

안개초의 잎 절편체를 이용한 기내재분화

이승우* · 배진주
경희대학교 원예학과

In Vitro Regeneration Using Leaf Segment in *Gypsophila paniculata* L. 'Bristol Fairy'

Lee, Seung Woo* · Bae, Jin Joo
Dept. of Horticulture, Kyung Hee University, Suwon, 449-701, Republic of Korea
*corresponding author

ABSTRACT Experiments were conducted to find out the optimum cultural conditions for adventitious shoot regeneration from leaf segments of *Gypsophila paniculata* L. Thidiazuron (TDZ) was remarkably effective for the regeneration of leaf segment in *Gypsophila paniculata* compared with BA and kinetin. TDZ showed the highest rate of regeneration at 3.0mg · L⁻¹, while kinetin did not affect the regeneration. BA in the medium increased vitrification. Shoot formation efficiency was much higher on 0.3mg · L⁻¹ of IAA-containing media than NAA-containing media. Regeneration of leaf segments was induced with the agar concentrations of 1.0, 1.2 and 1.6%. Dark treatment at the initial stage of the culture increased the rate of regeneration up to 75%. The leaf explants from the 3rd subcultured stock plants after meristem culture, showed the highest adventitious shoot regeneration efficiency.

Additional key words: adventitious bud, dark culture, subculture, thidiazuron, vitrification

서 언

안개초는 앞으로도 전망성이 높은 고소득 작물이라 볼 수 있으나 화색이 백색을 주종으로 다양하지 못한 결점이 있으며 소비패턴의 변화가 빠른 화훼산업에서 소비자의 다양한 요구에 대응할 수 있는 다양한 화색의 품종개발이 시급히 요구된다. 이같은 필요성을 충족시키기 위하여 최근 급속도로 발전하고 있는 유전자 재조합 기술은 안개초의 다양한 화색변이를 획득할 수 있는 효과적인 방법이라고 판단된다. 그러나 안개초에서의 기존의 연구들은 주로 생장점 또는 정단배양에 의한 증식방법에 관한 것들로서 유전자 재조합을 위하여 기본적으로 요구되는 형질전환 체계가 확립되어 있지 못한 실정이며, 잎조직을 이용한 재분화체계에 관한 연구도 미흡한 실정이다.

따라서 본 실험은 안개초 품종의 다양화를 위한 기술개발의 일환으로 안개초 'Bristol Fairy'를 대상으로 잎조직을 이용한 부정아의 재분화에 관한 효율적인 체계확립을 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

본 실험은 온실에서 재배되는 묘를 약 4cm 정도로 채취하여 잎을 줄기에서 분리하고 1.0% sodium hypochlorite(NaOCl)에 15분 표면 살균한 후 멸균수로 10분씩 3회 세척하였다. 잎은 기부쪽을 약 0.5cm 정도 잘라서 10.0×2.5cm 크기의 test tube를 사용하여 24반복으로 치상하였다. 배지는 MS 기본배지를 사용하였고 30

상으로 농도를 0, 0.1, 0.3mg · L⁻¹로 달리 첨가하였다.

Agar적정농도 구명 : TDZ 3.0mg · L⁻¹, IAA 0.3mg · L⁻¹를 동일하게 첨가하고 agar 농도를 0.8, 1.0, 1.2, 1.6%로 처리하였다.

암처리 일수에 따른 재분화 효과 : TDZ 3.0 mg · L⁻¹, IAA 0.3mg · L⁻¹를 동일하게 첨가하고 초기 암처리 일수를 0, 5, 10, 15일로 달리 하였다.

생장점 배양묘의 계대배양 횟수에 따른 분화력 검증 : 온실에서 자라는 묘에서 삽수를 채취하여 위의 실험과 동일한 방법으로 소독한 후 잎을 제거하고 정단을 채취하여 10.0×2.5cm 크기의 test tube에 치상하였다. 4주 간격으로 MS 기본배지에 계대배양을 3회, 4회, 5회 실시하여 식물체가 5cm 정도로 성장했을 때 잎을 채취하여 배양재료로 사용하였다.

