

상추 유식물체 절편의 조직배양에 의한 고빈도 기관발생과 식물체 재분화

정 민 · 우제욱 · 정원중 · 유장렬*
생명공학연구소 식물세포 및 분자생물학 R.U.

High Frequency Organogenesis and Plant Regeneration in Tissue Cultures of Lettuce Seedling Explants

JUNG, Min · WOO, Je Wook · JEONG, Won Joong · LIU, Jang RyoI*

Plant Cell and Molecular Biology Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
P.O. Box 115, Yusong, Taejeon, 305-606, Korea

ABSTRACT To induce adventitious buds, hypocotyl and cotyledonary explants from 7 to 10 day-old seedlings of lettuce (*Lactuca sativa* L.; two Japanese cultivars of crisphead lettuce and four Korean cultivars of leaf lettuce) were cultured on Murashige and Skoog (MS) and Schenk and Hildebrandt (SH) media supplemented with BA and NAA in the light for five weeks. Cotyledonary explants produced adventitious shoots at greater frequencies than hypocotyl explants. MS medium was more favorable to adventitious shoot formation than SH medium. Combination of 0.5 mg/L BA and 0.1 to 1 mg/L NAA in MS medium led to the greatest frequency (86%) in adventitious shoot formation. Greater than 95% of shoots excised from explants were rooted when cultured on MS basal medium.

Key words: Adventitious shoot formation, *Lactuca sativa* L., organogenesis

서 론

국내에서 재배되는 상추는 흔히 양상추라고 불리는 결구상추와 재래상추인 잎상추로 대별된다. 결구상추에서 식물체 재분화에 관한 연구는 Doerschug와 Miller (1967)가 자엽과 배측에서 부정아 형성을 보고한 이래, 다양한 조직을 배양하여 부정아 발생에 미치는 광과 온도의 영향이 밝혀졌다 (Koevary et al. 1978). 또한 결구상추의 현탁배양 세포의 식물체 재분화에 미치는 캘러스와 광원의 질, 탄소원의 종류, 성장호르몬의 농도 등의 영향에 관한 보고가 있었으며 (Teng et al. 1992), 양상추의 자엽으로부터 체세포배발생을 통한 식물

체재분화가 보고되었다 (Zhou et al. 1992).

한편, 국내에서는 Kim 등 (1986)이 잎상추 '청축면'의 엽육조직과 중륜에서 캘러스를 유도하여 캘러스 및 현탁배양으로부터 식물체를 재분화하였다. Kim과 Eun (1992)은 잎상추 '청축면'과 '청치마'의 자엽과 하배측으로부터 캘러스 유도 및 기관분화에 관한 성장조절제의 영향을 조사하였다. 또한 형질전환에 관한 연구는 자엽절편을 재료로 *Agrobacterium*과의 공동배양법으로 양상추 ('South Bay') (Torres et al. 1993) 및 잎상추 ('청축면', '청치마') (Choi et al. 1994) 그리고 품종을 밝히지 않은 상추에서의 *E. coli*의 β -glucuronidase 유전자 (Chung et al. 1998b)와 배추에서 분리된 오존 유도성 유전자 glutathion reductase (Chung et al. 1998a)의 도입이 보고되었다.

식물체 재분화 정도는 동일 종에서도 품종에 따라 큰 차이를 보이는 경우가 많으며 상추도 예외가 아니다 (Alconero

*Corresponding author. Tel 042-860-4430
E-mail jrlu@mail.kribb.re.kr

1983). 국내에서 행하여진 상추의 식물체 재분화는 2품종에 국한되어 있다. 따라서 본 연구는 이제까지 식물체 재분화에 대한 보고가 없었던 일본 결구상추 2품종과 국내 잎상추 4품종 등 6품종에서 기관발생을 통한 고빈도의 식물체재분화 시스템을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료는 일본 결구상추 2품종 ['사쿠라멘트 (Sakurament)', '그리-인골 (Greengoal)']과 잎상추 (*Lactuca sativa* L.) 4품종 ['뚝섬적축면 (Duksum chukchenkmyon)', '뚝섬청축면 (Seoul Green)', '적치마 (Chukchyma)', '만추대청치마 (Summer Ace)'] 종자를 몇 방울의 Tween 20액을 혼합시킨 0.5%의 차아염소산나트륨 (NaOCl)용액에 10분간 표면살균 후 멸균수로 3회 수세하였다. 무기염 농도를 1/2로 희석한 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지를 플라스틱 페트리디쉬 (87×15 mm)에 25 mL 씩 분주한 후, 소독된 종자를 치상하여 22°C, 16시간 광주조건에서 배양하였다. 발아 7~10일된 유식물체의 자엽 (5×5 mm)과 하배축 (5 mm) 절

