μM에서 절편당 유기된 shoot의 수가 2.75개로 20 μM처리시 보다 많았고 생체중도 더 높았다. 낮은 농도의 AgNO₃를 처리한 배지에서 생육된 잎조직은 모두 갈변 되었으나 10 μM 이상 농도에서는 조직이 갈변화되지 않았다(Figure 2). 이러한 갈변현상은 에틸렌 축적에 의한 것으로 사료된다. 식물세포의 배양 중에 발생하는 에틸렌은 세포의 재분화를 억제하거나 갈변현상을 나타나게 하므로 조직배양시 문제가 된다. 그러므로 에틸렌을 억제하는 물질들을 배지에 첨가하여 재분화율을 높이려는 연구들이 계속되고 있다. 에틸렌 억제물질인 AgNO₃, CoCl₂, salicylic acid 등을 배지에 첨가한 결과 AgNO₃가 다른 억제제보다 재분화율을 높이는데 효과적이었으며(Palmer, 1992) *Triticum aestivum*의 캘러스 배양시 10 mg/L의 AgNO₃ 첨가가 무처리에 비하여 10% 이상 재분화율을 높일 수 있었다(Purnhauser et al., 1987). 또한 *Helianthus annuus*의 cotyledon으로부터 식물체 재분화시 5-20 μM의 AgNO₃를 처리하면 재분화율이 17-20% 정도로 높아졌는데(Khraibi et al., 1991) 감자 잎절편을 사용한 본 실험에서도 10-20 μM의

Table 1. Effect of casein hydrolysate on plant regeneration from leaf disc of *Solanum tuberosum* cv. Atlantic after 8 weeks in culture

Concentration (μM)	Shoot formation(%)	No. shoots /explant(±SE)	Fresh wt (g ± SE)
0	0	0	1.01 ± 0.07
1	2	1.00 ± 0.00	1.14 ± 0.09
2	17	3.25 ± 0.48	2.02 ± 0.45
5	15	2.83 ± 0.91	1.46 ± 0.16
10	10	2.00 ± 0.31	1.46 ± 0.10

Table 2. Effect of AgNO₃ on plant regeneration from leaf disc of *Solanum tuberosum* cv. Atlantic after 8 weeks in culture.

Concentration (μM)	Shoot formation(%)	No. shoots /explant(±SE)	Fresh wt (g ± SE)
0	0	0	1.01 ± 0.07
1	7.5	1.00 ± 0.00	1.38 ± 0.03
2.5	7.5	1.67 ± 0.33	1.73 ± 0.08
5	10	2.00 ± 0.55	2.00 ± 0.33
10	15	2.75 ± 0.48	3.67 ± 0.06
20	15	2.00 ± 0.45	3.22 ± 0.30



Figure 2. Shoot formation from leaf disc cultures of *Solanum tuberosum* cv. Atlantic in MS medium containing AgNO₃ after 8 weeks in culture.

AgNO₃를 처리했을 때 비교구에 비하여 재분화율이 15% 정도로 높아졌다. 이것은 10과 20 μM 농도가 에틸렌 발생을 효과적으로 억제시킴으로 인하여 조직이 갈변화되지 않고 재분화가 잘 된 것으로 생각된다. 그러나 에틸렌 축적정도는 식물체의 품종과 부위에 따라 다르므로 감자의 품종 또는 부위별로 에틸렌 축적을 측정하는 것이 필요하다고 생각된다.

탄소원인 sucrose의 영향을 보면(Table 3) 일반적으로 사용되는 농도인 3%에서는 전혀 재분화가 안 일어났으나 농도가 낮아질수록 재분화가 더 잘되었는데 1%에서 재분화율이 가장 높았다. 그러나 세 처리구 모두에서 조직의 갈변 현상이 나타났다(Figure 3). 식물은 발달 단계에 따라 당분의 요구량이 달라지는데 당분은 영양원으로 작용하고 삼투압 조절기능도 하는 것으로 알려져 있다. 높은 삼투압은 *Brassica zygotic embryos*의 발아를 억제하며(Crouch et al., 1981) 1% 농도의 sucrose가 somatic embryos의 발아를 촉진 시켜서 재분화효율이 높아진 경우도 있다는 보고들을 감안할 때(Komatsuda et al., 1992) 고농도의 sucrose첨가는 필요 이상의 높은 삼투압을 유발하여 재분화에 불리한 것으로 보여진다.

