

고추의 조직을 이용한 생장조절제 처리가 식물체 재분화 효율에 미치는 영향

이문중¹ · 권태룡¹ · 신동현² · 한증술³ · 김경민 · 김창길 · 오중열*

상주대학교 원예학과, ¹경북농업기술원, ²경북대학교 식물생명공학부, ³원예연구소

Received July 21, 2006 / Accepted August 22, 2006

Efficient Regeneration of Plants Independent of Exogeneous Growth Regulators Using Tissues in Pepper (*Capsicum annuum* L.). Moon-Jung Lee¹, Tae-Roung Kwon¹, Dong Hyun Shin², Jung-Sul Harn³, Kyung-Min Kim, Chang Kil Kim and Jung-Youl Oh*. *Department of Environment Horticulture, Sangju National University, Sangju, 742-711, Korea, ¹Gyeongbuk Agricultural Technology Administration, Daegu, 702-708, Korea, ²Department of Agronomy, College of Agriculture and Life Sciences, Kyunpook National University, Daegu, 702-701, Korea, ³National Horticultural Research Institute, Rural Development Administration, Suwon, 441-440, Korea* – The study was carried out to develop efficiency of transformation in pepper plants. We used cotyledons of two native varieties, 'Subicho' and 'Kumtap' to establish some conditions of plant regeneration. Differentiation rate of shoot was higher in 2 to 4 mg/l zeatin and 0.05 mg/l NAA than in other treatments. Meanwhile, differential rate of roots was the highest in 0.5 mg/l NAA.

Key words – Pepper, plant regeneration, differentiation, zeatin

서 론

고추는 자식과 타식을 겸하는 작물로서 타식율이 5~30%로 높아서 자식에만 의존하는 작물에 비하여 고정계통 육성에 시간과 노력이 많이 소요되는 단점이 있다. 또한 고추에 대한 재배농민의 선호도와 소비자의 기호가 다양해지면서 신품종 육성에도 유전자원의 활용 폭이 넓어지고 효율적인 육종방법의 개발에도 다양한 연구가 수행되고 있지만, 아직까지도 역병이나 탄저병과 같은 주요병해에 저항성을 나타내는 내병성 품종의 개발성고가 미흡한 것이 가장 큰 문제점이다. 그리고 응성불임성을 이용하여 육성된 일대잡종의 종자는 순도 문제가 아직도 미해결 과제로 남아 있는 실정이다.

최근 분자생물학이 발전하면서 외래의 DNA를 식물체내에 직접 도입하여 목적형질을 개량하는 형질전환법이 작물의 품종개량에 실용적으로 이용되면서 기존 육종 방법의 단점을 크게 개선할 수 있다는 점에서 육종전반에 걸쳐 폭 넓은 이용이 전망되고 있다. 식물 세포수준에서 이루어지는 이러한 생명공학 기술의 응용에서 가장 기본이 되는 것은 세포나 조직으로부터 식물체를 성공적으로 재분화시킬 수 있는 조직배양 시스템의 확립이 선결과제인데, 고추에서는 Gunay와 Rao[10]가 자엽과 하배측으로부터 식물체 재분화에 성공한 이래로 원형질체[6], 체세포배[3], 제 1 본엽[12]등을 배양하여 식물체를 재분화시킨 예가 있으나 그 효율은 다른 작물에 비해 낮은 실정이다.

따라서 본 실험은 고추의 자엽조직을 이용하여 식물체재

분화 효율을 향상시킬 수 있는 최적의 식물체재분화 배지를 구명하고, 나아가 고추 형질전환 연구에 기초 자료를 제시하고자 수행하였다.

재료 및 방법

고추의 식물체 재분화 배지조건을 구명하기 위하여 경북 북부지방에서 재래종으로 재배되고 있는 '수비초'와 '금탑'의 자엽과 본엽의 조직을 이용하였다. 종자는 70% ethanol에서 30초, 2% NaOCl에서 15분간 소독한 후 멸균수로 3회 세척하여 MS[13]기본배지가 분주된 배양병당 20~30립씩을 치상하여 16시간 일장 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ 의 cool-white 형광, 25±2°C에서 배양실에서 발아시켰다. 발아 후 10~14일째에 자엽을 엽병 1~2 mm 정도를 포함하도록 절단하여 재분화 효율 구명을 위한 재료로 사용하였다.

