

## 국화의 엽절편 배양에 의한 식물체 재생

이윤경 · 권영주 · 이규민 · 형남인\*

상명대학교 원예과학과

### Plant Regeneration from Leaf Segment Cultures of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev)

LEE, Yoon Kyung · KWON, Young Joo · LEE, Kyu Min · HYUNG, Nam In\*

Department of Horticultural Science, Sangmyung University, Chonan, 330-180, Korea

**ABSTRACT** Efficient plant regeneration via shoot organogenesis from *in vitro* cultured leaf segments of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev cv. Namjeon) was achieved. Adventitious shoot formation from leaf explants was greatly influenced by plant growth regulator, leaf age, light condition, explant number per culture vessel, and explant orientation. Leaf segments, obtained from fully expanded young 1-2nd leaves and inoculated 8 explants per petri-dish with adaxial surface contact with MS medium supplemented with 0.5 mg/L BA and 2.0 mg/L NAA, produced 100% regeneration frequency and 13.7 shoots per explant. Regenerated adventitious shoots were successfully rooted in MS medium with 0.1 mg/L NAA. The plantlets were acclimatized in artificial soil mixtures (Vermiculite:Perlite=1:1), and transferred to greenhouse for flowering. The regenerated plants showed normal phenotypes.

**Key words:** Adventitious shoot formation, *Chrysanthemum morifolium*, leaf explant, plant growth regulator

#### 서 론

국화는 장미, 카네이션과 더불어 세계 3대 절화작물 중의 하나이다. 국화의 품종 육성은 관행적 육종법, 선발 및 돌연변이 유도를 통하여 이루어져 왔으나 (De Jong and Clusters 1986; Drewlow et al. 1973) 외래유전자의 도입을 위한 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환법이 국화의 새로운 육종법으로 자리잡아가고 있다 (Bush and Pueppke 1991; Ledger et al. 1991). 형질전환법은 특정 유용형질의 육종에 이용될 수 있는 장점이 있으므로 국화에 있어서 화색, 개화시기, 내병성 등과 같은 상품성 및 재배 특성 등의 개량에 효과적으로 이용될 수 있을 것이다 (Courtney-Gutterson et al. 1994).

형질전환 식물체의 생산을 위해서는 효율적인 식물체 재생 체계의 확립이 필수적으로 선결되어야 한다. 국화의 조직배양

은 급속증식 (Ben-Jaacov and Langhans 1972)에 이어 식물체 재생 (Bush et al. 1976; Earle and Langhans 1974)으로 이어졌다. 식물체 재생은 체세포배형성 (May and Trigiano 1991)을 거쳐 이루어지기도 하였으나, 주로 기관형성 (Kaul et al. 1990)을 통하여 이루어졌다. 국화의 식물체 재생에서 부정지 형성에 관한 초기의 보고들 (Bush et al. 1976; Roest and Bokelmann 1975; Sutter and Langhans 1981)은 배양과정 중 초반기에 주로 캘러스 단계를 거치게 된다고 하였는데, 이는 체세포 영양계 변이와 키메라가 형성될 수 있는 가능성을 많이 내포하고 있다. 이러한 문제점을 해결하고자 국화의 잎과 줄기 절편체로부터 직접적으로 신초를 유도하는 방법이 보고되기도 하였다 (Kaul et al. 1990; Lu et al. 1990).

국화의 절편체로부터 신초 기관형성은 절편체의 종류, 생장 조절제의 종류 및 농도, 배지조성 등의 요인에 의해 많은 영향을 받는다. 특히 신초 재생에 적합한 생장조절제의 종류 및 농도에 있어서는 품종에 따라 매우 상이한 보고가 이루어지고 있다. 이와 같이 국화의 식물체 재생 과정은 품종에 따라 상당한 차이를 나타내는 것으로 알려져 있기 때문에 상업적

