

‘Ailsa Craig’ 토마토 캘러스의 형태학적 특성과 식물체 재분화에 미치는 영향

성은수 · 왕명현*

강원대학교 생명공학부

Morphological Characterization of ‘Ailsa Craig’ Tomato Callus and Effect on Plant Regeneration

Eun Soo Seong and Myeong-Hyeon Wang*

School of Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Kangwon-do 200-701, Korea

Received September 25, 2007; Accepted November 25, 2007

In an attempt to optimize the *in vitro*-regeneration conditions necessary for the genetic manipulation of tomato species, we examined ‘Ailsa Craig’ cultivar of *Lycopersicon* for regeneration ability. The basal medium used for callus formation and shoot regeneration was MS (MS + vitamin) supplemented with six combinations of zeatin 2 mg/l, zeatin 2 mg/l + IAA 0.1 mg/l, zeatin 2 mg/l + IAA 0.5 mg/l, zeatin 4 mg/l, zeatin 4 mg/l + IAA 0.1 mg/l and zeatin 4 mg/l + IAA 0.5 mg/l. When all conditions tested were considered, however, only zeatin 2 mg/l was shown to be the best in shoot regeneration. The morphological characterization from *in vitro*-cultured callus of *Lycopersicon esculentum* L. var. ‘Ailsa Craig’ was investigated with scanning electron microscope (SEM). The surfaces of *in vitro*-cultured callus had well-defined epidermal cell in condition of zeatin 2 mg/l, but those of different treatments were twisted. These results suggested that shape of callus was involved in efficiency of shoot regeneration in tomato ‘Ailsa Craig’.

Key words: Ailsa Craig, SEM, shoot regeneration, zeatin

서 론

토마토는 비타민과 무기질이 풍부한 작물로서 국내 재배 면적은 2004년 기준 5,883 ha를 차지하고 있으며, 재배방법에 따라 시설재배와 노지재배로 구분되고, 2004년 현재 품종보호 등록된 2 품종과 생산수입판매 신고된 329 품종이 유통되고 있다. 토마토는 숙기와 과형에 따라 완숙형, 미숙형, 송이 토마토, 방울 토마토로 분류되며, 성장 형태에 의해 무한 성장군과 유한 성장군으로 나눌 수 있다. 또한 가공 산업의 발달과 더불어 토마토의 소비량이 점차 증가하고 있는 추세이다. 우리나라에서 재배되고 있는 토마토품종은 일본에서 육성된 것이 수량과 당도가 높고 병해에 대한 저항성이 강하기 때문에 전체 종자 시장의 80% 이상을 차지하고 있으며, 국내에서 육성된 품종은 5% 미만의 낮은 시장 점유율을 보이고 있다¹⁻³⁾.

토마토는 재배시 건해, 냉해, 염해 같은 환경 스트레스뿐만 아니라 병충해 등의 많은 문제점을 지니고 있기에 유전적 변이가 거의 없는 기존의 토마토 품종으로는 신품종 육성재료로 이

용하는데 한계가 있다. 야생종 토마토는 내염성, 내서성, 내건성 유전자뿐만 아니라 내병성, 내충성 당도 화방당 다과수 등의 토마토의 주요 형질과 관련된 유전자를 많이 보유하고 있다^{4,6)}.

토마토 조직 배양은 비교적 다른 작물 보다 많은 연구가 되어왔지만 토마토 재분화는 품종 및 계통에 따라 배지조건이 다르기 때문에 여러 품종 및 계통에 공통으로 적용될 수 있는 배지 조성은 없다. 또한 여러 종류의 토마토 품종간, 특히 중간잡종에서 기관분화의 차이를 연구한 보고는 소수에 불과하다¹⁻³⁾. 따라서 토마토 품종과 계통에 관계없이 재분화를 시킬 수 있는 기내배양 체계를 확립하게 되면, 재분화 단계에서 소요되는 많은 시간을 절약할 수 있다. 몇몇 토마토 품종에 대해서 캘러스 및 원형질체로부터의 기관분화에 관한 연구는 다수 수행되었다^{7,9-15)}. 미니토마토인 Micro-Tom의 기관분화와 식물체 재분화를 증진시키기 위한 목적으로 줄기 절편을 기내 배양한 결과 신프 기관발생을 통한 재분화 식물체를 얻은 결과도 있다¹⁶⁾.

