

질산은과 polyamines이 미니토마토, Micro-Tom 신초 기관발생과 식물체 재분화에 미치는 영향

김용호 · 박철호¹ · 박상언^{2,3*}

한림대학교 생명과학부, ¹강원대학교 농업생명과학대, ²진파크 생명공학회사, ³캘거리대학교 생물학과

Effect of silver nitrate (AgNO₃) and polyamines on shoot organogenesis and plant regeneration of *Lycopersicon esculentum* cultivar, Micro-Tom

KIM, Yong Ho · PARK, Cheol Ho¹ · PARK, Sang Un^{2,3*}

Division of Biology, Hallym University, Chunchon, 200-702, Korea

¹College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon, 200-701, Korea

²GenePark Inc.: 855-3 Toegye, Chunchon, Kangwon, 200-190, Korea

³Department of Biological Sciences, University of Calgary, Calgary, Alberta T2N 1N4, Canada

ABSTRACT The study was carried out to establish an efficient protocol for shoot organogenesis and plant regeneration from stem explant cultures of *Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom. The regenerated shoots obtained from stem explant cultures on solid MS medium containing the different concentrations of BAP. The highest number of shoots (5.3) per explant and shoot growth (0.7 cm) was obtained on MS medium containing 4.0 mg/L BA. The additions of AgNO₃ and putrescine substantially improved the shoot regeneration frequency, at the optimal concentration of 7 mg/L and 50 mg/L respectively. The regenerated shoots (about 1 cm) were normal and could be easily rooted with 0.1 mg/L IBA treatment. The rooted plants were hardened and transferred to vermiculite with a 92% survival rate where they grew normally.

Key words: *Lycopersicon esculentum* cultivar, Micro-Tom, plant regeneration, polyamines, shoot organogenesis, silver nitrate (AgNO₃)

서 론

Micro-Tom (미니 토마토: *Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom)은 Florida Basket과 Ohio 4013-3의 교배육종으로 University of Florida, Bradenton에서 관상용 품종으로 육성되었다 (Scott and Harbaugh 1989). Micro-Tom은 각 개체간에 차이가 있지만 평균적으로 재배 시작 후 한달 정도면 개화가 되고, 수확기간도 80일 정도로 다른 작물에 비하여 생육 기간이 빠른 편이다. 길이 신장도 15 cm 정도로 재배와

다루기가 용이하다 (Wehner 1999).

지난 10여 년간 애기장대 (*Arabidopsis*) 모델 시스템은 식물 분자생물학 발전에 큰 공헌을 하였다. 애기장대의 성공적인 역할은 작은 크기, 짧은 생육기간, 작은 genome, 형질전환이 용이하다는 점에서 기인되었다. 이와 유사한 점을 지닌 Micro-Tom도 토마토 유전학이나 특정 유전자 발현 및 그 기능을 밝히는 분자 생물학적 연구에 좋은 모델이 될 수 있을 것이다 (Meissner et al. 1997).

질산은 (AgNO₃)은 Ag 이온이 에틸렌 결합을 위한 수용능력을 감소시키는 작용을 하므로 에틸렌 발생을 억제시키고 (Yang, 1985), 에틸렌 발생 억제 물질 중 가장 보편적으로 쓰이는 질산은은 여러 식물체에서 기내 기관 분화 향상에 효과

*Corresponding author. Tel 1-403-282-4387
E-mail spark@ucalgary.ca

가 입증되었다고 Kumar 등 (1998)에 의해 보고되었다.