Shoot를 유도하기 위해 MS배지에 zeatin 1, 2, 3, 4, 5 mg/l처리, BA 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/l처리와 zeatin 2, 3, 4 mg/l와 NAA 0.01, 0.05, 0.1 mg/l를 조합하여 이용하였다. Root를 유기하기 위해서 MS배지에 NAA 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mg/l와 IAA 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mg/l를 첨가하였다. 치상수는 처리당 10 조직 4반복으로 하였고, 배양환경은 온도 25±1°C, 16시간 명조건에서 배양하였으며, 분화율은 치상 후 30일 경과 후 조사하였다.

결과 및 고찰

고추의 자엽조직(Fig. 1A)으로부터 shoot 분화를 위해 4 mg/l zeatin을 첨가했을 때 신초 분화율이 '수비초' 60%, '금

*Corresponding author

Tel : +82-54-530-5234, Fax : +82-54-530-5239

E-mail : jyoh@sangju.ac.kr

답'80 %로 높았고 (Table 1, Fig 1B), BA의 경우 '수비초'는 10 mg/l에서 50%, '금탑'은 8 mg/l에서 65.0%였다 (Table 2). 적절한 shoot 분화를 위해서는 BA의 경우 Zeatin보다 2배 정도의 농도가 필요하였으며, 두 생장조절제에서 재래 고정종인 '수비초'보다 시판 교잡종인 '금탑'의 shoot 분화율이 높았다. Zeatin과 NAA 혼용시 (Table 3) '수비초'와 '금탑'에서 Zeatin 2~4 mg/l에서 NAA 0.05 mg/l 혼용에서 신초의 분화율이 90% 이상 이었고, NAA 0.1 mg/l에서는 신초 분화율이 떨어지는 경향이였다. Zeatin과 NAA 혼용할 경우 분화율은 높았지만, callus의 성장으로 초기 신초의 성장에 다소 영향이 있었다.

고추 조직배양에서 식물체 재분화 능력이 genotype 간에 큰 차이를 보인다는 것은 여러 연구자들에 의해 보고되었는데, Ochoa-Alejo와 Ireta-Moreno[14]는 하배축을 재료로 16개의 genotype에 대한 식물체 재분화능력을 비교한 바, 재분화능력이 높은 것과 보통 그리고 거의 안 되는 것으로 구분

Table 1. Effect of zeatin concentration on shoot regeneration from cotyledon culture of red pepper

Zeatin (mg/L)	Shoot regeneration (%)	
	Subicho	Kumtap
1	30.0	33.3
2	28.3	56.7
3	36.7	58.3
4	60.0	80.0
5	65.0	78.3

Table 2. Effect of BA concentration on shoot regeneration from cotyledon culture of red pepper

BA(mg/L)	Shoot regeneration (%)	
	Subicho	Kumtap
1	6.7	1.7
2	25.0	43.3
4	41.7	46.7
6	46.7	51.7
8	41.7	65.0
10	50.0	53.3

Table 3. Effect of zeatin and NAA concentration on shoot regeneration from cotyledon culture of red pepper

Plant growth regulators (mg/L)		Shoot regeneration (%)	
Zeatin	NAA	Subicho	Kumtap
2	0.01	82.0	90.0
	0.05	98.0	90.0
	0.1	98.0	80.0
3	0.01	80.6	85.2
	0.05	94.6	96.3
	0.1	88.9	97.2
4	0.01	97.2	77.8
	0.05	100.0	100.0
	0.1	100.0	51.9

되었으며 이들의 재분화능력은 배지조성이 바뀌어도 큰 차이가 없었다고 하였다. Dabauza와 Pena[5]는 10개의 genotype에 대하여 7 가지 배양조직에 따라 식물체 재분화율을 조사한 바, 배양 조직의 종류보다는 genotype에 따라 식물체 재분화율의 차이가 뚜렷함을 보고하였다. 본 연구에서도 고추 genotype 간에 식물체 재분화율의 차이가 나타났으나 배지내에 식물생장호르몬의 조성에 따라 genotype 차이가 크게 나타나지 않아 Christopher와 Rajam[4]의 연구와는 차이가 나는 경향을 나타내었다.