본 실험에서는 ‘Ailsa Craig’ 토마토 품종의 형질전환 시스템을 연구하기전 기초 자료로 재분화 체계를 설계하고자 수행하였다. Zeatin과 IAA의 단독 및 혼합처리를 한 배지 내에서의 캘러스 형성률 및 신프 재분화율을 조사하였으며, 캘러스의 형태적 차이가 재분화에 미치는 영향을 조사하였다.

*Corresponding author
Phone: 82-33-250-6486; Fax: 82-33-241-6480
E-mail: mhwang@kangwon.ac.kr

재료 및 방법

본 실험은 *Lycopersicon esculentum* 'Ailsa Craig' 토마토를 공시재료로 이용하였다. 실험에 사용된 종자를 5% sodium hypochlorite 에 10분간 표면소독을 한 다음 다시 멸균수로 2-3 회에 걸쳐 수세했다. 토마토 종자를 0.8% 한천과 3% 당이 첨가되고 pH는 6.8로 맞춰진 기본배지에 치상하여 2주간 배양한 후 발아된 기내배양 식물의 잎을 절편체로 사용하였다. 기관분화를 위해서 사용된 배지는 0.8% 한천(agar), 3% 당이 첨가된 MS(MS salts + vitamin) 기본배지에 zeatin 2 mg/l, zeatin 2 mg/l + IAA 0.1 mg/l, zeatin 2 mg/l + IAA 0.5 mg/l, zeatin 4 mg/l, zeatin 4 mg/l + IAA 0.1 mg/l, zeatin 4 mg/l + IAA 0.5 mg/l 의 6가지 조건으로 실험하였다. 온도 25±1°C, 광도 1,500 lux, 광주기 16시간의 조건하에서 배양한지 4주 후부터 1주 간격으로 캘러스 형성 및 재분화 정도를 조사하였다. 형성된 캘러스의 형태학적인 특성을 조사하기 위하여 조직 모양을 전자현미경(SEM)을 이용하여 관찰하였다. SEM 분석은 LV-SEM S-3500N(Hitachi, Korea Basic Science Institute)를 이용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

식물의 종에 따라 캘러스 형성 및 기관분화력은 다르며 심지어는 같은 종이라 할지라도 품종 및 계통에 따라서 기내배양을 통한 식물체 재분화 능력에 큰 차이가 있기 때문에 유전자형에 관계없이 재분화가 가능한 배지를 찾는다는 것은 어렵다. 그러나 몇몇 식물의 경우 품종간에 차이는 있지만 많은 품종을 재분화시킬 수 있는 배지가 밝혀졌고 실제로 많이 이용되고 있다.

캘러스 형성에 있어서 배지조성에 의한 차이를 조사하였다(Fig. 1 and Fig. 3). 2 mg/l zeatin 처리구에서는 100%로 캘러스 형성률이 높았고, 나머지 처리구에서도 60% 이상의 캘러스 형성률을 나타냈다. 또한 zeatin 함량이 높아질수록 캘러스 형성률도 저하되는 양상을 보여주었다. 토마토의 경우 오옥신류(2,4-D, NAA, IAA)나 사이토키닌류(BA, zeatin) 단독처리에서도 캘러스 유기가 가능하지만 일반적으로 저농도의 오옥신(IAA, 2,4-D)과 고농도의 사이토키닌(BA, kinetin, zeatin)의 조합이 캘러스 성장을 촉진한다고 알려지고 있다(Kartha *et al.*, 1977; Lim, 1991). 'Ailsa Craig' 토마토의 경우는 오옥신 혼합처리시 사이토키닌 단독처리 보다 캘러스 형성률은 다소 저하되는 경향을 보였다.

