

Kelpak[®] 침지 처리에 의한 형질전환 장미 기내 식물체 발근 촉진

이수영 · 권오현 · 이해진 · 김원희

Effect of Kelpak[®] on the promotion of *in vitro* rooting in transgenic rose plantlets

Su Young Lee · O Hyeon Kwon · Hye Jin Lee · Won Hee Kim

Received: 21 October 2014 / Revised: 25 October 2014 / Accepted: 1 November 2014
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract In order to promote *in vitro* rooting in SOD2-transgenic rose plantlets, which were not well rooted in a rooting medium (MS medium with NAA 0.03 mg·L⁻¹), we dipped the plantlets into liquid Kelpak[®] before placing them in the rooting medium. After 4 weeks, Kelpak[®] significantly promoted *in vitro* rooting in the plantlets. Therefore, Kelpak[®] can be used successfully to aid in the *in vitro* rooting of rose plantlets with roots that are not well-generated.

서론

2013년 형질전환 품종의 재배면적은 1억7530만 ha이다. 이는 농민들이 형질전환 품종을 실질적으로 재배하기 시작한 1996년에 비해 100배 이상 증가된 것으로 앞으로도 계속 증가될 것으로 예상되고 있다. 세계적으로 주요 절화류의 하나인 장미의 경우 일본 Suntory (사)에서 화색변형 형질전환 품종 ‘APPLAUSE’을 상업화에 성공한 이후에도 화색 변형 형질전환 품종 개발 연구를 계속하고 있다(Nakamura et al. 2011). 그러나 이 형질전환 기술을 이용하여 신품종을 개발하고자 할 때 이론적으로는 변형시키고자 하는 특성을 조절하는 유전자의 도입에 의해 목표 형질만 변형되어야 하지만 때때로 변형시키고자 하는 특성이 원하는 정도로 발현되지 않거나 예상치 못한 특성이 변형되는 side effect 현상이 발생한다고 보고되고 있다(Singer et al. 2012; Brunner et al. 2011; Yabor et al. 2006). 이 side effect 현상은 외래 유전자 도입 후 enhancer-promoter간의 부적당

한 상호작용이나 염색체 위치효과에 의해 기인한다고 알려져 있는데, 최근 insulator삽입을 통하여 형질전환체에서의 side effect 빈도를 줄이고자 하는 연구가 이루어지고 있다(Singer et al. 2012; Butaye et al. 2005). 장미 형질전환체 개발 연구에 있어서는 현재까지 side effect에 관한 연구보고는 없었으나 본 연구팀에서 최근 개발중인 SOD2 유전자 도입 장미 형질전환체의 경우 기내식물체의 뿌리 발생이 저해되는 것이 관찰되었다.

Kelpak[®]은 South Africa의 Simons Town에 위치한 Kelp Products가 cold cell-burst 공정에 의해 갈색조류인 *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenfuss의 엽상체(fronde)와 자루(stipe)로부터 추출한 해초 추출액으로서 그것이 함유하고 있는 호르몬에 의한 생장촉진작용으로 최근 농업적 이용에 대한 연구가 증가되고 있다(Arthur et al. 2013; Robertson-Andersson et al. 2006). 화훼작물로서 marigold (van Staden et al. 1994), rosemary (Kadner et al. 2010) *Pelargonium* (Krajnc et al. 2012), *Kniphofia pauciflora*와 *Scilla krausii* (Lindsey et al. 1998), *Anthurium parvispathum* (Atta-Alla et al. 1998), *Eucalyptus* (van Staden et al. 1995) *Dendrobium* (Venturieri & Pickscius 2013) 등에서 생장과 발육증진에 Kelpak[®] 분무 처리나 침지처리가 효과적이었다는 보고가 있다. 현재까지 Kelpak[®] 처리에 의한 식물의 생육촉진 연구의 대다수는 기외식물체를 대상으로 하였다. 0.25% Kelpak[®] 이 첨가된 배지에 배양된 감자 유식물체가 Kelpak[®] 이 첨가되지 않은 배지에 배양된 감자 유식물체보다 생장이 증진되었다고 보고한 Kowalski 등(1999)의 연구 외에는 Kelpak[®] 처리에 의한 기내식물체의 생육촉진에 관한 연구 보고는 없고, 더욱이 기내식물체의 발근촉진 연구는 전무하다. 또한 현재까지 기외식물체를 대상으로라도 Kelpak[®] 처리에 의한 장미의 발근촉진에 관한 연구보고는 없다.