고추의 조직배양은 Dix와 Street[7]가 고추 영양체 조직으로부터 캘러스를 유기하고 증식시킨 이래로 Gunay와 Rao[10]가 MS배지에 IAA와 BA를 이용하여 자엽과 하배축으로부터 식물체 재분화에 성공하였다. 그 이후 자엽과 하배축[2,14, 19], 본엽[12] 조직으로부터 식물체재분화는 되었으나, 본 실험의 결과보다 식물체 재분화율이 높지 않았다. 따라서 고추의 조직배양이나 형질전환 연구에 식물체 재분화 효율의 배지로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료되었다.

생장조절제 첨가할 경우 뿌리 분화율은 0.5 mg/l NAA 에서 '수비초' 75.0%, '금탑' 85.0%였고, 1.0 mg/l IAA 에서 '수비초' 68.3%, '금탑' 81.7%로 양호하였다(Table 4). 적절한 root의 분화를 위해서 IAA는 NAA보다 높은 농도가 필요하였다. 두 생장조절제 모두 시판종인 '금탑'이 재래종인 '수비초'보다 뿌리 분화율이 높았다.

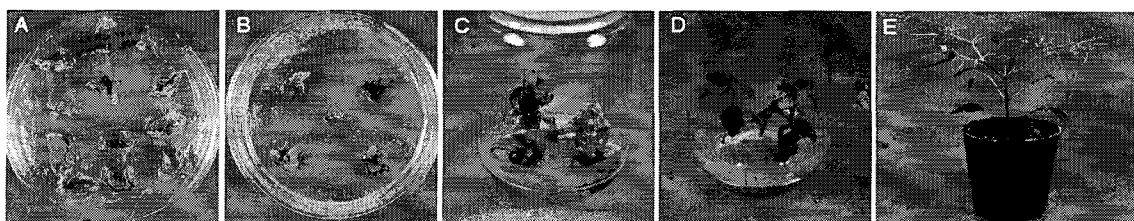


Fig. 1. Plant regeneration using cotyledons of pepper. A: Inoculated cotyledons on plant-regeneration medium contained plant growth regulators. B: Plant regeneration from cotyledon. C: Plantlet in bottle. D: Rooting in bottle. E: Plant in pot.

Table 4. Effect of plant growth regulators on root regeneration from first leaf culture of red pepper

Plant growth regulators (mg/L)	Root regeneration (%)	
	Subicho	Kumtap
NAA	0.01	46.7
	0.05	58.3
	0.1	56.7
	0.5	75.0
	1.0	51.7
IAA	0.01	30.0
	0.05	31.7
	0.1	38.3
	0.5	36.7
	1.0	68.3

식물체 재분화 배지에서 얻어진 싌초들은 배지에 식물 호르몬을 전혀 첨가하지 않고 뿌리를 분화시키는 경우[8, 16, 17]를 제외하고는 대부분 높은 농도의 NAA 혹은 IAA를 처리하여 뿌리를 유기한 다음 순화단계로 진행된다[1, 10, 15]. 그러나 식물체재분화배지에서 얻어진 싌초의 크기가 작거나 모양이 변형된 경우 그리고 싌초가 rosette형으로 분화된 경우에는 뿌리유기 처리를 하더라도 정상적인 싌초로 발달되는 빈도가 낮아 완전한 식물체를 얻지 못하였다[2, 18]. PAA (phenylacetic acid) 처리[11], 24-epi-brassinolide처리[9]를 통하여 싌초를 신장시켜서 뿌리 유기율을 향상시켰음을 보고하였다. 본 연구에서는 IAA와 NAA를 처리하여 어린식물체가 재분화(Fig. 1C)한 후 뿌리(Fig. 1D)가 발생되고 완전한 식물체(Fig. 1E)를 얻은 것은 Gunay와 Rao[10], Phillips와 Hubstenberger[15], Agrawal 등[1]의 연구결과와 유사한 경향으로 나타났다.