기내에서 배양된 캘러스 조직을 처리군별로 scanning electron microscope(SEM)을 이용하여 관찰하였다(Fig. 4). 캘러스 조직 표면은 처리군별로 상당한 차이를 나타냈다. 2 mg/l zeatin을 첨가한 배지에서 배양된 캘러스는 완전한 구형모양을 갖춘 배발생 캘러스로 나타났고, 오옥신류를 첨가한 처리구와 zeatin 함량을 증가시켜 첨가하여 배양한 샘플들은 쭉쭉쭉글쭉글한 캘러스 모양으로 돌출되었다. 조직배양을 통해 순화된 식물의 형태학적 모양을 관찰한 연구중 기내배양한 식물 잎의 기공은 온실에서 직접 기른 식물과 비교해볼 때 기공이 열리는 빈도와 밀도

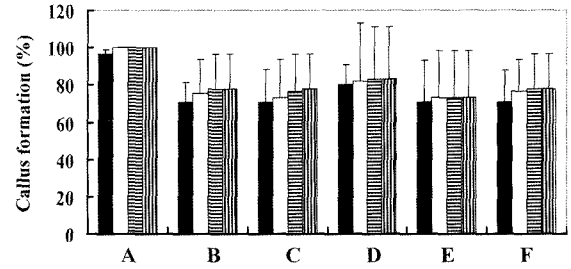


Fig. 1. The formation of callus derived from leaves explants of 'Ailsa Craig' tomato following various medium conditions. Callus formation from leaves explants on MS solid medium supplemented with 2 mg/l zeatin (A), 2 mg/l zeatin + 0.1 mg/l IAA (B), 2 mg/l zeatin + 0.5 mg/l IAA (C), 4 mg/l zeatin (D), 4 mg/l zeatin + 0.1 mg/l IAA (E) and 4 mg/l zeatin + 0.5 mg/l IAA (F). Bars mean values of standard deviation. (■: 4 weeks, □: 5 weeks, ▨: 6 weeks, ▩: 7 weeks).

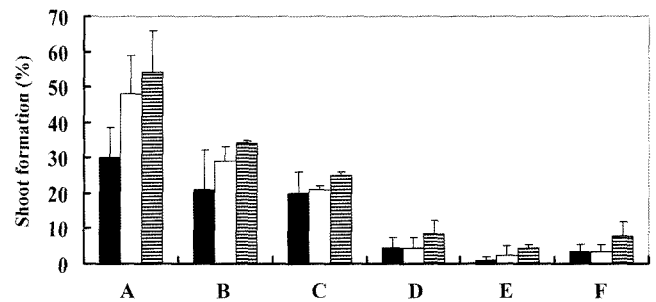


Fig. 2. The efficiency of shoot regeneration derived from leaves explants of 'Ailsa Craig' tomato following various medium conditions. Shoot regeneration from leaves explants on MS solid medium supplemented with 2 mg/l zeatin (A), 2 mg/l zeatin + 0.1 mg/l IAA (B), 2 mg/l zeatin + 0.5 mg/l IAA (C), 4 mg/l zeatin (D), 4 mg/l zeatin + 0.1 mg/l IAA (E) and 4 mg/l zeatin + 0.5 mg/l IAA (F). Bars mean values of standard deviation. (■: 5 weeks, □: 6 weeks, ▨: 7 weeks).

가 더 높은 것으로 알려졌다^{17,18}. 토마토 'Rutgers' 품종의 절편체를 기내에서 배양하여 재분화된 소식물을 전자현미경으로 관찰한 결과 일정한 형태의 표피세포 외형을 지니고 있었지만, 아주 극세한 외표피 왁스 피복물도 관찰되었다¹³.