CuSO₄의 효과를 보면(Table 4, Figure 4) 10, 50 μM 농도에서 약간의 shoot발생이 있었으나 다른 첨가물들에 비하여

Table 3. Effect of sucrose on plant regeneration from leaf disc of *Solanum tuberosum* cv. Atlantic after 8 weeks in culture.

Concentration (μM)	Shoot formation(%)	No. shoots /explant(±SE)	Fresh wt (g ± SE)
1	15	1.67 ± 0.33	1.79 ± 0.14
2	2	1.00 ± 0.00	1.36 ± 0.12
3	0	0.00 ± 0.00	1.01 ± 0.07



Figure 3. Shoot formation from leaf disc cultures of *Solanum tuberosum* cv. Atlantic in MS medium containing sucrose after 8 weeks in culture.

Table 4. Effect of CuSO₄ on plant regeneration from leaf disc of *Solanum tuberosum* cv. Atlantic after 8 weeks in culture.

Concentration (μM)	Shoot formation(%)	No. shoots /explant(±SE)	Fresh wt (g ± SE)
0	0	0	1.01 ± 0.07
1	0	0	1.18 ± 0.13
10	2	1.00 ± 0.00	1.50 ± 0.08
50	2	1.00 ± 0.00	1.65 ± 0.20
100	0	0	1.46 ± 0.04

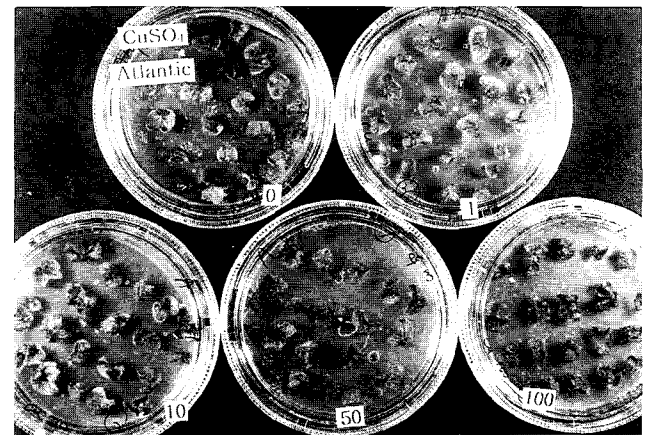


Figure 4. Shoot formation from leaf disc cultures of *Solanum tuberosum* cv. Atlantic in MS medium containing CuSO₄ after 8 weeks in culture

그 효과가 거의 없었으며 식물체 조직도 갈변되었다. 보통 MS배지에 첨가되는 CuSO₄농도가 0.1 μM인데 비하여 이보다 1000배 높은 0.1-100 μM를 처리하여 재분화율이 높아진 경우가 있다(Garcia-Sogo et al., 1991, Purnhauser, 1991). 그

러나 밑에서는 10 μM 농도에서 캘러스의 분화가 비교구에 비하여 70% 이상 높아질 정도로 재분화를 강하게 촉진시켰지만 *B. napus* 배양시에는 0.1-100 μM 처리는 재분화에 효과가 없었거나 오히려 억제된 것처럼 (Purnhauser et al., 1993) Cu의 반응이 인자형에 따라 다르게 나타나며 또한 배지 종류마다 다른 결과를 나타내기도 한다. 감자의 경우도 MS 배지에서 Desiree 품종은 재분화가 잘 되지만 애틀란틱 품종에서는 Cu를 MS 기본 농도보다 높게 처리할지라도 그 효과가 없는 것은 인자형에 의한 것과 배지 종류에 따라서 다르게 나타난 결과로 사료된다.

