

국내 딸기 재배품종의 잎절편 배양으로부터 고빈도 식물체 재생

조미애¹, 최규명⁴, 고석민¹, 민성란³, 정화지³, 유장렬³, 최필선^{2*}

¹유진텍부설연구소, ²남부대학교 생약자원학과, ³한국생명공학연구원 식물세포공학실험실, ⁴(주)젠닥스

High Frequency Plant Regeneration from Leaf Explant Cultures of Domestic Cultivated Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch)

Mi Ae Cho¹, Kyu Myeong Choi⁴, Suck Min Ko¹, Sung Ran Min³, Hwa Ji Chung³, Jang Ryol Liu³, Pil Son Choi^{2*}

¹Eugentech Inc, Taejeon 305-606, Korea, ²Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon, 305-353, Korea

²Department of Medicinal Plant Resources, Nambu University, Kwangju 506-824, Korea

³Plant Cell Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Taejeon 305-606, Korea

⁴GenDocs Inc. Taejeon 305-811, Korea

ABSTRACT To develop a high efficiency plant regeneration system from *in vitro* cultures of strawberry, cv. Yeobong, petiole and leaf explants were cultured on MS basal medium containing a combination of 0.5 mg/L IBA and 3.2 mg/L kinetin or zeatin or benzyl amino purine (BAP) for 6 weeks, and leaf explants with dark pretreatment for a week (T₁), 2 weeks (T₂), and 4 weeks (T₃) were cultured on medium supplemented with 0.5 mg/L IBA and 3.2 mg/L zeatin under 16 hr photoperiod for 6 weeks. Shoot organogenesis was observed from the greenish calli containing minimal anthocyanin formed at proximal cutting edges of the leaf explant (57%) when cultured adaxial side on the medium, whereas was directly formed from a cutting edges of petiole explant (6.3%). Frequency of callus formation and shoot organogenesis at large size of leaf explant (1.0~1.5 cm²) was higher than small size (0.5~1.0 cm²), and dark pretreatment significantly improved the frequency of leaf explants that produced calli and shoots. The maximum frequency (87%) for shoot organogenesis was obtained from the leaf explants that transferred to a 16 hr photoperiod condition after the initial 4 weeks dark period. The improved frequency (87%) in comparison with control without dark pretreatment (27%). When the shoots were transferred to 1/2 MS basal medium, formed roots with 20 d of culture. The rooted plants were subsequently transferred to the pots and to the field.

Key words: Adaxial, dark pretreatment, leaf size, shoot organogenesis, strawberry

서 론

장미과에 속하는 딸기는 과채류로서 전국 농가에서 재배되는 중요한 소득작물이다. 딸기 재배시 발생하는 점박이응애, 잿빛 곰팡이병 및 흰가루병이나 겨울철에 나타나는 냉해 등은 생육 및 생산량 감소뿐 아니라 열매의 크기를 감소시키는 중요한 저해요인 되기 때문에 (Hepworth

and MacFarlane 1992; Kahangi et al. 1992) 잎 절편 또는 엽병 배양기술을 이용한 고빈도 식물체재분화 (Mesa and Jimenez-Bermudez 2000)와 *Agrobacterium*형질전환법 (Barcelo et al. 1998)을 이용한 신 품종개발 연구가 진행되고 있다.

딸기의 기내식물체 재생연구는 경단분열조직배양을 통한 대량생산 방법이 처음으로 보고된 후 (Boxus 1974), 식물체 재생빈도를 높이기 위한 다양한 품종 스크리닝 연구 (Passey et al. 2003), 계대배양 기간 (Nehra and Stushnoff 1989), 약배양 (Svensson and Johansson 1994), 미숙배배양