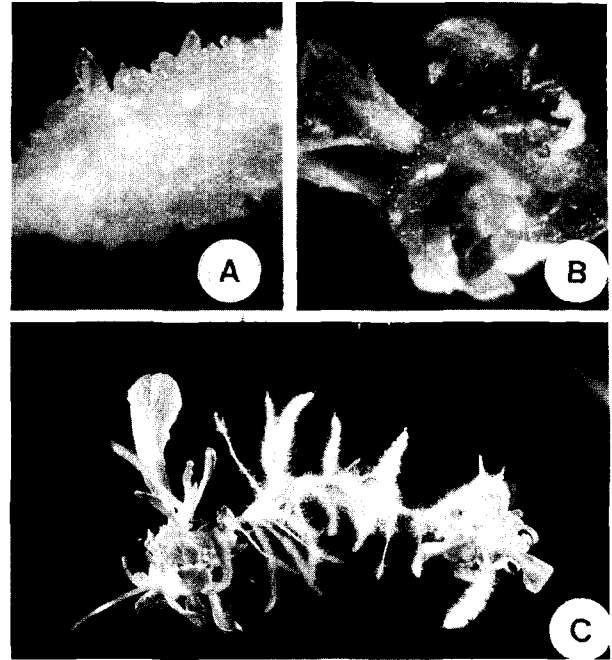


Figure 1. Organogenesis and plant regeneration of lettuce. (A): Adventitious buds on cotyledonary explant; (B): Shoots developed from adventitious buds; (C): Plantlets regeneration from cotyledonary explants.

