

## 딸기의 잎과 탁엽 절편체로부터 기관형성을 통한 식물체 재생

최준영 · 김현정 · 형남인\*  
상명대학교 원예과학과

### Plant Regeneration via Organogenesis from Leaf and Stipule Segments of Strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.)

CHOI, Jun Young · KIM, Hyun Jung · HYUNG, Nam In\*

Department of Horticultural Science, Sangmyung University, Chonan, 330-180, Korea. \*Corresponding author.

Plant regeneration via organogenesis from leaf and stipule explants of micropropagated shoots of strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Suhong) was achieved. Leaf and stipule explants were detached from shoot-tip cultured shoots and cultured on MS medium with various combinations of BA and NAA under light or dark condition. Shoot regeneration from leaf explant was observed after 3 weeks in culture and was good at the high ratio of BA and NAA among various combination treatments. The highest shoot regeneration frequency from leaf explants was obtained with 1.0 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA, in which 31.1% shoot regeneration frequency (1.7 shoots per leaf explant) was yielded. In case of stipule explants, shoot regeneration was largely affected by plant growth regulators during incubation under dark condition for initial 4 weeks but not under continuous light condition. The combination treatment with 2.0 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA showed the most excellent shoot regeneration from stipule explants, where 44.4% regeneration frequency (4.0 shoots per explants) obtained. Regenerated shoots were rooted on MS medium with 0.1 mg/L NAA after shoot elongation, and the plantlets regenerated were transferred to soil mixtures with vermiculite and perlite for acclimation.

**Key words:** dark culture, leaf explant, plant growth regulator, shoot regeneration, stipule explant

딸기(*Fragaria × ananassa*)는 소비자들의 다양한 기호로 인하여 관행 육종법을 이용한 품종 개발이 활발히 진행되어 왔다. 그러나 최근에는 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환법에 대한 관심이 고조됨에 따라 딸기의 육종을 위한 형질전환이 이루어지고 있다. 기존 형질의 퇴화 없이 특정 유용형질을 도입할 수 있는 형질전환을 이용하여 딸기에서는 개화시기, 내병성 등과 같은 상품성 및 재배 특성 등의 개량에 효과적으로 이용될 수 있을 것이다. 또한 영양번식성 작물인 딸기는 형질전환을 이용한 기내 육종으로 형질전환체가 얻어지면 후대에 대한 분석 없이 영양번식법으로 신품종의 유지가 가능하다.

형질전환을 이용한 육종에 있어서는 절편체로부터의 효율적인 식물체 재생 체계 확립이 선결되어야 한다. 딸기의 조직배양에 관한 연구는 미세번식(Boxus, 1974; Kartha et al., 1980)을 거쳐 식물체 재생으로 이어져 왔다. 딸기의 식물체 재생은 미성숙 잎 절편에서 유도된 캘러스로부터의

간접 기관형성(Nehra et al., 1990c)이나 잎 절편(leaf disk)로부터의 직접 기관형성(Nehra et al., 1989; Sorvari et al., 1993)을 통하여 이루어졌으며, 이외에 포복경(Liu and Sanford, 1988)과 화경(Lis, 1993)으로부터 식물체 재생이 성공하기도 하였다. Rugini와 Orlando(1992)는 딸기의 캘러스로부터의 신프 재생에 적합한 절편체를 알아 보고자 절편체간 비교를 하였는데 전체 잎(엽신, 엽병과 탁엽 포함) 또는 탁엽과 엽병을 포함한 절편체가 가장 우수하였고, 엽신, 엽병은 매우 저조하였다고 보고하였다. 그리고 Nehra 등(1989)은 딸기 10개 품종에서 잎 절편으로부터의 신프 재생률이 20-80%로 매우 다양하게 나타나 딸기의 신프 재생시 품종간 반응의 차이가 크다는 것을 보여주었다. 이와 같이 딸기에서는 다양한 조직으로부터의 식물체 재생에 요구되는 최적화 조건을 구명하기 위한 많은 연구가 진행되었다. 그러나 딸기의 절편체로부터의 신프 재생 반응이 조직이나 품종에 따라 상당히 다르다는 것이 밝혀짐에 따라 새로운

품종을 대상으로 식물체 재생을 유도하기 위해서는 추가적인 최적화 연구가 필요한 실정이다. 딸기의 식물체 재생 체계를 기반으로 하여 형질전환 연구가 진행되었는데, 형질전환 효율은 낮지만 형질전환 식물체가 얻어졌다(Nehra et al., 1990a,b; James et al., 1990).