*Corresponding author Tel 82-62-970-0161 Fax 82-62-970-0165

E-mail: cps6546@nambu.ac.kr

(Wang et al. 1984), 엽병배양 (Jones et al. 1988), 탁엽배양 (Rugini and Orlando 1992) 및 성숙한 자엽배양 (Miller and Chandler 1990) 등 많은 연구가 이루어져 왔다. 특히 여러가지 요인 중, 식물생장조절제의 적정농도 및 조합 선정 (Cho et al. 2001)과 물리적 요인으로서 암 전처리는 (Mesa and Jimenez-Bermudez 2000; Nehra and Stushnoff 1989) 잎절편으로부터 식물체 재생율을 증가시킨 가장 중요한 예로서 싸이토키닌 단독 처리보다는 옥옥신과 싸이토키닌을 조합 처리하였을 때 기관 발생율이 현저하게 증가되고 (Cho et al. 2001), 연속적으로 명배양을 하거나 암 배양을 하는 것보다 배양초기에 낮은 광도 하에서 배양하거나 일정기간 동안 암 전처리한 후 광조건으로 옮겨 배양하면 부정아 형성율이 증가되는 것으로 알려져 있다 (Barcelo et al. 1998; Mesa and Jimenez-Bermudez 2000; Nehra and Stushnoff 1989; Passey et al. 2003). 또한 *Agrobacterium*과 공동배양 시 급격하게 감소되는 재분화율을 높이기 위해 (Barcelo et al. 1998; Nehra et al. 1990) 배지에 silver nitrate 등의 성분을 첨가하는 방법도 개발되었다 (Reed and Tsao 2002). 이와 같이 딸기의 고빈도 식물체 재생방법은 여러가지 요인에 의해 결정되며, 이는 안정적, 반복적 형질 전환시스템을 확립하는데 가장 중요한 선결 과제라 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 국내의 재배품종으로 알려진 “여봉딸기”에서 안정적인 형질전환방법을 확립할 목적으로 최적 배양절편, 호르몬조합 및 암 전처리 등에 대한 영향을 조사하여 고빈도 재분화방법을 확립하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

식물 재료

국내 주요 재배 품종인 “여봉딸기” 식물체를 논산 딸기시험장으로부터 분양 받았다. 토양에서 성숙한 식물체의 줄기 부위를 절단한 후 70% 알코올로 2회, 1.5% sodium hypochloride 용액에 15분간 표면 살균한 후, 무균작업대에서 경단분열조직을 절취하였다. 경단분열조직을 1/2 MS 기본배지 이식하여 약 3개월 동안 배양한 후 무균 식물체를 얻었고, 이러한 식물체의 잎과 엽병을 취하여 배양재료로 이용하였다.

식물체 재생

성숙한 식물체의 잎과 엽병으로부터 부정아 발생에 대한 최적 호르몬조합과 잎 절편 배양방법을 선정하기 위하여 0.5~1.0 cm² 크기의 잎 절편과 1 cm 길이의 엽병 절편을 3가지 호르몬 조합 (0.5 mg/L IBA + 3.2 mg/L kinetin, 0.5

mg/L IBA + 3.2 mg/L zeatin, 0.5 mg/L IBA + 3.2 mg/L BAP)으로 첨가된 MS 기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에 6주 동안 16시간 광주기하에서 배양하였다. 이때 잎 절편은 adaxial과 abaxial 상태로 나누어 치상하였다. 또한 잎 절편 크기에 따른 캘러스 형성과 부정아 형성빈도를 알아보기 위하여 0.5~1.0 cm²와 1.0~1.5 cm² 크기로 절단하여 0.5 mg/L IBA와 3.2 mg/L zeatin 또는 BAP를 각각 첨가한 MS 배지에서 배양하였다.

또한 부정아 형성에 대한 암 전처리 효과를 알아보기 위하여 잎 절편의 크기를 1.0~1.5 cm² 절단하여 0.5 mg/L IBA와 3.2 mg/L zeatin 첨가배지에서 1주 (T₁), 2주 (T₂), 4주 (T₃) 동안 암 처리한 후 새로운 배지로 옮겨 6주 동안 광주기하에서 배양하였고, 대조군은 암 처리를 하지 않았다. 배지는 7 g/L purified Agar를 첨가하기 전 pH를 5.8로 조정하여 121°C, 1.2기압에서 15분간 고압 멸균 후 90×15 mm 플라스틱 페트리디쉬에 25 mL씩 분주하여 사용하였으며, 페트리디쉬당 6개의 잎 절편을 치상하였다. 명배양 6주째 캘러스 또는 부정아 형성빈도를 조사하였고, 이후 절편으로부터 분리한 캘러스를 0.5 mg/L IBA와 3.2 mg/L zeatin이 첨가된 MS 배지에서 증식시키면서 부정아를 유도하였다. 캘러스로부터 형성된 부정아는 1/2 MS 기본배지에서 배양하면서 완전한 소식물체로 생육시켰으며, 모든 실험은 각 처리군당 30개씩 3회 반복하였다.