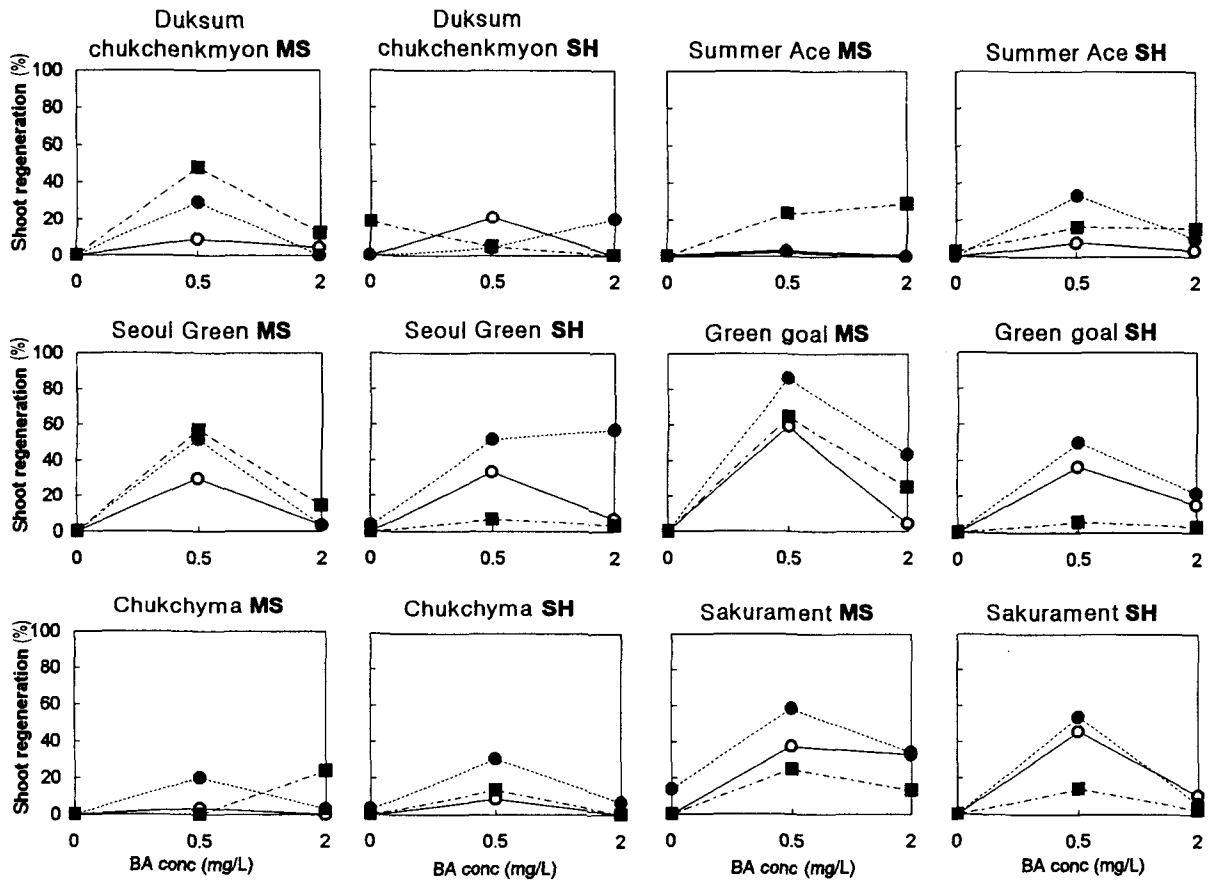


Figure 2. The frequency of adventitious shoot formation on cotyledonary explants of various cultivars in lettuce. Explants were cultured on MS and SH media supplemented with various concentrations of BA and NAA. Data were collected after five weeks of culture. --○-- 0 mg/L NAA; --●-- 0.1 mg/L NAA; --■-- 1 mg/L NAA.

편을 BA (0, 0.5, 2 mg/L)와 NAA (0, 0.1, 1 mg/L)가 조합 처리된 MS (Murashige and Skoog 1962) 및 SH (Schenk and Hildebrandt 1972) 배지에 치상한 후 명배양 (cool-white fluorescent lamps 약 3,000 lux; 16시간/일, 명조건)하여 부정아를 유도하였고, 페트리디쉬 당 절편 25개씩 3반복 시행하였다. 배양 5주 후 각 품종의 부정아 형성률을 조사하였다. 부정아가 2~3 cm 길이의 shoot로 성장하였을 때 기부를 절단하여 성장조절제를 첨가하지 않은 MS 기본배지에서 배양하여 뿌리를 유도하였다.

결과 및 고찰

본 연구에 사용된 모든 품종의 상추에서 기관발생을 통하여 식물체가 재분화되었다. 자엽절편과 하배축을 배양한 결과 자엽절편의 절단면에서는 배양 5일 경과 후부터 부정아가 형성되었고 (Figure 1A), 하배축에서는 약 10일 경과 후부터 형성되었다. 배양기간이 길어지면서 보다 많은 부정아가 형성되어 shoot로 성장하였다 (Figure 1B). 유도된 shoot는 MS기

본배지에서 95% 이상이 발근하여 소식물체로 발달하였다 (Figure 1C). 그러나 배양 6주 이후에는 절편으로부터 더 이상 부정아가 형성되지 않고 서서히 갈변되었다.

자엽과 하배축에서 최적의 부정아 형성률은 품종, 배지, 성장조절제 조합에 따라 차이가 있었다 (Figure 2, 3). 즉, 전체적으로 잎상추보다는 결구상추에서, 하배축보다는 자엽에서, SH보다는 MS 배지에서 부정아 형성률이 높았다. 결구상추 2 품종 ('사크라멘트', '그리-ngo-르')은 BA (0.5 mg/L)와 NAA (0.1 mg/L)가 첨가된 MS배지에서 각각 58.5%와 86.2%로 최고의 부정아 형성률을 나타내었다. 자엽절편에서 최적의 부정아 형성은 '뚝섬적측면'과 '뚝섬청측면'에서 BA (0.5 mg/L)와 NAA (1 mg/L)가 첨가된 MS배지에서 각각 47.8%와 57.1%, '적치마'와 '만추대청치마'에서 BA (0.5 mg/L)와 NAA (0.1 mg/L)가 첨가된 SH배지에서 각각 30.5%와 33.3%로 나타났다 (Figure 2). 하배축은 품종에 따라 30.7% ('그리-ngo-르')에서 75% ('뚝섬적측면')의 다양한 부정아 형성률을 나타냈다 (Figure 3). 따라서 BA는 0.5 mg/L, NAA는 0.1 또는 1 mg/L가 상추의 기관발생을 위한 최적 농도로 나타났다.