결과 및 고찰

Auxin과 cytokinin의 종류 및 적정농도 구명

안개초 'Bristol Fairy'의 잎절편을 이용한 재분화에 있어 cytokinin의 영향은 Table 1과 같다. NAA 0.1mg · L⁻¹를 고정하고 cytokinin의 종류와 농도를 달리하였을 때 재분화율은 TDZ가 첨가된 배지에서 BA와 kinetin에 비해 월등히 높았으며 TDZ 3.0mg · L⁻¹에서 가장 높게 나타났고 절편체당 재분화된 부정아수는 5.6개로 TDZ 5.0mg · L⁻¹에 비해 약 2배의 효과가 나타났다. 또한 TDZ처리에서는 투명화 현상이 나타나지 않았다. 한편 BA 1.0mg · L⁻¹와 3.0mg · L⁻¹에서 재분화율과 절편체당 재분화된 부정아수는 이 두 농도간에 거의 차이가 없었다. 그러나 BA 3.0mg · L⁻¹에서는 재분화된 부정아들 중 84%가 투명화 현상이 나타났다. BA

· L⁻¹ sucrose, 1.0% Bacto agar를 첨가하였고 pH는 5.8로 조정하였다. 배양실 온도를 25 ±1℃로 유지하고, 16시간 일장으로 조절되는 백색 형광등 하에서 6주간 배양한 후에 재분화율과 절편체당 재분화 부정아수, 투명화 발생률 등을 조사하였다.

Auxin과 cytokinin의 종류 및 적정농도 구명 : NAA 0.1mg · L⁻¹을 동일하게 하고 BA, kinetin, TDZ를 대상으로 농도를 1.0, 3.0, 5.0mg · L⁻¹로 달리 첨가한 처리와, TDZ 3.0 mg · L⁻¹를 동일하게 첨가하고 NAA, IAA를 대

Table 1. Effects of cytokinins on regeneration efficiency for leaf segments of *Gypsophila paniculata* 'Bristol Fairy'.

Plant growth regulator (mg · L ⁻¹)	No. of explants	Regeneration ratio (%) ^z	No. of regenerated shoots /explant ^y	Vitrification ratio (%) ^x
BA 1.0 + NAA 0.1	24	30 bc ^w	3.4 b	54 ab
BA 3.0 + NAA 0.1	24	25 bcd	4.0 ab	84 a
BA 5.0 + NAA 0.1	24	8 d	0.7 c	0 c
Kinetin 1.0 + NAA 0.1	24	17 cd	2.3 bc	78 a
Kinetin 3.0 + NAA 0.1	24	8 d	0.7 c	0 c
Kinetin 5.0 + NAA 0.1	24	8 d	0.7 c	33 bc
TDZ 1.0 + NAA 0.1	24	33 abc	4.0 ab	0 c
TDZ 3.0 + NAA 0.1	24	50 a	5.6 a	0 c
TDZ 5.0 + NAA 0.1	24	38 ab	2.8 b	0 c

^wNumber of explants producing adventitious shoots/Total number of explants for each treatment.

^yTotal number of adventitious shoots/Number of explants producing adventitious shoots.

^xNumber of vitrified shoots/Total number of adventitious shoots.

^zMean separation within columns by DMRT at 5% level.

Explants were cultured on MS medium supplemented with 30 g · L⁻¹ sucrose and 1.0% agar.

5.0 mg · L⁻¹에서는 거의 재분화가 일어나지 않았다. BA 농도 중에서는 1.0mg · L⁻¹가 다른 농도에 비해 재분화율이 높았고 부정이 생장이 촉진되었다. Kinetin이 포함된 배지에서 'Bristol Fairy'의 재분화에 거의 효과가 없었으며 재분화된 부정이들 중 다수가 투명화 현상이 나타났다. 이와같이 안개초의 부정이 생성에 TDZ가 cytokinin종류 중 가장 효율적이었는데 이것은 Zuker 등(1997)이 안개초 'Arbel'에서 실험한 결과와 비슷한 경향을 보이는 것이다. 또한 안개초에서 BA가 투명화에 영향을 준다는 Han 등(1991)의 보고와 같이 본 실험에서도 BA 3.0 mg · L⁻¹에서 투명화 현상이 높게 나타나 BA가 투명화 현상에 영향을 주는 것으로 생각된다.

재분화 효율을 높이기 위해 TDZ 3.0mg · L⁻¹를 첨가하고 NAA와 IAA의 농도를 달리하여 실험한 결과는 Table 2와 같다. TDZ 단독처리보다는 IAA의 혼용처리구에서 재분화율과 절편체의 부정이 형성에 효과적이었다. NAA보다는 IAA에서 재분화와 부정이 형성을 촉진하였고 IAA 0.3mg · L⁻¹에서 재분화율이 56%로 NAA에 비해 1.7배 정도, 절편체당 부정이수는 5.5개로 NAA보다 약 1.6~2.1배 많은 부정아를 형성하였다.