Polyamines는 원핵생물과 진핵생물의 세포 성장과 분열에 중요한 역할을 하며 (Evans and Malmberg 1989), 식물체에서는 주로 성장과 발육에 관여하는 것으로 밝혀졌으며 (Walden et al 1997), 환경적인 스트레스와 다양한 생리적 기능에도 관여하는 것으로 보고되었다 (Flores 1990). 최근에는 기내 배양에서 Polyamines이 체세포배 발생과 신초 기관발생을 촉진한다는 것으로 보고되고 있다. 벼의 캘러스에서 식물체 재분화는 polyamines이 중요한 요인으로 작용하며 특히 putrescine과 spermidine 비율이 재분화에 큰 영향을 미치는 것으로 보고하였으며 (Bajaj & Rajam 1996; Shoeb et al 2001), polyamine의 생합성 방해는 식물 재분화를 억제하는 것으로 알려져 Polyamines이 체세포배 발생과 신초 기관발생을 촉진한다는 보고를 입증해 주고 있다 (Fierer et al 1984; Bais et al. 2000).

형질전환을 위해서는 재분화 조건을 찾아 재연성 있는 재분화 방법을 확립해야 하고, 재분화 효율을 증진시키는 것이 우선되어야 한다. 본 실험은 Micro-Tom의 신초 기관분화에 미치는 질산염과 polyamines의 영향을 조사하고 식물체 재분화를 향상시킬 수 있는 방안을 모색하여 Micro-Tom의 신초 기관분화를 통한 식물체 형질전환에 기초 자료로 사용하고자 한다.

재료 및 방법

종자소독과 발아

Micro-Tom 종자는 Utah State University, Dr. Bruce G. Bugbee로부터 분양을 받았다. 종자를 에탄올 70% (v/v) 용액에 침지한 뒤 2% sodium hypochlorite 용액에 tween 20 2방울을 첨가 후 10분간 표면살균 하였다. 멸균수에 3회 세척한 후 25 ml의 MS (Murashige & Skoog 1962) 고형 배지가 든 페트리디쉬 (100×15 mm)에 7립의 종자를 배양하였다. 배양은 25±1°C growth chamber의 형광등 아래서 16시간 광주 조건, 5000 lux 광도로 실시하였다.

기관분화 유도과 식물체 재분화

발아 후 약 10일된 유식물체의 줄기를 약 1 cm 길이로 잘라서 7개 절편을 재분화용 배지가 첨가된 페트리디쉬에서 배양하였다. 신초 형성에 적합한 cytokinin 종류와 농도를 조사하기 위하여 Gelrite를 첨가한 MS 기본배지에 BAP (6-benzylaminopurine), kinetin 및 TDZ를 각각 0.05, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 mg/L 처리된 배지에서 줄기 절편을 6주간 배양하였다. 그리고 2주마다 새로운 배지로 계대 배양을 하였다. 배양 6주 후 신초 형성률을 조사하였다. 또한 기관분화의 촉진을

위해 다른 농도의 polyamines (putrescine, spermidine 과 spermine) 0, 10, 30, 50, 100, 200 mg/L과 질산염 (AgNO₃) 0, 1, 3, 5, 10, 20 mg/L를 4.0 mg/L BAP가 첨가된 MS 배지에 처리하여 조사하였다. 배양은 25±1°C growth chamber의 형광등 아래서 16시간 광주 조건, 5000 lux 광도로 실시하였다.

신초가 약 1 cm 길이의 shoot로 성장하였을 때 기부를 절단하여 0.1 mg/L IBA (indole-3-butyric acid)가 처리된 MS 고형배지가 든 Magenta boxes에서 3주 동안 배양하여 뿌리를 유도하였으며, 발근 후 멸균 소독한 vermiculite에 옮겨 순화를 시켰다.

결과 및 고찰

Micro-Tom의 기관분화와 식물체 재분화를 증진시키기 위한 목적으로 줄기 절편을 기내 배양한 결과 신초 (shoot) 기관발생을 통한 재분화 식물체를 얻을 수 있었다.

줄기 절편을 BAP가 처리된 MS 고체 배지에서 배양한 결과 배양 약 2~3주 후 줄기 절편의 절단 면으로부터 부정아가 형성되는 것을 관찰할 수 있었고 (Figure 1-A), 3~4주 후에는 소형 신초로 발육되었으며 (Figure 1-B), 배양 7주 후에는 신초로 완전히 발달되었다 (Figure 1-C).