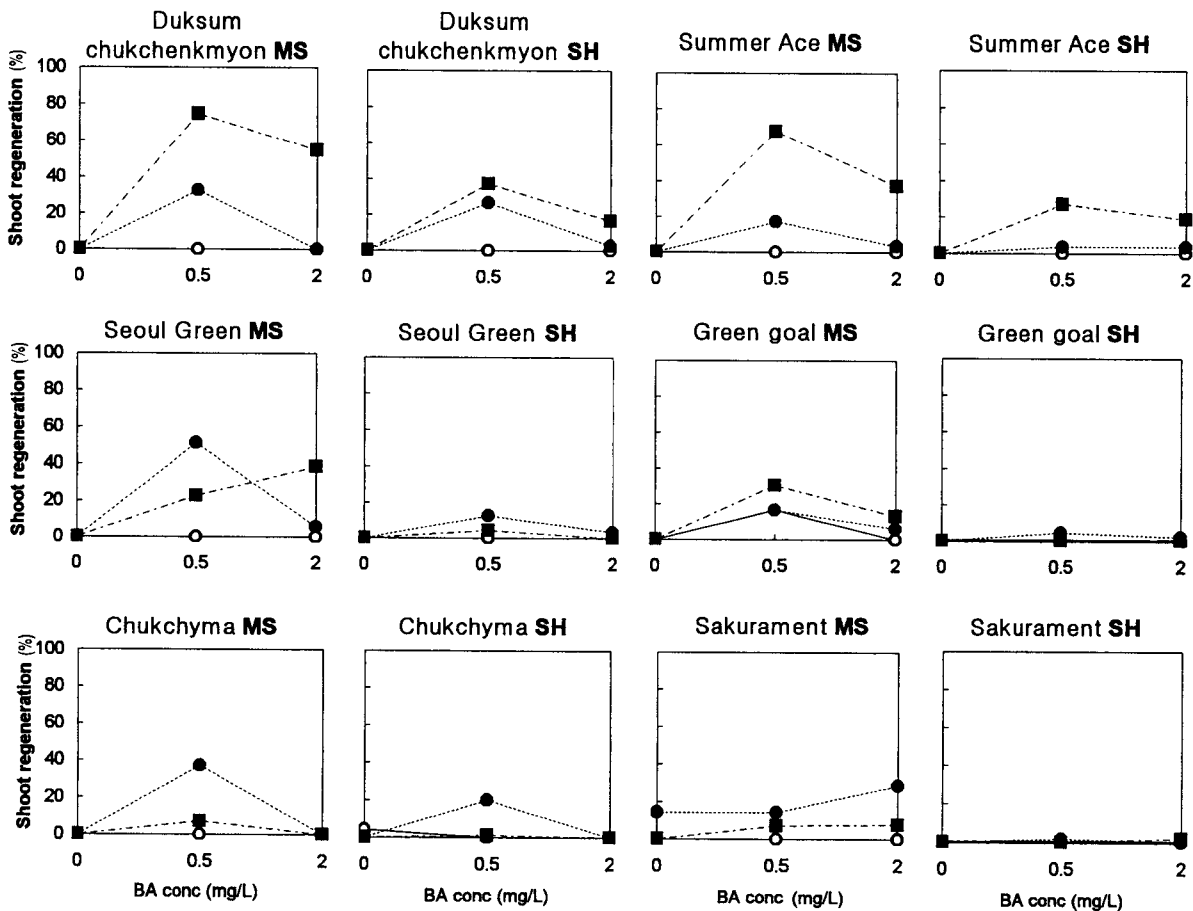


Figure 3. The frequency of adventitious shoot formation on hypocotyl explants of various cultivars in lettuce. Explants were cultured on MS and SH media supplemented with various concentrations of BA and NAA. Data were collected after five weeks of culture. --○-- 0 mg/L NAA; --●-- 0.1 mg/L NAA; --■-- 1 mg/L NAA.

하배측의 경우 캘러스가 형성된 후 부정아가 형성되었고, 자엽에서는 절단면에서 직접 또는 캘러스 발달과 동시에 부정아가 형성되었다. 상추의 하배측은 자엽에 비해 길이가 짧아서 치상재료를 확보하기 어려울 뿐 아니라 부정아의 형성이 느리고 형성되는 부정아의 수도 적었다. 따라서, 식물체 재분화 및 형질전환에는 자엽이 더 적당한 것으로 사료된다.

Kim 등 (1986)은 조직 절편에서 유도된 캘러스 혹은 현탁 배양에서 식물체를 재분화하였으나 본 연구에서는 대부분의 부정아가 캘러스를 통하지 않고 절편에서 직접 생성되었다는 점에서 서로 다르다. 식물체 재분화 시스템을 형질전환에 활용할 때에는 캘러스를 거치지 않고 절편에서 직접 식물체를 유도하는 것이 배양기간을 단축하고 체세포변이의 기회를 줄일 수 있다는 점에서 유리하다. 본 연구의 식물체 재분화 시스템은 자엽과 하배측의 절편으로부터 부정아를 직접 유도하였다는 점에서는 Kim과 Eun (1992)의 결과와 대단히 유사하다. 그러나 Kim과 Eun (1992)은 부정아 형성률을 제시하지 않고 절편 당 형성된 부정아의 평균 수치만 제시하였다. 평균 수치가 높지 않은 점으로 미루어 보아 이들의 부정아 형성률은 본 연구 결과에 비해 매우 낮은 수준인 것으로 보여진다. 이들의 낮은 부정아 형성률은 본 연구와 서로 상이한 품종을 사용하였기 때문일 수 있다.