Agar 적정농도 구명

재분화 효율을 높이기 위해 agar농도를 달리하여 그 효과를 구명한 결과는 Table 3과 같다. 0.8%에서는 재분화가 일어나지 않았고 0.8%를 제외한 처리간에 유의차는 없었다. Agar는 일반적으로 배지를 고체상태로 만들기 위해서 첨가하며 0.6~1.0%의 농도범위에서 사용한다. 그러나 agar의 농도를 높여줌으로써 식물체의 분화율을 높였다는 보고도 있어 배지형태 외의 목적으로도 쓰이며 배양세포나 조직의 수분에 대한 스트레스로 작용하여 분화를 촉진시키는 것으로 설명되고 있다(Malamug 등, 1992 ; Zang 등, 1998). 그러나 본 실험에서는 agar가 재분화에 큰 영향을 나타내지는 않았다.

암처리 일수에 따른 재분화 효과

배양초기 암처리를 0, 5, 10, 15일로 구분하여 재분화에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 암처리는 무처리구에 비하여 재분화에 효과적이었고 10일 암처리에서 재분화율을 75%로 높일 수 있었으나 투명화현상이 16% 나타났다. 절편체당 부정이수도 암처리 10일에서 5.4개로 가장 많았다. 암처리 15일에서는 재분화율이 54%로 무처리보다 효과적이었으나 투명화현상이 31%가 발생하여 초기 암처리 기간은 10일이 가장 효과적인 것으로 판단되었다.

Dufour(1990)는 사과나무 잎에서 형성된 callus로부터 암흑에서 14일간 배양하여 재분화를 촉진시켰으며 Park 등(1995)은 감자의 잎과 줄기절편에서 초기 2주의 암처리로 부정이

형성이 촉진된다고 보고하였다. 이들 결과와 같이 본 실험에서도 암처리 10일에서 재분화율에 효과를 나타내었는데 이것은 암배양을 통해 페

놀의 생합성과 산화와 관련된 효소의 활성을 감소시켜 세포가 폐물질의 악영향을 적게 받게 때문인 것으로 생각되며(Cresswell과 Nitsh,

Table 2. Effects of NAA and IAA concentrations on regeneration efficiency for leaf segments of *Gypsophila paniculata* 'Bristol Fairy'.

Plant growth regulator (mg · L ⁻¹)	No. of explants	Regeneration ratio (%) ^z	No. of regenerated shoots/explant ^y
TDZ 3.0	24	21 c ^x	1.7 c
TDZ 3.0 + NAA 0.1	24	29 bc	2.6 bc
TDZ 3.0 + NAA 0.3	24	37 abc	3.4 b
TDZ 3.0 + IAA 0.1	24	50 ab	3.9 b
TDZ 3.0 + IAA 0.3	24	56 a	5.5 a

^zNumber of explants producing adventitious shoots/Total number of explants for each treatment.

^yTotal number of adventitious shoots/Number of explants producing adventitious shoots.

^xMean separation within columns by DMRT at 5% level.

Explants were cultured on MS medium supplemented with 30 g · L⁻¹. sucrose and 1.0% agar.

Table 3. Effects of agar concentrations on regeneration efficiency for leaf segments of *Gypsophila paniculata* 'Bristol Fairy'.

Agar concentration (%)	No. of explants	Regeneration ratio (%) ^z	No. of regenerated shoots/explant ^y
0.8	24	0 b ^x	0 b
1.0	24	42 a	1.8 a
1.2	24	46 a	1.5 a
1.6	24	34 a	1.4 a

^zNumber of explants producing adventitious shoots/Total number of explants for each treatment.

^yTotal number of adventitious shoots/Number of explants producing adventitious shoots.

^xMean separation within columns by DMRT at 5% level.

Explants were cultured on MS medium supplemented with 30 g · L⁻¹. sucrose and 1.0% agar.

Table 4. Effects of initial dark treatments at initial stage of culture on regeneration efficiency for leaf segments of *Gypsophila paniculata* 'Bristol Fairy'.

Dark treatment (days)	No. of explants	Regeneration ratio (%) ^z	No. of regenerated shoots /explant ^y	Vitrification ratio (%) ^x
0	24	29 c ^w	2.7 b	0 c
5	24	37 bc	2.6 b	0 c
10	24	75 a	5.4 a	16 b
15	24	54 ab	3.2 b	31 a

^zNumber of explants producing adventitious shoots/Total number of explants for each treatment.

^yTotal number of adventitious shoots/Number of explants producing adventitious shoots.

^xNumber of vitrified shoots/Total number of adventitious shoots.

^wMean separation within columns by DMRT at 5% level.

Explants were cultured on MS medium supplemented with 30 g · L⁻¹. sucrose and 1.0% agar.

Table 5. Effects of subculture times on regeneration efficiency for leaf segments of *Gypsophila paniculata* 'Bristol Fairy'.