결과 및 고찰

딸기의 안정적, 반복적 형질전환방법을 확립하기 위해서는 최적 호르몬조합, 배양방법 및 배양절편 등을 고려한 고빈도 식물체 재분화 방법이 먼저 확립되어야 한다 (Barcelo et al. 1998; Nehra and Stushnoff 1989). 국내 재배품종인 “여봉딸기”로부터 부정아 형성빈도를 조사하기 위하여 잎과 엽병절편을 3가지 호르몬조합으로 첨가한 배지에서 6주 동안 명 배양한 결과, 엽병의 경우는 대부분 아무런 변화없이 점차 갈변되면서 괴사하거나, 캘러스 형성 없이 직접 부정아 (6.3%)를 형성하기도 하였다. 반면 잎의 경우는 엽병과 다르게 배양 3주정도 되었을 때 부분적으로 적색의 안토시아닌을 함유한 녹색의 단단한 캘러스를 형성한 후 배양 5주째부터 부정아가 발생되었다. 잎은 abaxial보다는 adaxial 상태로 치상하였을 때 부정아 형성율이 높았으며, 싸이토키닌으로는 kinetin보다는 zeatin과 BAP를 0.5 mg/L IBA와 조합첨가 하였을 때 효과적인 것으로 나타났다 (Figure 1, Table 1). 그러나 싸이토키닌을 단독 첨가한 배지에서는 부정아가 발생되지 않았다 (데이터 미제시). 한편, 0.5 mg/L IBA에 3.2 mg/L zeatin과 BAP를 각각 조합한 2개의 배지에서 잎 절편의 크기에 따른 캘러스 형성과 부정아 형성빈도를 조사한 결과 잎 절편의 크기가 클수록 캘러스 형성과

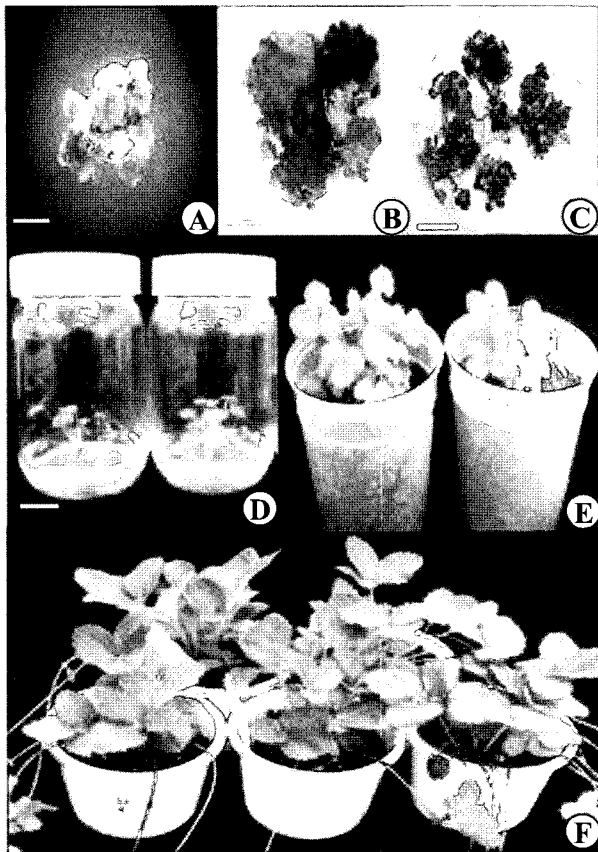


Figure 1. Plant regeneration from leaf explant cultures of domestic cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) that transferred to fresh same medium under 16 hr photoperiod after dark pretreatment on MS medium supplemented with 0.5 mg/L IBA and 3.2 mg/L zeatin for 4 weeks (T₃). A: Callus formed from leaf explant (bar = 0.5 cm); B (bar = 1.5 cm), C (bar = 15 cm): Shoot organogenesis; D: Plantlets in culture bottle (bar = 40 cm); E, F: Plant grown in soil.