\*Corresponding author. Tel 0417-550-5430

E-mail nihyung@smuc.sangmyung.ac.kr

으로 유용한 품종을 대상으로 형질전환 식물체를 얻기 위해서는 형질전환에 앞서 대상 품종에 대한 식물체 재생의 효율적인 조건 구명이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 국화의 기내배양된 엽절편으로부터 신초 재생에 적합한 성장조절제, 광조건, 엽령, 치상방향, 용기당 절편체 수 등을 구명하고 재생된 신초의 발근 및 활착을 유도하고자 하였으며, 이를 통하여 기관형성 과정을 통한 효율적인 식물체 재생 체계를 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 신초배양

국화 (*Dendranthema grandiflora* cv Namjeon)의 신초배양에서 얻어진 잎의 절편을 식물체 재생의 재료로 이용하였다. 신초배양에서는 MS 염류와 비타민 (Murashige and Skoog 1962)에 BA 1.5 mg/L, NAA 0.3 mg/L, sucrose 30 g/L, agar 8 g/L를 첨가하고 pH를 5.8로 조절된 배지를 이용하였다. 배양은  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 형광등을 이용한 2,000 lux, 24시간 연속 조명하에서 이루어졌으며, 4주 간격으로 계대배양을 실시하였다.

### 신초 재생

신초 재생 실험에서는 신초배양 배지에서 3주간 배양한 신초의 완전히 전개된 잎을 재료로 사용하였다. 신초 재생에 적합한 조건을 구명하기 위하여 성장조절제, 엽절편체의 연령과 광조건, 배양용기당 절편체 수와 치상방향 등에 관한 실험을 각각 실시하였다. 기본배지는 MS 염류, 비타민에 sucrose 30 g/L, agar 8 g/L를 첨가한 것을 사용하였다. 적절한 성장조절제 농도를 알아보기 위하여 BA 0.5, 1, 2 mg/L와 NAA 0.2, 0.5, 1, 2 mg/L를 조합한 12개 농도를 각각 기본배지에 첨가하였다. 엽절편체의 엽령은 신초 상단부로부터 전개된 1, 2번 잎 또는 3, 4번 잎을 구분하였으며, 광조건으로 명처리에서는 신초배양과 동일한 24시간 연속조명으로 배양하였고, 암처리에서는 배양 초기 1주일간 암상태에 두었다가 명처리와 동일한 조건으로 옮겨 배양하였다. 또한, 치상방향과 배양용기당 절편체 수가 재생에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배지 25 mL를 분주한 Petri-dish (100 mm × 15 mm)에 4, 8, 12 개씩의 엽절편체를 잎의 배측면 (abaxial side) 또는 향측면 (adaxial side)이 배지에 닿도록 각각 치상하여 배양하였다. 엽절편체는 신초에서 절취하여 주맥부를 중심으로 0.5 × 0.5 cm 크기로 4면을 절단한 다음 배지에 치상하였으며, 모든 처리는 배양용기당 4~12개씩 치상한 것을 1반복으로 하여 처리당 5반복으로 하였다. 암처리를 제외한 모든 배양은 신초배양과 동일한 조건에서 실시하였다. 배양 중 절편체로

부터 신초 재생률, 절편체당 신초 수 등을 치상 후 1주 간격으로 6주 동안 조사하였다.

### 발근 및 활착

재생된 신초 중 1 cm 이상 크기의 신초를 절단하여 NAA 0.1 mg/L가 첨가된 MS배지로 옮겨 신초의 신장과 발근을 유도하였다. 성공적으로 발근된 소식물체는 인공토양 (Vermiculite:Perlite = 1:1)이 들어 있는 분에서 약 4주간 활착을 시킨 후, 다시 토양이 들어있는 분에 정식하였으며 온실에서 재배하며 개화를 유도하였다.