신초 기관분화에 미치는 cytokinins의 영향을 알아보기 위하여 다른 농도의 BAP, Kinetin 그리고 TDZ를 처리한 결과, Kinetin과 TDZ처리는 BAP처리에 비해 Micro-Tom 줄기 절편 배양으로부터 신초 형성에 별다른 효과를 보이지 못하였다. 4.0 또는 6.0 mg/L Kinetin과 0.5 또는 1.0 mg/L TDZ이 처리된 배지에서 줄기 절편을 6주간 배양한 결과, 약 25%의 기관 분화율을 나타냈고 줄기절편 당 1~2개의 신초를 형성했다 (data not shown). 다른 농도의 BAP가 첨가된 MS배지에서 전반적으로 신초를 형성하였으며, 약 70%의 기관 분화율을 나타냈다. BAP 4 mg/L 처리가 Micro-Tom 신초 기관분화를 위한 최적 농도로 나타났으며, 줄기절편 당 평균 5.3개의 신초를 형성했고 0.7 cm 길이 신장을 보였다.

질산염 (AgNO₃)과 putrescine이 기관분화 배지 (BAP 4 mg/L이 첨가된 MS 고체 배지)에서 Micro-Tom 신초 기관형성에 미치는 영향을 알아보기 위해 농도별로 처리한 결과, 질산염은 20 mg/L를 제외한 각 처리에서 신초 형성을 촉진시키는 것을 관찰할 수 있었다. AgNO₃ 7 mg/L이 첨가된 배지에서 최고치의 신초를 생산할 수 있었고, 0.8 cm의 길이신장을 보였다.

Polyamines (putrescine, spermidine과 spermine)이 신초 기관분화에 미치는 영향을 조사한 결과, spermidine과 spermine은 Micro-Tom 신초 형성에 별다른 영향을 미치지 못하였다. 10~50 mg/L spermidine과 spermine 처리에서는 줄기 절편당 약 5~6개의 신초가 형성되었으며, 약 0.7~0.8 cm의 길이신장을 보여 control과 별 차이가 없었다. 100~

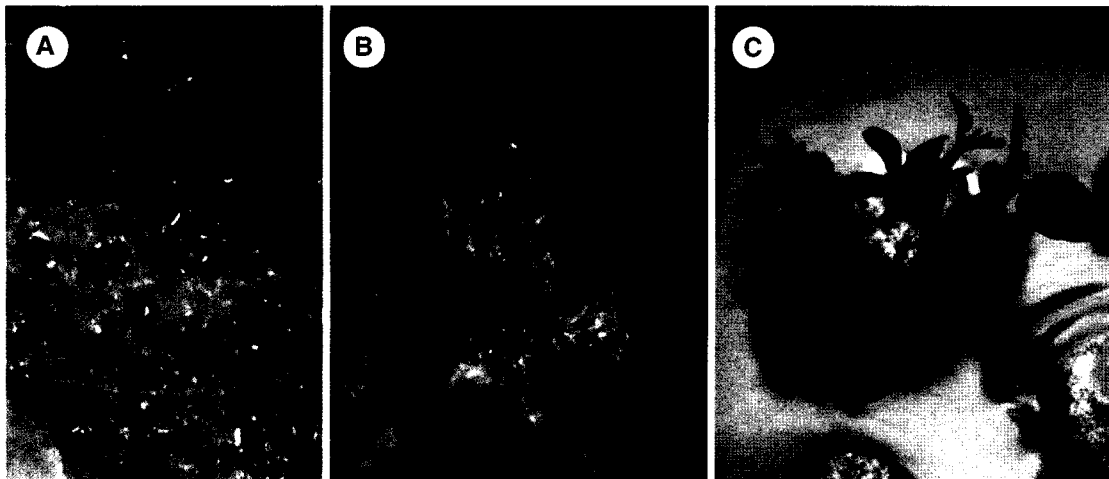


Figure 1. Shoot organogenesis in *Lycopersicon esculentum* cultivar, Micro-Tom. A, Adventitious buds from stem explant on MS solid medium supplemented with 4 mg/L BAP after 3 weeks of culture ($\times 15$). B) Micro shoot developed from adventitious buds explant after 4 weeks of culture ($\times 13$). C) Regenerated shoots from explant after 7 weeks of culture ($\times 1.4$).