딸기의 식물체 재생과 형질전환에 관한 연구가 외국에서는 상당한 수준에 도달하고 있으나 국내에서는 신뢰할 만한 식물체 재생 체계가 부족하여 딸기의 형질전환에 관한 연구가 체계적으로 이루어지지 못하고 있어 이에 관한 연구가 시급한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 기내배양된 딸기 '수홍'의 잎과 탁엽 절편체로부터 신초 기관형성을 통한 식물체 재생에 적합한 조건을 구명하기 위하여 신초 재생에 미치는 절편체, 성장조절제, 광조건 등의 영향을 알아 보았다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 신초배양

딸기(*Fragaria × ananassa*) '수홍'의 신초배양에서 얻어진 잎 또는 탁엽 절편체를 식물체 재생의 식물재료로 이용하였다. 신초배양에서는 MS 염류와 비타민(Murashige and Skoog, 1962)에 BA 0.5 mg/L, sucrose 30 g/L, agar 8 g/L를 첨가하고 pH를 5.8로 조절한 배지를 이용하였다. 배양은  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 형광등을 이용하여 2000 lux, 24시간 연속조명하에서 이루어졌으며, 4주간격으로 계대배양을 실시하였다.

### 신초 기관형성 및 식물체 재생

엽절편체와 탁엽절편체로부터의 신초 기관형성 유도에는 MS 염류와 비타민, sucrose 30 g/L, agar 8 g/L (pH 5.8)를 첨가한 기본배지를 사용하였으며, 기관형성에 있어서 절편체, 성장조절제, 광조건 등의 적절한 조건을 밝히기 위한 실험을 수행하였다.

기관형성에 적합한 성장조절제 농도를 알아보기 위한 1차 실험에서는 엽절편체를 재료로 하여 BA(0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg/L)와 NAA(0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L)를 조합한 총 25개 조합처리를 실시하였고, 2차 실험에서는 탁엽절편체를 재료로 하여 1차 실험의 결과를 바탕으로 농도 범위를 조절한 BA(0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L)와 NAA(0, 0.1, 1.0 mg/L)의 12개 조합처리와 동시에 각각 명처리 또는 암처리로 구분하여 총 24개 조합처리를 실시하였다.

신초 기관형성 유도에 사용한 절편체는 계대배양후 4주간 배양된 신초에서 절단한 잎으로부터 얻어졌다. 엽절편체는 신초로부터 전체 잎을 잘라내어 엽신 부위를  $0.5\text{cm}^2$  크기로 4면 절단한 다음 향측면(adaxial side)이 배지에 닿도록 치상

하였다. 탁엽절편체는 신초에서 탁엽이 붙어 있도록 전체 잎을 잘라낸 다음 엽신과 엽병 부위를 제거하고 하단부의 탁엽을 확보하여 배지에 수평으로 치상하였다. 배양용기인 petri-dish당 6-9개 절편체씩 치상한 것을 1반복으로 하여 처리당 5반복을 기본으로 하였다.

그리고 엽절편체에서는 배양 초기 4주간 암상태에서 배양한 다음 명상태로 옮겨 배양한 것을 제외하고는 신초배양과 동일한 환경에서 배양하였으며, 탁엽절편체에서는 명처리의 경우 24시간 연속조명하에서 배양하였고 암처리의 경우 배양 초기 4주간 암상태에서 배양한 다음 명상태로 옮겨 동일한 조건에서 배양하였다. 절편체로부터의 기관형성을 알아보기 위하여 배양 2주후부터 6주까지 매주 신초 재료를, 절편체당 수를 각각 조사하였다.