부정아 형성빈도가 높았고, 특히 캘러스 형성은 0.5 mg/L IBA와 3.2 mg/L zeatin이 첨가된 배지에서, 부정아 형성은 0.5 mg/L IBA와 3.2 mg/L BAP가 첨가된 배지에서 높았다. 즉 오옥신에 zeatin을 첨가할 경우 딸기 잎절편으로부터 캘러스 형성은 왕성하게 일어났으나, 이러한 캘러스로부터 부정아는 적게 발생되었으며, BAP를 첨가할 경우 캘러스 형성은 낮았으나 이미 형성된 캘러스로부터 부정아 형성은 잘 이루어짐을 알 수 있었다 (Table 2).

일반적으로 딸기의 배양절편은 잎이 가장 많이 사용되며, 95%의 높은 식물체 재분화율을 보인다 (Rugini and Orlando 1992; Nehra and Stushnoff 1989). 잎은 abaxial보다는 adaxial상태로 치상할 때 배지에 첨가된 호르몬을 잘 흡수하여 체세포 배발생이나 부정아 발생을 촉진하는 것으로 알려져 있고 (Chen and chang 2002; Lo et al. 1997), 딸기의 경우 사이토키닌 단독처리보다는 오옥신과 조합처리하는 것이 효과적인 것으로 알려져 있다. 특히 0.1 mg/L 2,4-D와 3.0 mg/L BAP를 조합 첨가한 배지에서 절편당 21.5개의 부정아가 발생되며 (Cho et al. 2001), 배양절편의 크기가 클수록 부정아 형성율이 높은 것으로 보고되어 있다 (Choi et al. 2003; Zhou et al. 1992). 이와 같이 기 연구에서처럼 본 연구에서도 딸기 잎절편으로부터 부정아는 캘러스를 형성한 후 부정아가 발생되며, 이때 오옥신과 사이토키닌이 조합 첨가된 배지에서 잎 절편을 adaxial상태로 배양하는 것이 가장 효과적이고, 배양절편은 클수록 좋은 것으로 확인되었다.

잎절편으로부터 캘러스 및 부정아형성에 대한 암 전처리 효과를 조사한 결과 1주동안 암 전처리 하였을 경우 (T₁) 50.3%의 잎절편으로부터 캘러스를 형성하였고, 이중 27%의 캘러스로부터 부정아를 형성하여 대조군 (27%)과 큰 차

Table 1. Frequency (%) of shoot organogenesis from leaf and petiole explant cultures of strawberry (cv. Yeobong) on MS solid medium supplemented with a combinations of 0.5 mg/L IBA and cytokinins under 16 hr photoperiod

(mg/L)	Leaf surface cultured on the medium		Petiole
	Abaxial	Adaxial	
Kinetin 3.2 + IBA	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.00
Zeatin 3.2 + IBA	20.0 ± 0.10	27.3 ± 1.00	0.0 ± 0.00
BAP 3.2 + IBA	10.1 ± 0.10	57.0 ± 0.50	6.3 ± 0.20

Table 2. Effects of leaf explant size for calli formation and shoot organogenesis from leaf explant cultures of strawberry (cv. Yeobong) on MS solid medium supplemented with a combinations of 0.5 mg/L IBA and cytokinins (BAP or zeatin) under 16 hr photoperiod

(cm ²)	Units (mg/L)	Percentage (%) of response / explant	
		Callus	Shoot organogenesis
1.0~1.5	BAP3.2 + IBA	10.1 ± 0.10	13.0 ± 0.20
	Zeatin 3.2 + IBA	30.3 ± 1.20	7.0 ± 0.10
1.5~2.5	BAP3.2 + IBA	40.0 ± 2.00	30.9 ± 0.40
	Zeatin 3.2 + IBA	60.0 ± 0.70	17.6 ± 0.30

Table 3. Effects of dark pretreatment for calli formation and shoot organogenesis from leaf explant cultures of strawberry (cv. Yeobong) on MS solid medium supplemented with a combinations of 0.5 mg/L IBA and 3.2 mg/L zeatin

Treatments	Percentage (%) of response / explant	
	Callus	Shoot organogenesis
Control	47.1 ± 0.52	27.0 ± 0.30
T ₁	50.3 ± 1.20	27.1 ± 1.00
T ₂	63.7 ± 2.20	37.3 ± 1.10
T ₃	90.4 ± 2.10	87.0 ± 1.70

Leaf explants were incubated on MS medium with 3.2 mg/L zeatin and 0.5 mg/L IBA under a 16 hr photoperiod for 6 weeks (control) after dark pretreatment for 1 (T₁), 2 (T₂), and 4 (T₃) weeks on the same medium.