200 mg/L 처리 시 처리에서는 줄기 절편 당 약 3~4개의 신초가 형성되었으며, 약 0.5~0.6 cm의 길이신장을 보여 control과 비교해 분화 능력과 길이 신장이 더 억제되는 것으로 나타내었다 (data not shown).

putrescine 처리에서는 각 농도별로 전반적인 신초 기관분화에 향상을 나타냈다. 50 mg/L 처리가 신초 기관분화를 위한 최적 농도로 나타났으며, 줄기절편 당 평균 9.7개의 신초를 형성했고 1.0 cm 길이 신장을 보였다.

신초가 약 1 cm 길이로 성장하였을 때 기부를 절단하여 0.1 mg/L IBA이 처리된 MS고형배지가 든 Magenta boxes에서 3 주동안 배양하여 뿌리를 유도하였으며, 발근된 식물체를 vermiculite에 옮겨 순화시킨 결과 92%의 생존율을 보였다.

Ethylene 발생 억제물질 중 하나인 질산은 (AgNO_3)이 신초 기관분화를 통한 식물체 재분화를 향상시킨다는 보고는 여러 식물체, 밀 (*Triticum aestivum*) (Purnhauser et al. 1987), Chinese cabbage (*B. campestris* spp. *chinesis*) (Chi & Pua 1989), 해바라기 (*Helianthus annuus*) (Chraibi et al. 1991), 겨자 (*Brassica juncea*) (Pau and Chi 1993), chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*) (Xiaohan et al. 1995), 고추 (*Capsicum annuum*) (Hyde and Phillips 1996), 오이 (*Cucumis sativus* L.) (Mohiuddin et al. 1997), *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local (Bais et al. 2000),와 Buffalograss (*Buchloe dactyloides*) (Fei et al. 2000)에서 있었으며 본 실험과 비슷한 결과를 나타냈다. 반면 pea (*Pisum sativum* L.) (Ozean et al. 1992), sugarcane (Taylor et al. 1994)과 커피 (*Coffea canephora*) (Hatanaka et al. 1995) 식물체 재분화에서 질산은 별다른 효과가 없었고, 또한 기관 발생을 억제하는 것으로 나타나 본 실험과는 상반된 결과를 제시하였다. 이와 같은 결과는 식물체마다 질산은 수용에 특이성을 보이는 것으로 사료된다.

Polyamines 중에 하나인 putrescine 처리로 Chinese cabbage (*B. campestris* spp. *chinesis*) (Chi & Pua 1989), Chinese kale (*Brassica alboglabra* Bailey) (Pua et al. 1996a), *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local (Bais et al. 2000)의 신초 기관발생을 향상시켰다는 보고도 본 실험과 유사함을 나타냈다. 반면 Chinese radish 기내 배양에서 putrescine 처리는 신초 재분화에 별다른 영향을 미치지 못하였다고 하며 질산은이나 AVG (aminoethoxyvinylglycine)와 혼합 처리시 신초 재분화를 촉진시켰다고 한다 (Pua et al. 1996b).

이상의 결과를 살펴보면 Micro-Tom 신초 기관발생에는 cytokinin 중 BAP가 적합하며, 적정량의 질산은 (7 mg/L)과 putrescine 처리로 신초 기관발생을 향상시킬 수 있음을 관찰

Table 1. Characteristics of *Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom (Micro tomato).

Life cycle: 25 days to flowering, 80 days to harvest
Height: 15 cm
Fruit size: 1.5 to 2.0 cm diam. (6 g)
Resistance: fusarium wilt race 1, gray leaf spot
Adaptation: greenhouse culture in small pots or hanging baskets

Table 2. Effect of different concentrations of BAP on shoot regeneration from stem explant cultures of *Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom after 7 weeks on MS medium.