## 결 과

### 성장조절제의 영향

엽절편 배양을 통한 신초형성에 적합한 성장조절제의 농도를 알아보기 위하여 NAA와 BA를 조합처리한 결과는 table 1과 같았다. 성장조절제에 의한 신초 재생은 NAA 농도가 높을수록, BA 농도가 낮을수록 양호한 경향을 보여주었다. 신초 재생은 BA에 비하여 NAA에 의한 영향이 큰 것으로 나타났는데, BA 농도에 관계없이 NAA 0.2~0.5 mg/L에서는 전혀 이루어지지 않거나 매우 낮았던 반면 1.0~2.0 mg/L에서는 전반적으로 높은 신초 재생률과 다수의 신초가 재생되었다. 신초 재생에 있어서 성장조절제 처리 가운데 NAA 2.0 mg/L + BA 0.5 mg/L 조합처리가 신초 재생률 83%, 절편체당 신초수 3.8개로 가장 효과적으로 나타났다. 엽절편체로부터 재생된 신초는 저농도의 BA가 첨가된 배지에서 양호하게 신장하였다.

**Table 1.** Effects of NAA and BA on shoot regeneration from leaf explants after 6 weeks of culture in chrysanthemum.

Plant growth regulators		Shoot regeneration (%)	Shoot no. / Explant
NAA (mg/L)	BA (mg/L)		
0.2	0.5	0.0c <sup>a</sup>	0.0d
	1.0	0.0c	0.0d
	2.0	0.0c	0.0d
0.5	0.5	6.2c	1.0c
	1.0	0.0c	0.0d
	2.0	8.3c	3.0b
1.0	0.5	53.0b	3.8b
	1.0	14.3c	6.5a
	2.0	50.0b	1.5c
2.0	0.5	83.0a	3.8b
	1.0	50.0b	2.0bc
	2.0	60.0b	3.3b

<sup>a</sup>Duncan's multiple range test at 5% level.

**Table 2.** Effects of leaf age and light treatment on shoot regeneration from leaf explants after 6 weeks of culture in chrysanthemum.

Light condition <sup>a</sup>	Leaf age <sup>b</sup>	Shoot regeneration (%)	Shoot no. / Explant
Light	1, 2nd	1.9c <sup>c</sup>	30.6c
	3, 4th	0.8c	18.0c
Dark	1, 2nd	12.0a	88.9a
	3, 4th	3.5b	58.3b

<sup>a</sup>Explants were cultured under continuous light or dark condition for a one week and then cultured under light condition.

<sup>b</sup>Fully expanded leaves were collected from the top of shoots cultured *in vitro*.

<sup>c</sup>Duncan's multiple range test at 5% level.

**Table 3.** Effects of explant number per plate and explant orientation on shoot regeneration from leaf explants after 6 weeks of culture in chrysanthemum.

Explant no. / Plate	Surface in contact with medium	Shoot regeneration (%)	Shoot no. / Explant
4	Abaxial	5.5c	52.8b <sup>a</sup>
	Adaxial	16.7a	75.0ab
8	Abaxial	9.6bc	87.5ab
	Adaxial	12.9ab	100.0a
12	Abaxial	5.5c	66.7b
	Adaxial	5.0c	91.7a

<sup>a</sup>Duncan's multiple range test at 5% level.

### 엽령과 광조건의 영향

발달단계에 따라 채취한 엽절편체와 배양 기간중 광조건이 신초 재생에 미치는 영향을 알아보기 위하여 엽령에 따라 신초 상단부의 1~2번째 잎과 3~4번째 잎을 나누어 비교하였으며, 배양 초기 1주간 명처리와 암처리로 광조건을 달리하여 실험한 결과를 table 2에 나타내었다. 엽령에 따른 반응에 있어서 1~2번째 잎이 3~4번째 잎에 비해 재생률과 절편체당 신초 수에서 양호하였다. 또한, 엽절편 배양 초기 1주간의 암처리가 명처리에 비해 신초 재생률, 절편체당 신초 수에서 현저히 좋은 것으로 나타났다. 그러나 명처리에서는 배양 2주, 암처리에서는 배양 3주부터 신초 재생이 이루어져 명처리에서 재생 반응이 1주일 정도 빠르게 진행됨을 알 수 있었다. 그리하여 신초 상부의 1~2번째 잎을 절편체로 이용하고, 배양초기 1주간 암처리한 처리구에서 재생률이 88.9%, 절편체당 신초 수는 12개로 매우 양호한 결과를 얻을 수 있었다.