신초재 분화율에 있어서 배지조성에 따른 차이를 보여주었다(Fig. 2). 배지별로 기관분화에 미치는 영향을 보면 신초재분화는 zeatin 2 mg/l이 첨가된 배지에서 대체로 좋았다. 특히 오옥신류를 첨가하지 않은 zeatin 단독배양처리구에서 재분화율이 양호했다. 앞서 연구된 논문들의 상당수는 배지에 첨가된 오옥신류나 사이토키닌류의 종류 및 농도가 기관분화의 주요 조절요인임을 밝혀냈다¹⁶. 다른 식물과 마찬가지로 토마토의 경우도 대부분 오옥신: 사이토키닌 비율이 높을 경우 부정근 형성이, 그 비율이 낮을 때 부정아가 생기는 것으로 알려졌다¹⁹. 토마토의 잎절편을 MS 배지에 배양하여 고농도의 BA(5 mg/l)와 저농도의 NAA(0.2 mg/l)가 조합처리된 배지에서 부정근이 유도되었다⁸. 한편 Kartha(1977) 등은 같은 식물재료에 비타민 B5와 zeatin(0.1 μM)과 IAA(10 μM)를 첨가한 배지에서 부정근 분화를 보고했다¹⁰. 토마토 재배종인 진홍과 야생종인 *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum*을 zeatin 0.5 mg/l 및 1 mg/l가 첨가된 원형절체배양용 기본배지인 TM에 접종했을 때 기관분화 현상이 관찰되었다¹¹.

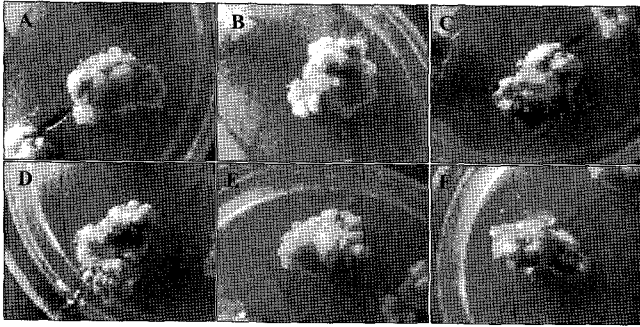


Fig. 3. Callus formation in *Lycopersicon esculentum* cultivar, 'Ailsa Craig'. Callus from leaves explants on MS solid medium supplemented with 2 mg/l zeatin (A), 2 mg/l zeatin + 0.1 mg/l IAA (B), 2 mg/l zeatin + 0.5 mg/l IAA (C), 4 mg/l zeatin (D), 4 mg/l zeatin + 0.1 mg/l IAA (E) and 4 mg/l zeatin + 0.5 mg/l IAA (F) after 4 weeks of culture.

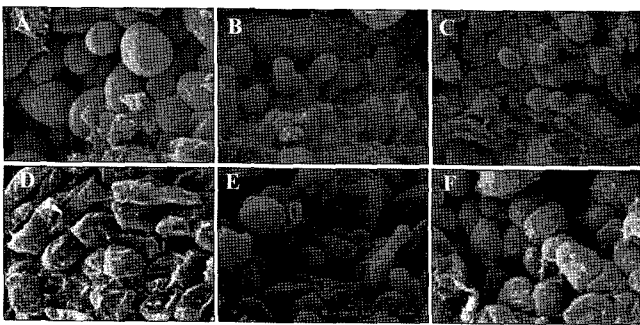


Fig. 4. Scanning electron micrographs of callus surface of tomato. Callus from leaves explants on MS solid medium supplemented with 2 mg/l zeatin (A), 2 mg/l zeatin + 0.1 mg/l IAA (B), 2 mg/l zeatin + 0.5 mg/l IAA (C), 4 mg/l zeatin (D), 4 mg/l zeatin + 0.1 mg/l IAA (E) and 4 mg/l zeatin + 0.5 mg/l IAA (F).