S. Y. Lee (✉) · O. H. Kwon · H. J. Lee · W. H. Kim
농촌진흥청 국립원예특작과학원 화훼과
(National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural
Development Administration, Suwon 441-440, Korea)
e-mail: lsy8542224@korea.kr

본 연구는 Kelpak® 침지 처리에 의해 도입유전자의 영향으로 기내 발근이 저해된 형질전환 장미 기내 식물체의 발근촉진 가능성을 조사해 보고자 실시하였다.

재료 및 방법

국립원예특작과학원에서 내환경성 증진 식물체를 개발하기 위하여 스트레스저항성 형질전환체 개발을 위한 연구에서 널리 이용되는 대장균 유래 SOD2 유전자를 도입한 후 PCR 및 서던분석에 의해 유전자의 도입 여부를 확인하였고, Real-time PCR 및 Western 분석에 의해 도입유전자의 전사체 및 단백질 발현을 확인한 후(자료 없음) 도입유전자의 기능 검정을 위해 cefotaxim 250 mg·L⁻¹과 ppt 1 mg·L⁻¹가 첨가된 기내 신초증식 배지[Murashige & Skoog (MS) (Murashige와 Skoog 1962) components (Duchefa, The Netherlands) + BAP (Sigma, Germany) 1 mg·L⁻¹ + IBA (Sigma, Germany) 0.1 mg·L⁻¹ + sucrose (Duchefa, The Netherlands) 30 g·L⁻¹, plant agar (Duchefa, The Netherlands) 7.2 g·L⁻¹, pH 5.8]에서 증식중인 KS1 등 형질전환 7계통과 비형질전환 계통을 사용하였다. 형질전환 계통과 비형질전환 계통의 신초(초장 2~2.5 cm)를 filter system (Corning, USA)으로 멸균한 Kelpak® (미림, Korea)액에 침지 후 발근배지[MS components + NAA (Duchefa, The Netherlands) 0.03 mg·L⁻¹, sucrose 30 g·L⁻¹, plant agar 8 g·L⁻¹, pH 5.8]에 배양하였으며, 4주 후

뿌리 발생 여부 등을 조사하였다.

결과 및 고찰

형질전환 기술을 이용하여 개발된 식물체들의 일부에서 때때로 나타나는 의도하지 않은 특성의 변화를 side effect라고 한다. 이 side effect는 외래 유전자 도입 과정이나 도입유전자와 그 식물체의 유전적 또는 환경적 요인과의 상호작용에 의해 발생한다고 알려져 있다(Yabor et al. 2006). 현재까지의 장미 형질전환체 개발 연구에서 side effect에 대한 보고는 없었으나, 본 연구팀은 최근 SOD2 유전자를 도입하여 획득한 계통 중 일부에서 발근 저해 현상을 관찰하였다(자료 없음). 이 SOD2유전자 형질전환체의 발근 저해 현상의 정확한 원인 구명 연구에 앞서 도입유전자의 기능 분석 실험을 위한 식물체를 획득하고자, Kelpak® 침지 처리에 의해 NAA 0.03 mg·L⁻¹첨가 발근유도배지에서도 뿌리발생이 잘 되지 않는 장미 형질전환 기내식물체의 발근 촉진 가능성 조사하였다. Kelpak® 액에 침지 후 발근유도배지에 배양 한 지 4주 후 뿌리발생 여부와 뿌리길이 및 뿌리 수 등을 조사한 결과, Kelpak® 이 도입유전자의 영향으로 발근이 저해되었을 것으로 추정되는 장미 SOD2형질전환체의 기내뿌리 유도 및 뿌리생장에 효과적임을 확인하였다(Fig. 1). Kelpak®처리 없이 발근유도 배지에서는 뿌리가 발생되지 않았던 4계통 중 2계통