Alconero (1983)는 상추의 품종간에 재분화율의 차이를 보인다고 보고하였는데 본 연구에서 잎상추보다 일본산 결구상추, 잎상추 품종에서는 '적치마'와 '만추대청치마'보다 '뚝섬적측면'과 '뚝섬청측면'이 높은 부정아 형성률을 나타내었다. Kim과 Eun (1992)은 '청치마'와 '청측면' 품종간의 다소 차이는 있지만 자엽이 하배측보다 부정아 형성률이 높으며, 자엽의 경우 최고 37%의 형성률을 나타내어 본 연구 결과와 유사하나, 하배측은 최고 6.6%로서 본 연구결과보다 월등히 낮는데 이는 대체로 품종간 차이에서 기인한다고 보여진다.

본 연구에서는 이제까지 식물체 재분화가 보고된 바 없는 2품종의 양상추와 4품종의 잎상추의 고빈도 식물체 재분화 시스템을 제시하였다. 이 시스템은 향후 상추의 분자육종에 의한 품종개량에 이용될 수 있을 것이다.

적 요

부정아를 유도하기 위하여 발아 7~10일된 일본 결구상추 2품종과 국내 잎상추 (*Lactuca sativa* L.) 4품종의 하배측 및 자엽절편으로부터 식물체 재분화시스템을 확립하였다. 하배측 및 자엽절편을 BA와 NAA가 조합 처리된 MS 및 SH 배지에 치상하여 5주 동안 명배양하였다. 일반적으로 하배측보다는 자엽절편에서, SH 배지보다는 MS 배지에서 배양하였을 때 부정아 형성률이 높았다. MS배지에 BA는 0.5 mg/L, NAA는 0.1~1 mg/L로 처리하였을 때 최고의 부정아 형성률을 보였으며, 품종에 따라 30% ('만추대청치마')에서

86% ('그리-노골')까지의 부정아 형성률을 나타내었다. 형성된 shoot의 95% 이상이 MS 기본배지에서 발근하여 소식물체로 발달하였다.

사사 - 본 논문은 과학기술처 국책과제 (NB0520)의 연구결과이다. 원고에 대하여 세심한 논평과 수정을 가해준 이행순, 김재훈 박사에게 감사한다.

인용문헌

- Alconero R (1983) Regeneration of plant from cell suspension of *Lactuca saligna*, *Lactuca sativa*, and *Lactuca serriola*. HortScience 18:305-307
- Choi UO, Yang MS, Kim MS, Eun JS, Kim KS (1994) Genetic transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with *Agrobacterium tumefaciens*. Kor J Plant Tiss Cult 21:55-58
- Chung JD, Kim CK, Jo JK (1998a) Expression of chinese cabbage glutathione reductase gene in lettuce (*Lactuca sativa* L.). Kor J Plant Tiss Cult 25:267-271
- Chung JD, Kim CK, Kim KM (1998b) Expression of -glucuronidase (GUS) gene in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) and its progeny analysis. Kor J Plant Tiss Cult 25:225-229
- Doerschug MR, Miller CO (1967) Chemical control of adventitious organ formation in *Lactuca sativa* explant. Am J Bot 54:410-413
- Kim MS, Eun JS (1992) The effect of growth regulators of callus induction and organ differentiation of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Bull Rural Soc, Chonbuk Nat' Univ 3:67-81
- Kim YH, Kim HI, Kim MS, Ham CY (1986) Callus induction, plant regeneration of lettuce and organogenesis from its suspension cultd cells. Kor J Plant Tiss Cult 13:23-28
- Koevary K, Rappaport L, Morris LL (1978) Tissue culture propagation of head lettuce. HortScience 13:39-41
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-479
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell culture. Can J Bot 50:199-204
- Teng WL, Liu YJ, Soong TS (1992) Rapid regeneration of lettuce from suspension culture. HortScience 27: 1030-1032
- Torres AC, Cantliffe DJ, Laughner B, Bieniek M, Nagata R, Ashraf M, Ferl RJ (1993) Stable transformation of lettuce cultivar South Bay from cotyledon explant. Plant Cell Tiss Organ Cult 34:279-285
- Zhou X, Han Y, Yang W, Xi T (1992) Somaic embryogenesis and analysis of peroxidase in cultured lettuce (*Lactuca sativa* L.) cotyledons. Ann Bot 69:97-100