적 요

재래종 고추인 '수비초'와 '금탑'의 자엽을 이용한 식물체 재분화 조건을 구명하기 위해 시험한 결과, shoot 분화율은 2~4 mg/l zeatin 에서 0.05 mg/l NAA 혼용에서 분화율이 높았고, 뿌리 분화율은 0.5 mg/l NAA 에서 높았다.

참 고 문 헌

- Agrawal, S., N. Chandra and S. L. Kothari. 1989. Plant generation in tissue cultures of pepper(*Capsicum annuum* L. ev. Mathania). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **16**, 47-55.
- Arroyo, R. and M. Angeles Revilla. 1991. In vitro plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Reports* **10**, 414-416.
- Binzel, M. L., N. Sankhla, S. Joshi and D. Sannkhla. 1996. Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper(*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports* **15**, 536-540.
- Christopher, T. and M. V. Rajam. 1996. Effect of genotype, explant and medium on *in vitro* regeneration of red pepper. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **6**, 45-250.
- Dabauza, M. and L. Pena. 2001. High efficiency organogenesis in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) tissues from different seedling explants. *Plant Growth Regulation* **33**, 221-229.
- Diaz, I., R. Moreno and J. B. Power. 1988. Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annuum*. *Plant Cell Reports* **7**, 210-212.
- Dix, P. J. and H. E. Street. 1976. Selection of plant cell lines with enhanced chilling resistance. *Ann. Bot.* **40**, 903-910.
- Ezura, H., N. Satoshi and M. Kasumi. 1993. Efficient regeneration of plants independent of exogenous growth regulators in bell pepper(*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports* **12**, 676-680.
- Franck-Duchenne, M., Y. Wang, S. F. Tahar and R. N. Beachy. 1998. *In vitro* stem elongation of sweet pepper in media containing 24-epi-brassinolide. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **53**, 79-84.
- Gunay, A. L. and P. S. Rao. 1978. *In vitro* plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper(*Capsicum*). *Plant Sci. Lett.* **11**, 365-372.
- Husain, S., A. Jain and S. L. Kothari. 1999. Phenylacetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *C. annuum* L. *Plant Cell Reports* **19**, 64-68.
- Kintzios, S., J. B. Drossopoulos, E. Shortsiianitis and D. Peppes. 2000. Induction of somatic embryogenesis from young, fully expanded leaves of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.): effect of leaf position, illumination and explant pretreatment with high cytokinin concentrations. *Scientia Horticulturae* **85**, 137-144.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **5**, 473-479.
- Ochoa-Alejo, N. and L. Ireta-Moreno. 1990. Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chilli pepper (*C. annuum*) cultured *in vitro*. *Scientia Horticulturae* **42**, 21-28.
- Phillips, G. C. and J. F. Hubstenberger. 1985. Organogenesis in pepper tissue cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **4**, 261-269.
- Pozueta-Romero, J., G. Houline, L. Canas, R. Schantz and J. Chamarro. 2001. Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **67**, 173-180.
- Ramirez-Malagon, R. and N. Ochoa-Alejo. 1996. An improved and reliable chili pepper(*C. annuum* L.) plant regeneration method. *Plant Cell Reports* **16**, 226-231.
- Scripichitt, P., E. Nawata and S. Shigenaga. 1987. *In vitro* shoot-forming capacity of cotyledon explants in red pepper(*C. annuum* L. cv. Yatsufusa). *Japan J. Breed.* **37**, 133-142.
- Wang, Y., M. Yang, N. Pan and Z. Chen. 1991. Plant regeneration and transformation of sweet pepper(*Capsicum frutescens*). *Acta. Bot. Sin.* **33**, 780-786.