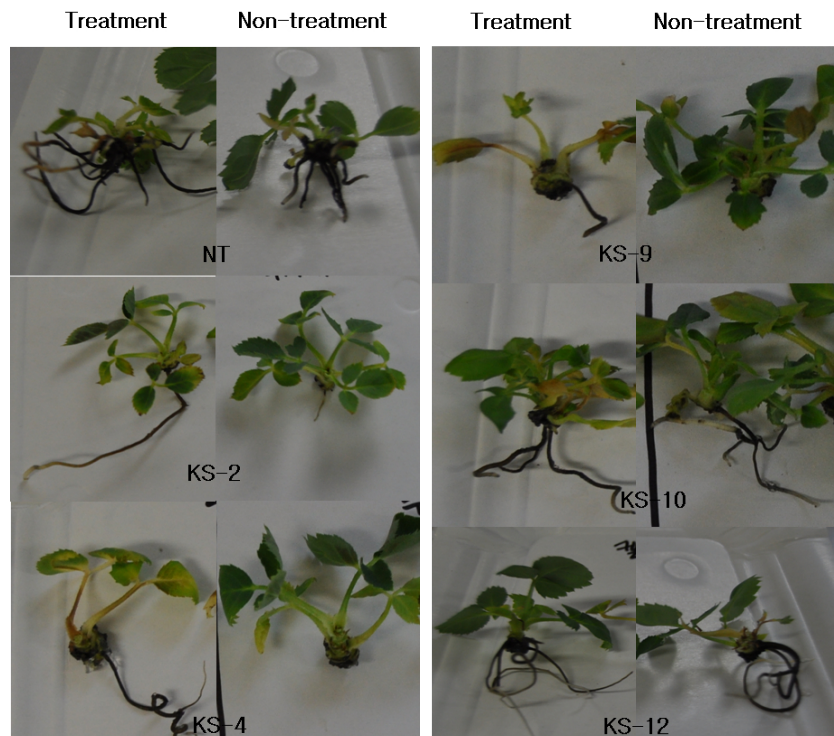


Fig. 1 Effect of liquid Kelpak® on the promotion of rooting in transgenic rose plantlets. NT, non-transgenic rose plant; KS-2, KS-4, KS-4, KS-9, KS-10, and KS-11, SOD2-transgenic rose lines

(KS-4과 KS-9)은 Kelpak[®] 침지 후 발근유도배지에 배양하였을 때 뿌리가 유도되었다. Kelpak[®] 처리 없이 발근유도배지에서 뿌리가 발생하였던 3계통중 2계통(KS-2과 KS-10)은 Kelpak[®] 침지 처리했을 때 뿌리 발생율이 향상되었고, 뿌리수도 증가하였으며, 뿌리의 길이생장도 증진되었다. 나머지 1계통(KS-12)은 Kelpak[®] 침지 처리없이도 발근배지에 배양되었을 때 보다 뿌리발생률과 뿌리길이 생장은 약간 저하되었으나 뿌리수는 증가되었다. 반면, KS-1과 KS-11의 경우 Kelpak[®] 처리 후에도 뿌리가 발생되지는 않았다(Fig. 2, 3, 4). Arthur 등 (2013)은 Kelpak[®] 처리에 의한 녹두의 식물생장 촉진에 있어서 물의 pH와 성분의 영향에 관한 연구에서 Kelpak[®] 을 원액으로 처리하는 것 보다 희석하여 처리하는 것이 녹두의 발근력이나 생육증진에 효과적이었다고 하였고, Jones와 van Staden (1997)도 소나무 삼목묘 발근에 미치는 Kelpak[®] 처리 효과 연구에서

Kelpak[®] 원액으로 처리했을 때 보다 1:10으로 희석하여 처리했을 때 소나무의 발근율이 향상되었다고 보고한 바 있으므로 저농도의 Kelpak[®] 처리에 대한 향후 보완 실험이 필요하리라 생각된다. 또한 Lindsey 등 (1998)은 *Kniphofia pauciflora*와 *Scilla krausii* 기내 식물체의 순화에 미치는 Kelpak[®]의 효과 연구에서 위의 두 종류 기내 식물체의 순화를 위하여 토양으로 이식한 후 토양관주 처리하는 것이 순화효 활착에 효과적이었다고 보고한 바 있으므로 발근이 어려운 SOD2형질전환 장미 기내식물체를 기내 발근 과정을 거치지 않고 순화할 때 Kelpak[®] 침지한 신초를 토양으로 이식하거나 토양으로 이식 후 Kelpak[®] 을 토양관주 처리하는 것에 대한 향후 보완 연구도 필요하리라 생각된다. Stirk 등 (2014)은 식물 생육 및 발근 촉진에 대한 Kelpak[®]의 효과는 그것에 함유된 천연 식물생장조절 물질들의 혼합 작용으로 발생하는 식물에 유효한 생리적 반응의 결과라고 하였고, Robertson- Andersson 등 (2006)은 Kelpak[®] 이 차가운 공정과정에 의해 제작되어 오옥신 함량이 높다고 하였다. Kelpak[®]의 처리에 의한 본 연구의 실험재료인 SOD2 장미 형질전환체의 발근촉진 현상이 Stirk 등 (2014)이나 Robertson-Andersson 등 (2006)의 보고와 같이 호르몬에 의한 작용에서 기인된 것인지는 Kelpak[®] 처리 전후의 SOD2유전자 도입 식물체의 호르몬 분석 또한 보완연구가 필요 할 것이다. 본 연구는 사용된 재료가 형질전환체이고 또한 도입유전자의 기능 검정을 앞두고 있어 실험 반복이 없었고 더욱이 실험 개체수도 적었지만 대조식물체인 비형질전환식물체도 Kelpak[®] 침지 처리후 발근유도배지에 배양한 것이 Kelpak[®] 처리 없이 발근유도배지에 배양한 것보다 뿌리수도 증가했을 뿐 아니라 뿌리길이 생장도 증진된 것으로 볼 때 Kelpak[®]이 장미 기내 식물체의 발근 촉진에 효과적인 것은 분명하다.