Subculture times ^z	No. of shoots	Shoot length (mm)	Regeneration ratio (%) ^y	Vitrification ratio (%) ^x
3	6.8 a ^w	6.3 a	87 a	34 c
4	5.2 ab	6.6 a	79 ab	57 a
5	3.0 b	4.1 b	67 b	44 b

^zCulture times after meristem culture.

^yNumber of explants producing adventitious shoots/Total number of explants for each treatment.

^xNumber of vitrified shoots/Total number of adventitious shoots.

^wMean separation within columns by DMRT at 5% level.

Explants were cultured on MS medium supplemented with 30 g · L⁻¹. sucrose and 1.0% agar.

1975), 또한 IAA가 빛과 열에 불안정하므로 암 배양을 통해 그 활성 감소가 느리게 진행되어 영향을 받지 않은 것으로 생각된다.

생장점 배양묘의 계대배양 횟수에 따른 분화력 검정

배양시 재분화에 영향을 미치는 여러가지 요인 중 배양재료의 성장단계별 효과를 구명하기 위하여 생장점 배양후 계대배양 횟수를 3, 4, 5 회로 달리하여 각각 절편체를 채취하여 실시한 결과는 Table 5와 같다. 재분화율은 3회 계대배양한 모주로부터 채취한 절편의 재분화율이 87%로 가장 높았고 절편체당 부정아수도 6.8 개로 가장 많은 것으로 나타났으며 계대배양 횟수가 많아질수록 재분화율은 낮아졌다.

Economou와 Read(1986)에 의하면 아잘레아의 신초증식이 3~4회의 계대배양까지 증가하다가 이후는 감소하였고 발근율은 계대배양 횟수가 증가함에 따라 향상된다고 보고하였고, Norton과 Norton(1986)은 장미에서는 9대까지 계대배양 동안 처음 몇 대를 제외하고는 부정아의 증식이 계속 감소하였다고 하였다. 본 실험의 결과도 이들의 보고와 비슷한 경향을 보여 생장점 배양 후 3회 모주로부터 채취한 절편체에서 재분화율이 가장 높았으며 계대배양을 할수록 분화력이 감소하는 것을 알 수 있었다.

초 록

안개초 잎조직의 재분화는 TDZ가 BA와

kinetin에 비하여 월등히 효과적이었고 TDZ 3.0mg · L⁻¹에서 가장 높은 재분화율을 보였다. 한편 BA처리에서는 투명묘 발생율이 높았고 kinetin은 재분화에 영향을 주지 못하였다. NAA와 IAA의 비교에서 IAA 0.3mg · L⁻¹를 첨가한 배지에서 재분화율과 잎당 부정아수가 많았다. Agar 농도에 따른 잎조직의 재분화는 1.0, 1.2 및 1.6%에서 야기되었다. 배양초기 10 일간의 암처리는 재분화율을 75%까지 증가시켰다. 생장점배양 후 3회 계대배양한 묘에서 채취한 잎 절편에서 재분화율이 84%로 가장 높았고 잎당 부정아수도 6.8개로 가장 많았다.

추가 주요어 : 부정아, 암배양, 계대배양, TDZ, 투명화

인용문헌

Cresswell, R.J. and C. Nitsch. 1975. Organ culture of *Eucalyptus grandis*. *Planta* 125:87-90.

Dufour, M. 1990. Improving yield of adventitious shoots in apple. *Acta Hort.* 280:51-61.

Economou, A.S. and P.E. Read. 1986. Microcutting production from sequential reculturing of hardy deciduous azalea shoot tips. *HortScience* 21(1):137-139.

Han, B.H., K.Y. Paek, and J.K. Choi. 1991. Micropropagation of *Gypsophila*

paniculata using shoot tip culture in vitro. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 32(3):394-400.

Malamug, J.J.F., H. Inden, S. Yazawa, and T. Asahira. 1992. Plantlet regeneration from taro (*Colocasia esculenta* Schott) callus. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 23: 935-940.

Norton, M.E. and C.R. Norton. 1986. Change in shoot proliferation with repeated in vitro subculture of shoots of woody species of Rosaceae. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 5:187-197.

Park, Y.D., D.H. Ronis, A.A. Boe, and Z.M. Cheng. 1995. Plant regeneration from leaf tissues of four North Dakota genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). *American Potato Journal* 72:329-338.

Zang, F.L., Y. Takahata, and J.B. Xu. 1998. Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.). *Plant Cell Rep.* 17(10):780-786 ; 21reg.

Zuker, A., A. Ahroni, H. Shejtman, and A. Vainstein. 1997. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of *Gypsophila paniculata* L. *Plant Cell Rep.* 16:775-778.