### 배양용기당 절편체 수와 치상방향의 영향

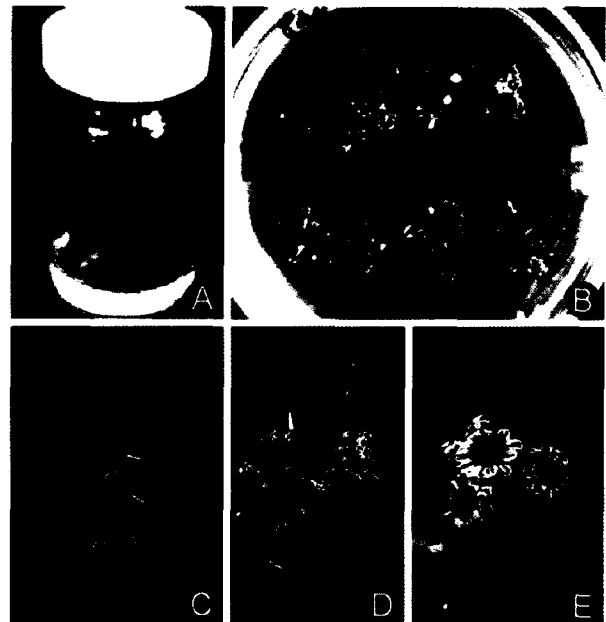
배양용기당 절편체 수를 달리하고 동시에 절편체의 향측면(adaxial side)이나 배측면(abaxial side)이 배지에 닿도록 치상하여 신초 재생에 미치는 효과를 알아본 결과는 table 3과

같았다. 신초 재생에 있어서 배양용기당 절편체 수에 따른 차이는 인정되지 않았으나 8개나 12개의 절편체 치상시 신초 재생률이 다소 높았다. 절편체의 치상방향은 향측면이 배지에 닿도록 절편체를 치상하는 것이 전반적으로 재생률이나 신초 수에서 효과적이었다. 용기당 8개의 절편체를 향측면이 배지에 닿도록 치상한 처리구에서 신초 재생률 100%, 절편체당 12.9개의 신초가 형성되어 가장 좋았다(Table 3, Figure 1B). 또한 엽절편체는 배측면에 비해 향측면이 배지에 닿도록 치상하였을 때 배양중 엽절편체의 비대 성장과 신초 유도 후 신장 생장이 보다 빠르게 일어났다.

## 고 찰

국화 '남전'의 기내배양 신초에서 얻어진 엽절편체로부터의 신초형성은 배양 2주 후부터 이루어지기 시작하였으며, 배양기간에 비례하여 신초 형성률이 증가하는 경향을 보여주었다. Arabaud 등 (1994)은 국화의 엽절편체에서 눈의 분화는 약 11일, 첫 번째 잎이 관찰되는 것은 약 17일 정도라고 보고한 바 있다. 이로 보아 국화의 신초 재생은 품종에 따른 차이는 있으나 약 2주 정도의 기간이 소요된다고 보여진다.

엽절편체로부터 신초 재생에 적합한 성장조절제는 NAA 농도가 높을수록 BA 농도가 낮을수록 양호한 결과를 나타내



**Figure 1.** Plant regeneration via direct shoot organogenesis from leaf segment in chrysanthemum. A, Stock cultures, maintained on MS medium with 1.5 mg/L BA and 0.3 mg/L NAA, produced leaf materials; B, Adventitious shoot formation from leaf segments cultured on MS medium with 0.5 mg/L BA and 2.0 mg/L NAA after 4 weeks in culture; C, Rooting of the regenerated shoots on MS medium with 0.1 mg/L NAA; D-E, Plants regenerated from leaf explants were transferred to soil and maintained to flowering.