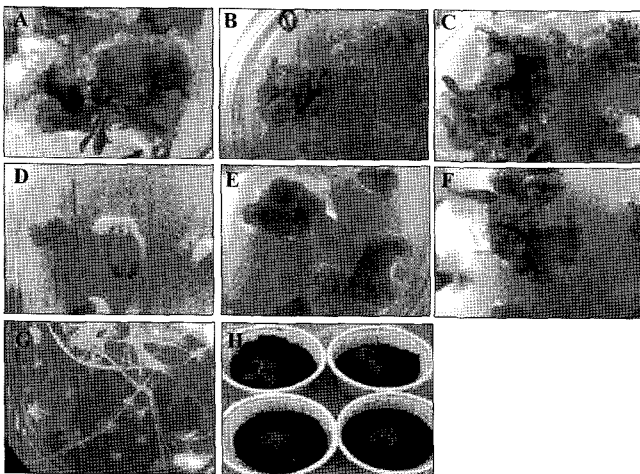


Fig. 5. Regenerated shoots from explants after 7 weeks of culture. Shoot regeneration from leaves explants on MS solid medium supplemented with 2 mg/l zeatin (A), 2 mg/l zeatin + 0.1 mg/l IAA (B), 2 mg/l zeatin + 0.5 mg/l IAA (C), 4 mg/l zeatin (D), 4 mg/l zeatin + 0.1 mg/l IAA (E) and 4 mg/l zeatin + 0.5 mg/l IAA (F), Regenerated plants from rooting medium (G), Regenerated plants grown in soil pots (H).

미니토마토, Micro-Tom(*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom)의 줄기 절편 배양으로부터 신초 기관발생을 통한 식물체 재분화 시스템 확립을 위한 연구도 발표되었다¹⁶⁾. 미니토마토에

서는, MS 고체 배지에서 신초 발생을 유도하기 위하여 BAP를 처리해서 Micro-Tom신초 기관분화를 위한 최적 농도를 나타내었다¹¹⁾. Muhlbach(1980)는 야생종인 *L. peruvicum*과 재배종인 Hilda 72, Rentia, Rutgers를 이용한 기관분화능력 연구에서 *L. peruvicum*이 재배종에 비해서 재분화가 대체로 잘된다고 보고했다. 본 연구 결과에 의하면, 'Ailsa Craig' 품종도 기관분화력이 양호는 하지만, 다른 토마토 계통인 T-21, T-35, T-40, T-61의 캘러스 유기 및 기관 분화능력에 있어서 다소 떨어지는 것으로 나타났다²⁰⁾.

지금까지의 결과를 종합해 보면 토마토 기관분화능력에 영향을 미치는 요인은 다양하지만, zeatin과 IAA가 혼합처리된 조건에서의 재분화능력은 zeatin이 단독 처리되었을 때보다 더 저하되는 것으로 나타났다. 그리고 zeatin 농도가 높을수록 토마토 신초 재분화 능력도 감소되는 것으로 보아, 품종마다의 적절한 사이토키닌 함량이 재분화에 영향을 미치는 중요한 조건으로 판단된다.

초 록

'Ailsa Craig' 토마토 품종의 기내배양시 신초재분화의 최적 조건을 밝히고자 실험하였다. 본 실험에서 캘러스 형성 및 신초 재분화에 사용된 배지조성은 6가지 조건으로 하였다. 기본 MS 배지에 zeatin 2 mg/l, zeatin 2 mg/l+IAA 0.1 mg/l, zeatin 2 mg/l+IAA 0.5 mg/l, zeatin 4 mg/l, zeatin 4 mg/l+IAA 0.1 mg/l, zeatin 4 mg/l+IAA 0.5 mg/l을 첨가하여 캘러스 및 신초 재분화율의 조건별 차이를 살펴 보았다. 그 결과 zeatin 2 mg/l을 단독 배양한 조건에서 신초 재분화율이 가장 양호하였으며, 캘러스 형성률에 있어서는 큰 타이를 보여주지 못했다. 또한 조건별로 기내상태에 있는 캘러스의 형태적인 차이를 살펴보기 위하여 SEM을 이용하여 관찰하였다. 캘러스 조직의 표면을 관찰한 결과, zeatin 2 mg/l을 단독 배양한 조건에서 완전한 신초로 재분화 하기 위한 구형의 모형이 관찰되었으며, 나머지 조건의 캘러스는 주글주글한 형태의 캘러스가 확인되었다. 이 같은 결과들로 볼 때, 토마토 'Ailsa Craig'의 조직배양시 캘러스 모양이 찌그러지지 않는 완전한 구형의 캘러스 상태에서 신초 재분화율이 더 높아지는 것으로 나타났다.