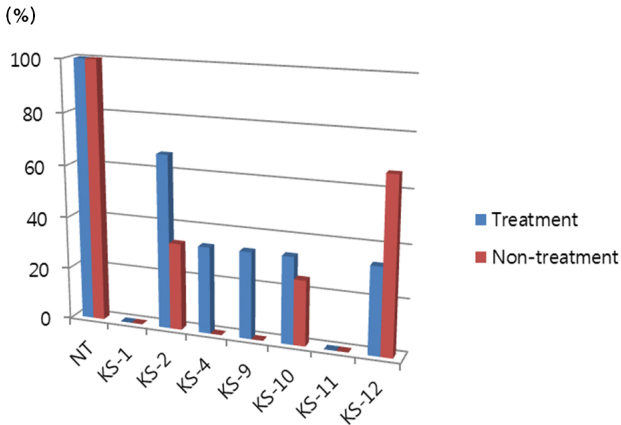


Fig. 2 Effect of liquid Kelpak[®] on the promotion of increased rooting percentage in transgenic rose plantlets. NT, non-transgenic rose plant; KS-1, KS-2, KS-4, KS-4, KS-9, KS-10, KS-11, and KS-12, SOD2-transgenic rose lines

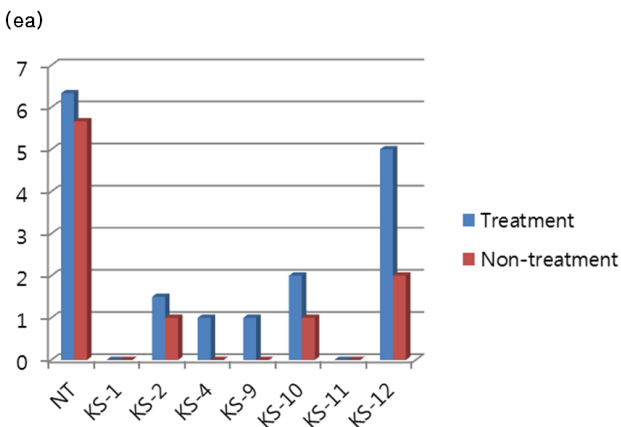


Fig. 3 Effect of liquid Kelpak[®] on the increase in the number of roots in transgenic rose plantlets. NT, non-transgenic rose plant; KS-1, KS-2, KS-4, KS-4, KS-9, KS-10, KS-11, and KS-12, SOD2-transgenic rose lines

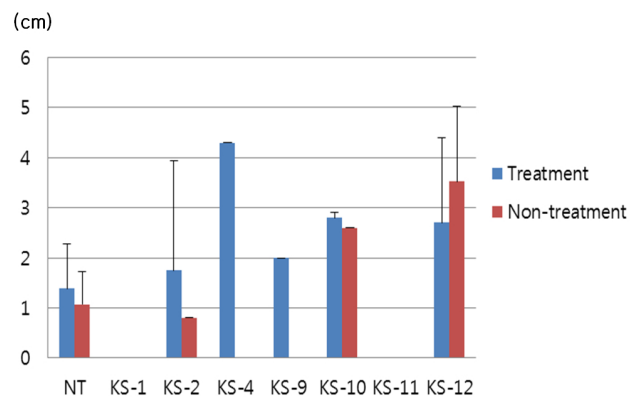


Fig. 4 Effect of liquid Kelpak[®] on the increase in root growth in transgenic rose plantlets NT, non-transgenic rose plant; KS-1, KS-2, KS-4, KS-4, KS-9, KS-10, KS-11, and KS-12, SOD2-transgenic rose lines