본 실험에서 애틀란틱 품종의 재분화율이 20% 내로 비교적 낮았고 배양 중에 잎절편이 갈색으로 변한 것이 대부분이었다. 그러므로 절편조직으로부터 페놀류의 독성 물질이 분비되어 재분화가 억제된 가능성을 생각할 수 있다. 식물종에 따라서는 절편에서 페놀성 화합물이 분비되어 배양이 장해를 입는 경우가 많다 (Preece & Compton, 1991). 이럴 경우에는 배지에 활성탄을 첨가하여 이들 물질을 흡수시킴으로서 피해를 줄일 수 있다. 따라서 본 실험에서도 활성탄을 처리하였으나 대조구와 마찬가지로 재분화가 되지 않았다 (data 미제시). 이는 활성탄이 독성 물질을 흡착하여 재분화를 촉진시켰다기보다 배지에 첨가한 생장조절제와 Fe, Zn 등 착염을 흡수하여 오히려 캘러스 형성과 재분화가 안된 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 10 μM 의 AgNO_3 와 2 g/L 카세인 가수분해물, 1% sucrose가 애틀란틱 품종의 잎 절편을 통한 재분화에 효과적인 것으로 밝혀져서 형질전환 후 재분화 실험에 적용할 수 있을 것이다. 그러나 아직도 애틀란틱 품종의 재분화 효율이 다른 품종보다 낮으므로 이들 첨가물질의 혼용 실험 및 배지 종류, 기타 유전적 차이점 등에 대해서도 더 연구해야 할 필요성이 있는 것으로 사료된다.

적 요

몇 가지 종류의 배지첨가물이 재분화가 어려운 것으로 알려져 있는 감자 애틀란틱 품종의 잎 절편 배양시 shoot 형성에 미치는 영향을 조사하였다. 카세인 가수분해물은 2 g/L 농도가 재분화에 효과적이었으며 AgNO_3 는 10-20 μM 농도에서 재분화가 잘되었고 잎 절편도 갈변되지 않고 푸르게 유지되었는데 이것은 AgNO_3 가 에틸렌 발생을 효과적으로 억제했기 때문으로 생각된다. Sucrose는 3%보다 낮은 농도에서 shoot 유기가 효과적이었고 CuSO_4 는 애틀란틱 품종 감자 잎 절편으로부터 식물체 재분화에 영향을 주지 못하였다.

인 용 문 헌

- Crouch ML, Sussex IM (1981) Development and storage protein synthesis in *Brassica napus* L. embryos *in vivo* and *in vitro*. *Planta* 153: 64-74
- Garcia-Sogo B, Roig LA, Moreno V (1991) Enhancement of morphogenetic response in cotyledon-derived explants of *Cucumis melo* induced by copper ions. *Acta Hort.* 289: 229-230
- Horsch RB, Klee HJ, Stachel S, Winans SC, Nester EW, Rogers SG, Fraley RT (1986) Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* virulence mutant in leaf discs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2571-2575
- Khraibi BKM, Lathe A, Roustan JP, Falloot J (1991) Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and cobalt. *Plant Cell Rep.* 10: 204-207
- Komatsuda T, Lee W, Oka S (1992) Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and growth regulators in soybeans *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 28: 103-113
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15: 71-78
- Ooms G, Burrell MM, Karp A, Bevan M, Hille J (1987) Genetic transformation in two potato cultivars with T-DNA from disarmed *Agrobacterium*. *Theor. Appl. Genet.* 73: 744-750
- Palmer CE (1992) Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate. *Plant Cell Rep.* 11: 541-545
- Preece JE, Compton ME (1991) Problems with explant exudation in micropropagation. In: YPS. Bajaj (ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 17. High-tech and micropropagation I. Springer-Verlag, Berlin pp. 168-189
- Purnhauser L, Medgyesy P, Czako M, Dix PJ, Marton L (1987) Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue culture using the ethylene inhibitor AgNO_3 . *Plant Cell Rep.* 6: 1-4
- Purnhauser L (1991) Stimulation of shoot and root regeneration in wheat (*Triticum aestivum*) callus cultures by copper. *Cereal Res. Comm.* 19: 419-423
- Purnhauser L, Gyulai G (1993) Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 35: 134-139
- Sheerman S, Bevan MW (1988) A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors. *Plant Cell Rep.* 7: 13-16
- Stiekema WJ, Heidekamp F, Louwse JD, Verhoeven HA, Dijkhusi P (1988) Introduction for foreign genes into potato cultivars Bintje and Desiree using an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. *Plant Cell Rep.* 7: 47-50