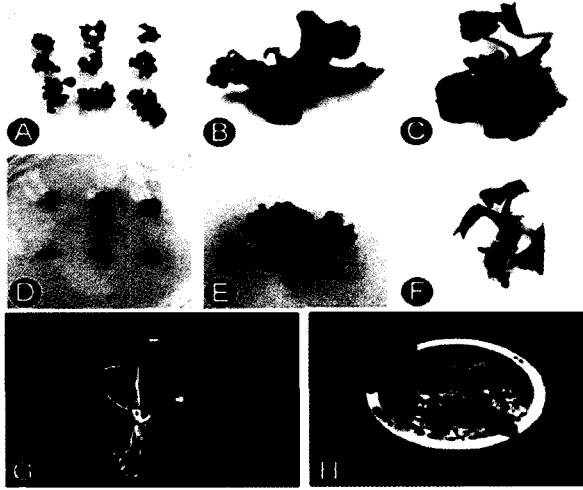
절편체로부터 재생된 신초는 절단하여 신초배양 배지로 옮겨 신초 신장과 발달을 유도한 다음 정상적으로 성장한 신초를 선택하여 발근을 유도하였는데, 발근배지는 NAA 0.1 mg/L가 첨가된 MS배지를 사용하였다. 성공적으로 발근된 소식물체는 인공토양(vermiculite : perlite = 1 : 1)이 들어있는 분으로 옮겨 활착을 유도하였다.

## 결 과

### 엽절편체로부터의 신초 기관형성에 미치는 성장조절제의 영향

딸기 '수홍'의 기내배양 신초에서 얻어진 엽절편체로부터 기관형성의 양상을 보면 엽절편체로부터 배양 2주후부터 뿌리 재생이 관찰되었고, 배양 3주후부터 신초 재생이 관찰되기 시작하여 뿌리 재생이 신초 재생에 비해 1주정도 빠르게 이루어졌다. 신초 재생은 엽절편체의 주맥 절단부 부근에서 주로 이루어졌으며, 캘러스 형성 없이 직접적으로 신초가 형성되기도 하였으나 주로 캘러스가 형성된 이후 신초 형성이 이루어졌다(Figure 1A-C).

엽절편체로부터의 기관형성에 미치는 성장조절제의 영향을 알아본 결과(Table 1), 성장조절제 조성에 따라 신초 형성이 많은 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다. 엽절편체로부터의 신초 재생은 BA가 포함된 처리에서만 이루어졌는데, BA 1.0 mg/L 이상 농도의 단독처리 및 BA와 NAA 조합처리구에서 신초 재생이 이루어졌다. 신초 재생은 BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 처리구에서 재생률 31.1%, 절편체당 신초수 1.7개로 가장 양호하였다(Figure 1C). 그리고 엽절편체로부터의 뿌리 재생은 NAA가 첨가된 처리구에서만 이루어졌고 NAA 농도 증가에 따라 재생률과 뿌리수가 증가하였으며, BA 농도가 증가됨에 따라 NAA 농도에 관계없이 뿌리 재생이 억제되는 경향을 나타내었다.



**Figure 1.** Plant regeneration via organogenesis from leaf and stipule explants of 'Suhong' strawberry. Adventitious shoot formation from leaf explants, cultured on MS medium with 1.0 mg/L BA and 0.2 mg/L NAA (A-C), and stipule explants, cultured on MS medium with 1.0 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA (D-F), after 6 weeks in culture. Rooting of the regenerated shoots on MS medium with 0.1 mg/L NAA (G). Acclimatization of regenerated plants on artificial soil mixtures (vermiculite : perlite = 1 : 1) (H).

**Table 1.** Effects of plant growth regulators on shoot regeneration from leaf explants of 'Suhong' strawberry after 6 weeks in culture<sup>a</sup>.