이를 보이지 않았다. 그러나 2주동안 암 전처리 하였을 때 캘러스와 부정아 형성율은 각각 63.7%와 37.3%로 약간씩 증가하였으며, 4주동안 암 전처리 하였을 경우 90.4%와 87%로 대조군에 비하여 각각 43.3%와 60%씩 증가하였다 (Table 3). 식물조직배양에서 암 처리는 기관발생율을 높일 수 있으며 (Canli 2003; Compton 1999; Mesa and Jimenez-Bermudez 2000; Nehra and Stushnoff 1989; Passey et al. 2003), 특히 암 조건에서 자란 황색의 강낭콩 배축은 광 조건에서 자란 녹색줄기보다 기관발생율이 높은 것으로 알려져 있다 (Herman and Hess 1963). 이는 녹색줄기에 비하여 황색줄기는 얇은 세포벽, 미분화된 유관속계, 많은 유조직 세포, 적은 페놀화합물의 침적 (Christiansen and Warnick 1983) 등의 특징을 갖기 때문에 배지에 첨가된 식물호르몬이 기관발생능을 갖는 표적세포로 쉽게 이동될 수 있어 나타난 현상으로 추측하고 있으며, 또한 빛은 배지에 첨가된 식물호르몬의 작용기작을 직접 조절함으로써 기관발생빈도에 영향을 주는 것으로도 알려져 있다 (Burrirt and Hunter 2004). 이와 같이 수박, 장미를 포함한 많은 작물의 기관발생율과 암 전처리는 밀접한 관계가 있었으며, 딸기 잎 절편에서도 확인할 수 있었다.

따라서 국내 딸기 재배품종인 “여봉”의 잎 절편으로부터 고빈도 식물체재생은 잎 절편을 1.0~1.5 cm²크기로 절단하여 0.5 mg/L IBA와 3.2 mg/L zeatin이 첨가한 배지에 adaxial상태로 치상하여 4주동안 암처리한 후 다시 명조건 하에서 6주동안 배양하였을 때 얻을 수 있었으며, 이는 연속적인 명조건하에서 얻은 57%의 부정아 발생율을 87%까지 증가시킨 최적 배양조건이라 할 수 있으며, 이러한 딸기의 고빈도 식물체 재생시스템은 향후 안정적, 반복적 형질 전환시스템개발에 이용될 수 있을 것이다.

적 요

딸기 기내배양으로부터 고빈도 식물체재생 방법을 개발하기 위하여 여봉딸기의 잎과 엽병절편을 0.5 mg/L IBA와

3.2 mg/L kinetin, BAP, zeatin을 각각 조합 첨가한 MS배지에서, 그리고 1주, 2주, 4주동안 암 전처리한 잎 절편을 0.5 mg/L IBA와 3.2 mg/L zeatin이 첨가된 배지에서 6주동안 16시간 광주기 조건으로 배양하였다. 신초 발생은 잎을 adaxial상태로 치상하였을 때 절단부위로부터 안토시아닌 색소를 함유한 녹색 캘러스로부터 유도되었고 (57.0%), 엽병의 경우 절단부위로부터 직접 발생되었다 (6.3%). 캘러스와 신초발생율은 잎 절편 크기가 클수록 (1.0~1.5 cm²) 높았으며, 암 전처리는 그 발생율을 점차 증가시켜 4주동안 암 전처리한 후 16시간 광조건으로 옮겼을 때 가장 높은 발생율 (87.0%)을 얻을 수 있었다. 이러한 shoot발생율 (87%)은 암 전처리를 하지 않은 대조군 (27%)에 비하여 현저하게 증가된 것이다. 신초를 분리하여 1/2 MS기본배지에 옮겨 20동안 배양하였을 때 뿌리가 발생되었으며, 이때 소식물체를 토양에 옮겨 순화시켰다.