어 NAA 2.0 mg/L + BA 0.5 mg/L 처리가 가장 효과적이었다. 그러나 국화는 신초 기관형성 과정에서 요구되는 auxin과 cytokinin의 비율에 대한 상반된 보고가 이루어졌는데, Lu 등 (1990)은 'Royal Purple'에서 BA 0.5 mg/L + NAA 1.0 mg/L가 좋았다고 하였으며, Khehra 등 (1995)은 'Early Charm'에서 BA 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L가 좋았다고 하였다. 이와 같이 국화는 신초 재생에 있어서 auxin이 많이 요구되는 품종 (Lu et al. 1990), cytokinin이 많이 요구되는 품종 (Bush and Pueckpe 1991; Khehra et al. 1995), 비슷한 비율이 요구되는 품종 (Kaul et al. 1990) 등으로 다양한 반응을 나타내고 있으며, 이는 다양한 국화 품종들간의 유전적 차이에 기인한 것이라 판단된다.

본 연구에서 엽령에 따라 엽절편체로부터의 재생 능력이 차이를 보여 1~2번째 잎이 3~4번째 잎에 비하여 양호한 것으로 나타났는데, 이는 잎의 발달단계에 따라 기관형성능이 변화하며 어린 잎의 높은 재생능력이 잎의 성숙에 따라 감소한다는 것을 보여준다. Lu 등 (1990)은 국화 'Royal Purple'의 줄기에서 성숙이 진행됨에 따라 기관형성능이 감소하는 것을 보고한 바 있다.

엽절편의 치상방향은 배지에 닿는 면이 향측면인 경우 배양중 엽절편의 크기가 배측면에 비해 크게 비대하며 신초 유도 후 생장이 빠르게 이루어졌다. Nehra와 Stushnoff (1989)은 딸기 엽절편체 배양시 절편체의 치상방향에 있어서 본 연구와 유사한 결과를 얻었는데, 이들은 절편체의 향측면이 배지에 닿게 되면 배측면이 배지에 노출되어 기공을 통한 기체의 확산이 효율적으로 이루어지고 내생의 호르몬 분배의 변화가 나타나게 되어 신초 재생이 촉진될 것이라고 추정하였다.

국화의 식물체 재생은 화판 (Bush et al. 1976), 화경 (Roest and Bokelmann 1975), 잎과 줄기 (Lu et al. 1990; Kaul et al. 1990) 등의 다양한 기관으로부터 이루어졌으며, 그 가운데 줄기 절편체가 엽절편체에 비해 효율적이라는 보고가 있었다 (Kaul et al. 1990; Ledger et al. 1991). 그러나 본 연구에서 엽절편체로부터 100%의 재생률, 절편체당 13.7개의 신초가 형성된 것으로 볼 때, 엽절편체도 매우 효율적인 식물체 재생의 재료가 될 수 있음을 알 수 있다.

한편, 엽절편체로부터 얻어진 신초는 성공적으로 발근되었으며 (Figure 1C), 재생된 식물체는 활착과정을 거쳐 온실에서 재배하여 개화를 유도하였다. 신초배양된 식물체와 비교해 볼 때 재생된 식물체는 엽형, 화색 등 외형적인 형질에 변이를 나타내지 않았다 (Figure 1D-E).

본 연구에서는 기내배양된 신초의 엽절편체로부터 신초 기관형성을 통한 효율적인 식물체 재생 방법을 제시하였으며, 이로부터 신초의 발근 및 활착과정을 성공적으로 진행하였을 뿐만 아니라 재생된 식물체의 개화를 통하여 표현형적으로 정상적인 식물체가 생산될 수 있음을 확인하였다.