Plant Growth Regulators		Shoot Regeneration (% ± SE)	Shoot number /explant (± SE)
NAA (mg/L)	BA (mg/L)		
0	0.1	0	0
	0.5	0	0
	1.0	7.4 ± 2.9	0.7 ± 0.3
	2.0	7.4 ± 5.7	0.3 ± 0.3
	5.0	3.7 ± 2.9	0.3 ± 0.3
0.1	0.1	0	0
	0.5	2.2 ± 2.2	0.2 ± 0.2
	1.0	15.5 ± 8.9	0.8 ± 0.5
	2.0	11.1 ± 5.0	0.8 ± 0.4
	5.0	6.7 ± 4.4	0.7 ± 0.4
0.2	0.1	0	0
	0.5	6.7 ± 2.7	0.8 ± 0.4
	1.0	31.1 ± 5.4	1.7 ± 0.2
	2.0	4.4 ± 2.7	0.4 ± 0.2
	5.0	20.0 ± 5.4	0.9 ± 0.2
0.5	0.1	0	0
	0.5	8.9 ± 5.4	0.8 ± 0.5
	1.0	4.4 ± 4.4	0.2 ± 0.2
	2.0	4.4 ± 2.7	0.4 ± 0.4
	5.0	6.7 ± 4.4	0.4 ± 0.2
1.0	0.1	0	0
	0.5	13.3 ± 5.4	1.4 ± 0.5
	1.0	4.4 ± 2.7	0.4 ± 0.2
	2.0	11.1 ± 6.1	0.6 ± 0.2
	5.0	17.8 ± 8.3	1.2 ± 0.6

<sup>a</sup>Explants were incubated under dark condition for initial 4 weeks, then transferred to continuous light condition.

탁엽절편체로부터의 신초 기관형성에 미치는 생장조절제와 광조건의 영향

딸기의 탁엽 절편체 배양으로부터의 신초 형성은 배양 3주후부터 관찰되기 시작하여 4-5주사이에 많이 이루어졌다. 탁엽 절편체로부터의 신초 형성은 절단면을 따라 이루어졌는데, 절단면가운데 선단부 절단면(탁엽과 엽병사이)에서 주로 나타났고 탁엽 기부 절단면에서는 드물게 이루어졌다 (Figure 1D-F).

탁엽절편체로부터의 신초 기관형성에 미치는 생장조절제와 광조건의 영향에 대하여 알아보았다(Table 2). 신초 기관형성은 광조건에 따라 생장조절제 농도의 효과가 다르게 나타났다. 명처리에서는 0.1 mg/L의 저농도 BA 단독처리에서도 재생이 이루어져 생장조절제 처리에 따른 뚜렷한 경향을 발견할 수 없었으나, 배양 초기 4주간 암상태에서 배양한 암처리에서는 전반적으로 0.5 mg/L 이상의 고농도 BA가 NAA농도에 관계없이 효과적으로 나타났다. 생장조절제 처리 가운데, 암처리에서는 BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 처리구에서 재생률 44.4%, 절편체당 신초수 4.0개로 가장 높은 재생률을 나타내었다. 명처리에서는 BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 처리구에서 재생률 16.7%, 절편체당 신초수 3.2개로 높은 재생률을 보여주었다. 그리고 탁엽의 신초 재생률, 절편체당 신초수 등을 고려해 볼 때 암처리가 명처리보다 전반적으로 양호한 것으로 나타났다(Table 2).

**Table 2.** Effects of plant growth regulators and light conditions on shoot regeneration from stipule explants of 'Suhong' strawberry after 6 weeks in culture.

Plant Growth Regulators		Light culture		Dark culture <sup>a</sup>	
NAA (mg/L)	BA (mg/L)	Shoot regeneration (%±SE)	Shoot No. /explant (±SE)	Shoot regeneration (%±SE)	Shoot No. /explant (±SE)
0	0.1	5.6 ± 4.8	1.7 ± 1.4	0	0
	0.5	5.6 ± 4.8	0.7 ± 0.6	16.7 ± 8.3	2.0 ± 1.3
	1.0	0	0	16.7 ± 8.3	2.5 ± 1.1
	2.0	11.1 ± 4.8	3.7 ± 1.6	5.6 ± 4.8	2.0 ± 1.7
0.1	0.1	11.1 ± 4.8	0.7 ± 0.3	0	0
	0.5	11.1 ± 4.8	1.0 ± 0.5	16.7 ± 14.4	0.7 ± 0.6
	1.0	16.7 ± 8.3	3.2 ± 1.4	5.6 ± 4.8	0.3 ± 0.2
	2.0	0	0	44.4 ± 19.2	4.0 ± 1.8
1.0	0.1	11.1 ± 9.6	2.8 ± 2.5	0	0
	0.5	11.1 ± 4.8	1.3 ± 0.8	5.6 ± 4.8	0.3 ± 0.2
	1.0	0	0	0	0
	2.0	16.7 ± 4.8	2.0 ± 1.0	22.2 ± 12.7	1.3 ± 0.8