사 사

본 연구는 바이오그린21사업단 (Biogreen21)과 작물유전체사업단 (Crop Functional Genomics)의 지원하에 수행되었으며, “여봉딸기” 식물체를 공급해준 논산딸기시험장에 감사한다.

인용문헌

- Barcelo M, El-El-Mansouri I, Mercado JA, Quesada MA, Alfaro FP (1998) Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. *Plant Cell Tiss Org Cult* 54: 29-36
- Boxus P (1974) The production of strawberry plants by in vitro micropropagation. *J Hort Sci* 49: 209-210
- Burrirt DJ, Hunter DC (2004) Light quality influences adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40: 215-220

- Canli FA (2003) Effects of dark and TDZ on callus formation of rose leaf explants. *Paki J Biol Sci* 6: 1672-1674
- Chen JT, Chang WC (2002) Effects of tissue culture conditions and explant characteristics on direct somatic embryogenesis in *Oncidium* "Gower Ramsey". *Plant cell Tiss Org Cult* 69: 41-44
- Cho DY, Soh WY, Chung WI (2001) Effect of medium component on plant regeneration via adventitious bud formation from leaf explant cultures of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). *Kor J Plant Biotech* 28: 173-178
- Choi PS, Cho DY, Soh WY (2003) Plant regeneration from immature embryo cultures of *Vigna unguiculata*. *Biol Planta* 47: 305-308
- Christiansen ML, Warnick DA (1983) Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis. *Dev Biol* 95: 288-293
- Compton ME (1999) Dark pretreatment improves adventitious shoot organogenesis from cotyledons of diploid watermelon. *Plant Cell Tiss Org Cult* 58: 185-188
- Hepworth G, MacFarlane JR (1992) Systematic presence-absence sampling method applied to two spotted spider mite on strawberries in Victoria, Australia. *J Econ Entomol* 85: 2234-2239
- Herman DE, Hess CE (1963) The effect of etiolation upon the rooting of cutting. *Proc Intl Plant Prop Soc* 13: 42-62
- Jones OP, Waller BJ, Beech MG (1988) The production of strawberry plants from callus cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* 12: 235-241
- Kahangi EM, Fujime Y, Nakamura E (1992) Effects of chilling and growth regulators on runner production of three strawberry cultivars under tropical conditions. *J Hortic Sci* 67: 381-384
- Lo KH, Giles KL, Sawhney VK (1997) Acquisition of competence for shoot regeneration in leaf discs of *Saintpaulia ionantha* x *confuse* hybrids (African violet) cultured *in vitro*. *Plant Cell Rep* 16: 416-420
- Mesa CM, Jimenez-Bermudez S (2000) *Agrobacterium* cells as microprojectile coating: A novel approach to enhance stable transformation rates in strawberry. *Aut J Plant Phys* 27: 1093-1100
- Miller AR, Chandler CK (1990) Plant regeneration from excised cotyledon of mature strawberry achenes. *HortSci* 25: 569-571
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nehra NS, Stushnoff C (1989) Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks. *J Amer Soc Hort Sci* 114: 1014-1018
- Nehra NS, Chibbar RN, Kartha KK, Datla RSS, Crosby WL, Stushnoff C (1990) Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. *Plant Cell Rep* 9: 293-298
- Passey AJ, Barrett KJ, James DJ (2003) Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) using a range of explant types. *Plant Cell Rep* 21: 397-401
- Rugini E, Orlando R (1992) High efficiency shoot regeneration from calluses of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) stipules of *in vitro* shoot cultures. *J Hort Sci* 67: 577-582
- Svensson M, Johansson LB (1994) Anther culture of *Fragaria x ananassa*: Environmental factors and medium components affecting microspore divisions and callus production. *J Hort Sci* 69: 417-426
- Reed BM, Tsao CWV (2002) Gelling agents, silver nitrate, and sequestrene iron influence adventitious shoot and callus formation from *Rubus* leaves. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 38: 29-32
- Wang DY, Wergin WP, Zimmerman RH (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of strawberry. *HortSci* 19: 71-72
- Zhou J, Ma G, Luo Z (1992) Direct formation of flowers from excised cotyledons of cucumber. *Chin Sci Bull* 37: 1905-1908

(접수일자 2005년 6월 26일, 수리일자 2005년 9월 5일)