적 요

도입 유전자의 영향으로 발근유도배지(NAA 0.03 mg·L⁻¹ 첨가 MS배지)에서도 발근이 잘 되지 않는 SOD2유전자 도입 장미 형질전환체의 Kelpak[®] 침지에 의한 발근 촉진 가능성을 조사하였다. Kelpak[®] 액에 침지 후 발근유도배지에 배양 4주 후 장미 SOD2형질전환체의 기내뿌리 유도 및 뿌리생장이 촉진되었다. 또한 대조식물체인 비형질전환식물체도 Kelpak[®] 침지 처리후 발근유도배지에 배양하는 것이 Kelpak[®] 처리 없이 발근유도배지에 배양하는 것보다 뿌리수도 증가했을 뿐 아니라 뿌리길이 생장도 증진된 것으로 볼 때 Kelpak[®]이 장미 기내식물체의 발근 촉진에 효과적인 것은 분명하다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 농업과학기술개발연구사업(과제 번호: Pj009268012014)의 지원으로 수행되었습니다.

References

- Arthur GD, Aremu AO, Moyo M, Stirk WA, van Staden J (2013) Growth-promoting effects of a seaweed concentrate at various pH and water hardness. *South African J Sci* 109:11-12
- Atta-Alla H, McAlister BG, van Staden J (1998) In vitro culture and establishment of *Anthurium parvispathum*. *South African J Bot* 64:296-298
- Brunner S, Stimweis D, Quijano CD, Buesing G, Herren G, Parlange F, Barret P, Tassy C, Sautter C, Winzeler M, Keller B (2011) Transgenic Pm3b wheat lines show resistance to powdery mildew in the field. *Plant Biotech J* 9:897-910
- Butaye KMJ, Cammue BPA, Delaure SL, De Bolle MFC (2005) Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. *Mol Breed* 16:79-91
- Jones NB, van Staden J (1997) The effects of a seaweed application on the rooting of pine cuttings. *South African J Bot* 63:141-145
- Kadner R, Eckardt S, Junghanns W (2010) The influence of rooting stimulating substances, propagation time, propagation system and source of cutting on rooting of a carnosolic acid rich rosemary genotype (*Rosmarinus officinalis* L.). *Zeitschrift für Arznei- & Gewürzpflanzen* 15:23-30
- Kowalski B, Jager AK, van Staden J (1999) The effect of a seaweed concentrate on the in vitro growth and acclimatization of potato plantlets. *Potato Res* 42:131-139
- Krajnc AU, Ivanus A, Kristl J, Susek A (2012) Seaweed extract elicits the metabolic responses in leaves and enhances growth of *Pelagornium* cuttings. *Eur J Hort Sci* 77:170-181
- Lindsey KL, Jager AK, van Staden J (1998) Effect of a seaweed concentrate on acclimatization of in vitro grown plantlets of *Kniphofia pauciflora* and *Scilla krausii*. *South African J Bot* 64:262-264
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Nakamura N, Fukuchi-Mizutani M, Katsumoto Y, Togami J, Senior M, Matsuda Y, Furuichi K, Yoshimoto M, Matsunaga A, Ishiguro K, Aida M, Tasaka M, Fukui H, Tsuda S, Chandler S, Tanaka Y (2011) Environmental risk assessment and field performance of rose (*Rosa×hybrida*) genetically modified for delphinidin production. *Plant Biotech* 28: 251-261
- Robertson-Andersson DV, Leitao D, Bolton JJ, Anderson RJ, Njobeni A, Ruck K (2006) Can kelp extract (Kelpak[®]) be useful in seaweed mariculture? *J Appl Phycol* 18:315-321
- Singer SD, Liu Z, Cox KD (2012) Minimizing the unpredictability of transgene expression in plants: the role of genetic insulators. *Plant Cell Rep* 31:13-25
- Stirk WA, Tarkowska D, Turecova V, Strnad M, van Staden J (2014) Abscisic acid, gibberellins and brassinosteroids in Kelpak[®], a commercial seaweed extract made from *Ecklonia maxima*. *J Appl Phycol* 26561-567
- Vanstaden J, Beckett RP, Rijkenberg MJ (1995) Effect of seaweed concentrate on the growth of the seedlings of 3 species of Eucalyptus. *South African J Bot* 61:169-172
- Vanstaden J, Upfold SJ, Drewes FE (1994) Effect of seaweed concentrate on the growth and development of the marigold tagetes-patula. *J Appl Phycol* 6:427-428
- Venturieri GA, Pickscius FJ (2013) Propagation of Noble Dendrobium (*Dendrobium nobile* Lindl.) by cutting. *Acta Scientiarum-Agronomy* 35:501-504
- Yabor L, Arzola M, Aragon C, Hernandez M, Arencibia A, Lorenzo JC (2006) Biochemical side effects of genetic transformation of pineapple. *Plant Cell Tiss Org Cult* 86:63-67