BAP (mg/L)	No. of shoots/explant	Shoot length (cm)
0.5	0.8 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1
1	1.5 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1
2	3.1 \pm 0.3	0.6 \pm 0.1
4	5.3 \pm 0.6	0.7 \pm 0.1
6	2.4 \pm 0.2	0.3 \pm 0.1

Each value is the mean standard error of three repeated experiments with 20 explants used in each treatment.

Table 3. Effect of the different concentrations of AgNO₃ on shoot regeneration from stem explant cultures of *Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom after 7 weeks on shoot regeneration medium (MS medium with 4 mg/l BAP).

AgNO ₃ (mg/L)	No. of shoots/explant	Shoot length (cm)
0	5.3±0.6	0.7±0.1
1	5.8±0.5	0.7±0.1
3	6.7±0.8	0.8±0.2
7	8.2±0.9	0.8±0.1
10	6.9±0.7	0.8±0.1
20	3.2±0.3	0.5±0.1

Each value is the mean ± standard error of three repeated experiments with 20 explants used in each treatment.

Table 4. Effect of the different concentrations of putrescine on shoot regeneration from stem explant cultures of *Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom after 7 weeks on shoot regeneration medium (MS medium with 4 mg/l BAP).

AgNO ₃ (mg/L)	No. of shoots/explant	Shoot length (cm)
0	5.3±0.6	0.7±0.1
10	5.5±0.6	0.7±0.1
30	7.2±0.7	0.9±0.1
50	9.7±0.8	1.0±0.2
100	8.8±0.9	0.9±0.1
200	6.6±0.6	0.7±0.1

Each value is the mean ± standard error of three repeated experiments with 20 explants used in each treatment.

하였다. 이 시스템을 토대로 Micro-Tom의 효율적인 형질전환 시스템을 개발하여 분자생물학적 연구에 이용할 수 있을 것이다.

적 요

미니토마토, Micro-Tom (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom)의 줄기 절편 배양으로부터 신초 기관발생을 통한 식물체 재분화 시스템을 확립하였다. 다른 농도의 BAP가 처리된 MS 고체 배지에서 신초 발생을 유도하였다. 신초 발생을 유도하기 위하여 cytokinin 종류와 농도별 처리에서는 4 mg/L BAP 처리가 Micro-Tom 신초 기관분화를 위한 최적 농도로 나타났으며, 줄기절편 당 평균 5.3개의 신초를 형성했고 0.7 cm 길이 신초를 보였다. 4 mg/L BAP이 처리된 MS 고체배지에 질산은 (7 mg/L)과 putrescine (50 mg/L) 처리로 신초기관발생을 향상시킬 수 있었다. 신초가 약 1 cm 길이로 성장하였을 때 기부를 절단하여 0.1 mg/L IBA이 처리된 MS 고체배지에 배양하여 뿌리를 유도하였으며, 발근된 식물체를 vermiculite에 옮겨 순화시킨 결과 92%의 생존율을 보였다.