Key words: Ailsa Craig, SEM, 신초재분화, Zeatin

사 사

본 연구는 강원대학교 농업과학연구소의 일부 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Abdul-Baki, A. A. (1991) Tolerance of tomato cultivars and selected gerplasm to heat stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **116**, 1113-1116.
2. Alan, E. and Rowe, R. C. (1992) Screening tomato seedlings for multiple disease resistance. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **117**,

- 622-627.
3. Banerjee, M. K. and Kalloo, M. K. (1987) Sources and inheritance of resistance to leaf curl virus in lycopersicon. *Theor. Appl. Genet.* **73**, 707-710.
 4. Lim, H. T., Kim, J. K., Lim, C. K., Han, K. P. and Song, Y. N. (1992) Studies on the agronomic characteristics of wild species of tomatoes. *J. of Agri. Aci. (KNU)* **4**, 87-97.
 5. Lim, H. T., K. U., A. M., Han, K. P. and Yoo, K. C. (1993) Evaluation of wild relatives of the cultivated tomato for their salinity tolerance using in vitro test. *J. Kor. Soc. Hort. Sci. (Abstract)* **11**, 44-45.
 6. Young, T. E., Juvik, J. A., Sullivan, J. G. and Skirvin, R. M. (1990) An *in vitro* method for screening for the presence of the pat-2 gene in tomatoes. *Plant Cell Rep.* **8**, 538-541.
 7. Muhlbach, H. P. (1980) Different regeneration potentials of mesophyll protoplasts from cultivated and a wild species of tomato. *Planta* **148**, 96-98.
 8. Sharon, M. K. and Lineberger, R. D. (1983) Genotypic differences in morphogenic capacity of cultured leaf explants of tomato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **108**, 710-714.
 9. Behki, R. M. and Lesley, S. M. (1976) In vitro plant regeneration from explants of *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Canj. Bot.* **54**, 2409-2413.
 10. Kartha, K. K., Champous, S., Gamborg, O. L. and Phal, K. (1977) *In vitro* propagation of tomato by shoot apical meristem culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **102**, 346-349.
 11. Kim, J. C., Choi, S. J., Lim, C. J. and Cho, D. H. (1992) Plant regeneration from protoplast in *Lycopersicon esculentum* and *L. hirsutum*. *Korean J. Plant Tissue Culture* **19**, 351-355.
 12. Lim, H. T. (1991) Somaclonal variation in leaf-callus regenerated plants of *Lycopersicon esculentum* L. var. Rutgers. *J. Sci. & Technology (KNU)*. **30**, 380-388.
 13. Lim, H. T. and Hoffman, F. M. (1991) Morphological and anatomical changes on tissue-cultured plantlets of *Lycopersicon esculentum* L. during their acclimatization. *Korean J. Plant Tissue Culture* **18**, 369-375.
 14. Sibi, M. M., Biglary, M. and Demarly, Y. (1984) Increase in the rate of recombinants in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) after in vitro regeneration. *Theor. Appl. Genet.* **68**, 317-321.
 15. Tan, M. M. C., Rietveld, E. M., Marrewijk G. A. M. V. and Kool, A. J. (1987) Regeneration of leaf mesophyll protoplast of tomato cultivars (*L. esculentum*): Factors important for the efficient protoplast culture and plant regeneration. *Plant Cell Rep.* **6**, 172-175.
 16. Kim, Y. H., Park, C. H. and Park, S. U. (2002) Effect of silver nitrate (AgNO₃) and polyamines on shoot organogenesis and plant regeneration of *Lycopersicon esculentum* cultivar, Micro-Tom. *Korean J. Plant Biotech.* **29**, 25-29.
 17. Sutter, E. (1988) Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from in vitro culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **113**, 234-238.
 18. Wetzstein, H. Y. and Sommer, H. E. (1982) Leaf anatomy of tissue cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. *Amer. J. Bot.* **69**, 1579-1586.
 19. Skoog, F. and Miller, C. D. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **11**, 118-130.
 20. Lim, H. T., Lee, K. S., Yeong Y. R., Song, Y. N. and Kim J. H. (1994) Plant regeneration from hypocotyls explants of several species of *Lycopersicon*. *Korean J. Plant Tiss. Cult.* **21**, 137-143.