<sup>a</sup>Explants were incubated under dark condition for initial 4 weeks, then transferred to continuous light condition.

고 찰

딸기 '수홍'의 기내배양 신초로부터 얻어진 잎과 탁엽 절편체로부터 생장조절제 처리를 통하여 신초 재생을 유도할 수 있었다. 생장조절제는 잎과 탁엽 절편체에서 BA 1.0-2.0

mg/L 와 NAA 0.1-0.2 mg/L의 범위가 신초 재생에 적합한 것으로 나타나 다소간 농도 차이는 있었으나 전반적으로 유사한 경향을 나타내었다. Sorvari(1993)는 딸기 'Hiku'와 'Jonsok'에서 BA 3.0 mg/L와 IBA 0.1 mg/L가 신초 재생에 효과적이라는 본 실험과 유사한 결과를 보고한 바 있다.

딸기 탁엽절편체의 신초 재생에 있어서 본 실험에서는 초기 배양시 암상태가 명상태에 비해 효과적으로 나타났는데, 딸기의 신초 재생에 적합한 광조건에 대해서는 상이한 결과가 보고되고 있다. 딸기의 신초 형성에 있어서 James 등(1990)은 명상태가 효과적이라고 하였으나, Rugini와 Orando(1992)는 명상태에서는 절편체로부터의 재생이 거의 일어나지 않았다고 하였으며, Nehra 등(1989)은 엽절편체로부터의 신초 재생이 빛에 의해 크게 영향을 받지 않으나 낮은 광도가 재생률을 증진시켰다고 하였다. 이와 같이 재생 과정에 적합한 광조건에 대한 상이한 보고는 품종간 유전적 차이에 기인한다고 보여지며 각 품종에 따라 신초 재생에 요구되는 배양 조건이 다르다는 것을 보여준다.

본 연구에서 사용한 잎과 탁엽 절편체간 신초 재생률을 보면 탁엽절편체(44.1%)가 엽절편체(31.1%)에 비해 높게 나타나 딸기 '수홍'에서는 탁엽절편체가 신초 재생에 적합한 절편체인 것으로 판단되었다. Rugini와 Orlando(1992)는 딸기 신초 재생에 적합한 절편체를 찾고자 하였는데, 절편체간 비교에서 엽 절편에 비해 탁엽을 포함한 전체 잎이 가장 우수하며 전체 잎중 탁엽과 엽병의 연결부위에서만 신초 재생이 이루어졌다고 하였다. 또한 탁엽과 엽병의 연결부위에는 분열조직의 세포(meristematic cell)는 없으나 전분 함량이 많은 세포들이 관찰되었다고 하였다. 이를 감안해 볼 때 본 실험의 탁엽 절편체는 탁엽과 엽병의 연결부위를 절단하여 분열능이 높은 조직이 노출되고 이 부위로부터 재생이 효율적으로 이루어졌을 것이라 사료된다.

절편체로부터 재생된 신초는 신초배양 배지로 옮겨 신장을 시킨 후 NAA 0.1 mg/L가 첨가된 MS배지로 옮겨 발근을 유도하였는데, 발근배지에서 재생 신초는 성공적으로 뿌리가 형성되었다(Figure 1G). 발근된 소식물체는 vermiculite와 perlite를 동량 혼합한 인공토양으로 옮겨 활착을 유도하였다(Figure 1H). 엽절편체로부터 신초 기관형성을 거쳐 재생된 식물체는 외형적으로 정상적으로 성장하고 있으며 특별한 변이는 관찰되지 않고 있다.