인용문헌

- Bajaj S, Rajam MV** (1996) Polyamine accumulation and near loss of morphogenesis in long-term callus cultures of rice. *Plant Physiology* **112**:1343-1348
- Basi HP, Sudha GS, Ravishankar GA** (2000) Putrescine and silver nitrate influence shoot multiplication, *in vitro* flowering and endogenous titers of polyamines in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local. *J. Plant Growth Regul.* **19**:238-248
- Chi CL, Pua EC** (1989). Ethylene inhibitor enhanced *de novo* shoot regeneration from cotyledons of *B. campestris* spp chinese (Chinese cabbage) *in vitro*. *Plant Sci* **64**:243-250
- Chraïbi BKM, Latche A, Roustan J, Fallot J** (1991) Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and cobalt. *Plant Cell Rep.* **10**:204-207
- Evans PT, Malmberg RL** (1989) Do polyamines have a role in plant development? *Ann Rev Plant Physiol Mol Biol* **40**:235-269
- Fei S, Read PE, Riordan TP** (2000) Improvement of embryogenic callus induction and shoot regeneration of Buffalograss by silver nitrate. *Plant Cell Tiss Org Cult* **60**:197-203
- Fierer RP, Mignon G, Litvay JD** (1984) Arginine decarboxylase and polyamine required for embryogenesis in wild carrot. *Sciences* **223**:1433-1435
- Flores HE** (1990) Polyamines and plant stress. In: Alscler RG, Cummy JR, Allen NS, editors. *Stress responses in plant adaptation and acclimation mechanism*. New York: Wiley Liss, Wiley Sons Inc., Pub pp 217-239
- Hatanaka T, Sawabe E, Azuma T, Uchida N, Yasuda T** (1995) The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. *Plant Sci* **107**:199-204
- Hyde CL, Phillips GC** (1996) Silver nitrate promotes shoot development and plant regeneration of chile pepper (*Capsicum annuum* L.) via organogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol* **32**: 72-80
- Kumar PP, Lakshmanan P, Thorpe TA** (1998) Regulation of morphogenesis in plant tissue culture by ethylene. *In Vitro Cell Dev Biol* **34**: 94-103
- Meissner R, Jacoson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Elkind Y, Levy A** (1997) A new model system for tomato genetics. *Plant Journal* **12**:1465-1472
- Mohiuddin AKM, Chowdhury MKU, Abdullah ZC, Napis S** (1997) Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber *in vitro* shoot regeneration. *Plant Cell Tiss Org Cult* **51**:75-78
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Ozean S, Barghchi M, Firek S, Draper J** (1992) High frequency adventitious shoot regeneration from immature cotyledons of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Rep* **11**:44-47
- Pua EC, Chi GL** (1993) *De novo* shoot morphogenesis and plant

- growth of mustard (*Brassica juncea*) in vitro in relation to ethylene. *Physiol Planta* **88**:467-474.
- Pua EC, Teo SH, Loh CS** (1996a) Interactive role of ethylene and polyamines on shoot regenerability of Chinese kale (*Brassica alboglabra* Bailey) in vitro. *Journal of Plant Physiology* **149**:138-148
- Pua EC, Sim GE, Chi GL, Kong LF** (1996b) Synergistic effect of ethylene inhibitors and putrescine on shoot regeneration from hypocotyls explants of Chinese radish (*Raphanus sativus* L. var. longipinnatus Bailey) in vitro. *Plant Cell Reports* **15**:685-690
- Purnhauser L, Medgyesy P, Czako M, Dix PJ, Marton L** (1987) Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃. *Plant Cell Rep* **6**:1-4
- Scott JW, Harbaugh BK** (1989) Micro-Toma miniature drarf tomato. *Florida Agr Expt Sta Circ* **370**:1-6
- Shoeb F, Yadav JS, Bajaj S, Rajam MV** (2001) Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: Improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of Indica rice. *Plant Science* **160**:1229-1235
- Taylor PWJ, Ko HL, Fraser TA, Masel N, Adkins SW** (1994) Effect of silver nitrate on sugarcane cell suspension growth, protoplast isolation, ethylene production and shoot regeneration from cell suspension cultures. *J Exp Bot* **45**:1163-1168
- Walden R, Cordeiro A, Tiburcio AF** (1997) Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant physiol* **133**:1009-1013
- Wehner TC** (1999) Vegetable cultivar descriptions for North America list 25. *HortSci* **34**:1004
- Xiaohan Y, Bo J, Yan Z, Ding M, Xuemei T** (1995) Enhancement of direct shoot regeneration from internode segments of chrysanthemum by silver nitrate. *Acta Horti* **404**:68-73
- Yang SF** (1985) Biosynthesis and action of ethylene. *Hort Sci* **20**:41-45

(접수일자 2002년 1월 4일)