## 적 요

국화 '남전'의 기내배양된 엽절편으로부터 신초 기관형성을 통한 효율적인 식물체 재생 체계를 확립하였다. 엽절편으로부터의 부정지 형성은 생장조절제 조성, 잎의 연령, 광조건, 배양용기당 절편체 수 및 치상방향에 의해 많은 영향을 받는 것으로 나타났다. 효율적인 부정지 형성을 위해서는 MS배지에 생장조절제 BA 0.5 mg/L와 NAA 2.0 mg/L를 첨가하는 것이 가장 좋았으며, 엽절편체는 완전히 전개된 신초 상부의 1~2번째 잎을 채취하여 4면을 절단한 다음 잎의 향측면이 배지에 닿도록 하여 Petri-dish당 8개의 엽절편을 치상하여 배양초기 1주간 암조건에서 배양하다가 명조건으로 옮겨주는 것이 가장 효과적이었다. 이와 같은 조건에서 엽절편체로부터 신초 재생률 100%, 절편체당 신초수 13.7개의 양호한 재생이 이루어졌다. 재생된 신초는 NAA 0.1 mg/L를 첨가한 MS배지에서 성공적으로 발근이 이루어져 소식물체가 얻어졌다. 엽절편체로부터 얻어진 소식물체를 인공토양 (Vermiculite: Perlite=1:1)에서 활착시켜 온실에서 재배하였는데, 외관상 정상적으로 개화하였다.

## 인용문헌

- Arabaud M, Carre M, Martin-Tanguy J (1994) Polyamine metabolism and *in vitro* cell multiplication and differentiation in leaf explants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Plant Growth Reg* 15:143-155
- Ben-Jaacov J, Langhans RW (1972) Rapid multiplication of *Chrysanthemum* plants by stem tip proliferation. *HortScience* 7: 259-290
- Bush SR, Earle ED, Langhans RW (1976) Plantlets from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera, *Chrysanthemum morifolium* 'Indianapolis'. *Amer J Bot* 63:729-737
- Bush AL, Pueppke SG (1991) Cultivar-strain specificity between *Chrysanthemum morifolium* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiol Mol Plant Pathol* 39:309-323
- Courtney-Gutterson N, Napoli C, Lemieux C, Morgan A, Riroozabady E, Robinson KEP (1994) Modification of flower color in florist's chrysanthemum: Production of a white-flowering variety through molecular genetics. *Bio/Tech* 12:268-271
- De Jong J, Clusters JBM (1986) Induced changes in growth and flowering of chrysanthemum after irradiation and *in vitro* culture of pedicels and petal epidermis. *Euphytica* 35:137-148
- Drewlow LW, Ascher PD, Widmer RE (1973) Genetic studies of self incompatibility in the garden chrysanthemum '*Chrysanthemum morifolium* Ramat'. *Theor Appl Genet* 43:1-5
- Earle ED, Langhans RW (1974) Propagation of *Chrysanthemum in*

- vitro* II. Production, growth, and flowering of plantlets from tissue cultures. *J Amer Soc Hort Sci* **99**:352-358
- Kaul V, Miller RM, Hutchinson JF, Richards D** (1990) Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Plant Cell Tiss Org Cult* **21**:21-30
- Khehra M, Lowe KC, Davey MR, Power JB** (1995) An improved micropropagation system for chrysanthemum based on Pluronic F-68-supplemented media. *Plant Cell Tiss Org Cult* **41**:87-90
- Ledger SE, Deroles SC, Given NK** (1991) Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. *Plant Cell Rep* **10**:195-199
- Lu C, Nugent G, Wardley T** (1990) Efficient, direct plant regeneration from stem segments of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Royal Purple). *Plant Cell Rep* **8**:733-736
- May RA, Trigiano RN** (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. *J Amer Soc Hort Sci* **116**:366-371
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *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
- Roest S, Bokelmann GS** (1975) Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram. *in vitro*. *Sci Hort* **3**:317-330
- Sutter E, Langhans RW** (1981) Abnormalities in chrysanthemum regenerated from long term cultures. *Ann Bot* **40**:559-568

(접수일자 1999년 1월 11일)