본 연구에서는 딸기의 국내 주요 품종중 하나인 '수홍'의 기내배양 엽절편체와 탁엽절편체로부터의 신초 기관형성을 통한 식물체 재생의 체계를 확립하였다. 그러나 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환을 위해서는 효율적인 신초 분화가 선결조건이나 본 연구 결과에서는 재생률 및 재생 신초수가 형질전환에 이용 가능한 수준에는 미치지 못하였다. 앞으로 절편체로부터의 재생률을 향상시키기 위하여 배양시 온도나 광조건을 조절하는 등의 지속적인 연구가 필요하다고 보여진다. 본 연구를 바탕으로 신초 재생 효율을 보다 향상시킨다면 딸기 국내 주요 품종의 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 효과적으로 이용될 수

있을 것이다.

## 적 요

딸기 '수홍'의 기내배양된 잎과 탁엽 절편체로부터 기관형성을 통한 식물체 재생 방법을 확립하고자 실험을 수행하였다. 엽절편체 배양에서는 성장조절제 처리에 따라 NAA 첨가시에는 뿌리 재생, BA 첨가시에는 신초 재생이 이루어졌으며, BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L 처리구에서 재생률 31.1%, 절편체당 신초수 1.7개로 가장 양호하였다. 탁엽절편체 배양에서는 성장조절제와 광조건을 실시하였는데, 명조건에서는 성장조절제 처리에 따른 뚜렷한 경향을 발견할 수 없었으나, 암조건에서는 고농도 BA와 저농도 NAA의 혼용처리가 신초 재생에 필요함을 알 수 있었다. 탁엽절편체는 BA 2.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 처리구에서 재생률 44.4%, 절편체당 신초수 4.0개로 가장 양호한 반응을 나타내었다. 재생된 신초는 NAA 0.1 mg/L가 첨가된 MS배지에서 발근되었으며, 이어서 인공토양(vermiculite : perlite = 1 : 1)에서 성공적으로 활착을 유도할 수 있었다.

## 인용 문헌

- Boxus PH (1974) The production of strawberry plants by in vitro micro-propagation. *J Hort Sci* 49: 326-328
- James DJ, Passey AJ, Barbara DJ (1990) Regeneration and transformation of apple and strawberry using disarmed Ti-binary vectors. *Plant Sci* 69: 79-94
- Kartha KK, Leung ML, Pahl K (1980) Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *J Amer Soc Hort Sci* 105: 481-484
- Lis EK (1993) Strawberry plant regeneration by organogenesis from peduncle and stolen segments. *Acta Hort* 348: 435-438
- Liu ZR, Sanford JC (1988) Plant regeneration by organogenesis from strawberry leaf and runner tissue. *HortScience* 23: 1057-1059
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nehra NS, Chibbar RN, Kartha KK, Datlar RSS, Crosby LL, Stushnoff C (1990a) *Agrobacterium*-mediated transformation of strawberry calli and recovery of transgenic plants. *Plant Cell Rep* 9: 10-13
- Nehra NS, Chibbar RN, Kartha KK, Datlar RSS, Crosby LL, Stushnoff C (1990b) Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. *Plant Cell Rep* 9: 293-298
- Nehra NS, Stushnoff C, Kartha KK (1989) Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks. *J Amer Soc Hort Sci* 114: 1014-1018

**Nehra NS, Stushnoff, Kartha KK** (1990c) Regeneration of plants from immature leaf-derived callus of strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Plant Sci* **66**: 119-126

**Rugini E, Orando R** (1992) High efficiency shoot regeneration from calluses of in vitro shoot culture. *J Hort Sci* **67**: 577-582

**Sorvari S, Ulvinen S, Hietaranta T, Hiirsalmi H** (1993) Preculture medium promotes direct shoot regeneration from micropropagated strawberry leaf disks. *HortScience* **28**: 55-57

(1998년 8월 20일 접수)