

경정배양에 의한 감나무 (*Diospyros kaki* Thunb.)의 기내번식

류정아* · 조두현¹ · 송인규¹ · 박태식² · 최경배
경북농업기술원, ¹상주감시험장, ²북부시험장

Micropropagation of *Diospyros kaki* Thunb. by Shoot Tip Culture

RYU, Jung A* · CHO, Doo Hyun¹ · SONG, In Kyu¹ · PARK, Tae Sik² · CHOI, Kyung Bae

Kyungbuk Agricultural Research and Extension Services, Taegu, 702-320, Korea

¹Sangju Persimmon Experiment Station, Sangju, 743-840, Korea

²Northern Experiment Station, Andong, 760-890, Korea

ABSTRACT To investigate the effect of media and growth regulators in micropropagation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.), dormant axillary buds taken from trees of persimmon cultivars such as Ichikikeijiro, Tonawase and Hiratenenashi were used. Shoot tips were successfully cultured in full or half of nitrogen strength of MS medium. The most effective cytokinins for shoot proliferation and elongation of persimmon cv. Ichikikeijiro were 5 mg/L and 2 mg/L zeatin, respectively. Shoots were successfully rooted in 1/2N-MS medium with 1 mg/L IBA.

Key words: Auxin, cytokinin, persimmon, shoot elongation, shoot proliferation

서 론

감나무 (*Diospyros kaki* Thunb.)는 우리 나라를 포함한 동아시아가 원산지로서 알려져 있으며 전국에 걸쳐 다양한 특성을 가진 200여 재래종이 분포하고 있다 (Park et al. 1998). 또한 상업적인 재배면적도 넓어 1996년 전국재배면적이 32,851ha로 사과에 이어 2번째로 많이 재배되고 있는 중요한 낙엽과수이다 (Ministry of Agriculture and Forestry 1997).

목본식물에 대한 조직배양은 대량증식 및 유전자원의 보존뿐만 아니라 기내돌연변이 유도, 유전자전환 등 육종적인 면에서의 활용가능성도 높다. 감나무의 조직배양 연구는 1980년대 후반부터 일본을 중심으로 경정배양 (Cooper and Cohen 1984; Sugiura et al. 1986; Fukui et al. 1989)을 통한 왜성대목의 대량생산에 대한 연구 (Fumuro et al. 1988), 캘러스 배양에 의한 식물체 재분화 (Yokoyama and Takeuchi 1981; Tao et al. 1988), 원형질체 배양 (Tao et al. 1991) 등

다양하게 이루어지고 있으나 아직 다른 과수에 비해 미흡할 뿐 만 아니라 우리 나라에서는 거의 보고가 되어있지 않은 실정이다. 따라서 감나무의 기내번식에 효과적인 조건을 제시하여 앞으로 유전자원의 기내보존이나 기내육종에 활용하고자 본 시험을 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 배양 조건

1996년 1월에 농촌진흥청 나주배연구소 포장에 식재되어 있는 감나무 (*Diospyros kaki* Thunb.)의 휴면지를 채취하여 2°C에 냉장 보관하였다가 3월에 25°C 배양실에서 수습시켜 발아한 경정을 재료로 사용하였다. 표면살균은 70% 에탄올에서 1분, 2.5% sodium hypochlorite 용액에서 15분간 실시하고 멸균수로 3회 수세한 후 생장점부분이 포함되도록 3 mm의 크기로 잘라 치상하였다. 시험에 사용된 배지는 sucrose 3%, agar 0.7%, pH 5.8 (B₅배지는 5.7)로 조정된 고체배지를 사용하였으며 100 ml 삼각플라스크에 25 ml씩 분주하여 사용하

*Corresponding author. Tel 053-320-0290

E-mail jahryu@hanmail.net

였다. 배양조건은 25°C, 16시간 광주기로 하였으며, 한달간격으로 계대배양하였다.

배지의 영향

기내배양에 적합한 기본배지를 구명하기 위해서 5 mg/L의 BAP를 첨가한 1/2N-MS (Murashige and Skoog 1962), BDS (Dunstan and Short 1977), B₅ (Gamborg et al. 1968) 배지에 일목계차랑 (Ichikikeijiro)과 도근조생 (Tonawase)을 배양한 후 10일 간격으로 배양 70일까지 생존율을 조사하였다. 또한 적정 질소원의 농도를 구명하고자 MS 배지내 질소원의 농도를 1/8배~1배로 변화시킨 배지에 일목계차랑, 도근조생, 평핵무 (Hiratenenasi) 3품종의 경정을 치상하고 배양 후 60일의 생존 및 신초 성장 정도를 조사하였다.

생장조절제의 영향

신초의 증식과 신장에 미치는 사이토키닌의 영향을 알아보기 위해 BAP, zeatin, 2iP를 각 2, 5, 10 mg/L씩 첨가한 1/2N-MS 배지에 일목계차랑의 경정을 40일간 배양한 후 생존율, 신초수, 최대 신초길이를 조사하였다.

신초의 발근

발근 시험에는 일목계차랑의 경정을 2 mg/L의 zeatin을 첨가한 1/2N-MS 배지에 치상하고 30일 간격으로 계대배양하여 증식된 신초 중 신초길이 2cm 이상인 것을 사용하였다. 발근에 적합한 auxin의 종류와 농도를 구명하기 위해 IBA, NAA, picloram을 각 1, 2, 5 mg/L씩 배지에 첨가하는 경우와 신초 기부를 250mg/L 및 500 mg/L 고농도의 IBA에 30초간 침지시킨 후 성장조절제를 첨가하지 않은 배지에 배양하는 경우로 나누어 생존 및 발근율을 조사하였으며 이때 발근 배지 내 활성탄 첨가의 효과를 검토하기 위해 각 처리 모두 0.1% 활성탄 첨가와 무첨가로 나누어 시험하고 배양 40일 후의 발근율을 조사하였다.

결과 및 고찰

질소원을 반감한 MS (1/2N-MS), BDS, B₅ 배지에 일목계차랑 (Ichikikeijiro), 도근조생 (Tonawase)을 배양한 결과, 배양 30일까지는 두 품종 모두 기본배지에 따른 차이가 거의 나타나지 않고 모든 처리구에서 80% 이상의 높은 생존율을 보였다 (Figure 1). 그러나 배양기간이 경과함에 따라 1/2N-MS 배지에서는 대부분의 경정이 생존하여 기부에 새로운 신초가 증식되면서 잎의 분화도 이루어져 활발히 성장하는 반면 BDS와 B₅ 배지에서는 배양 초기에 왕성하게 증식한 신

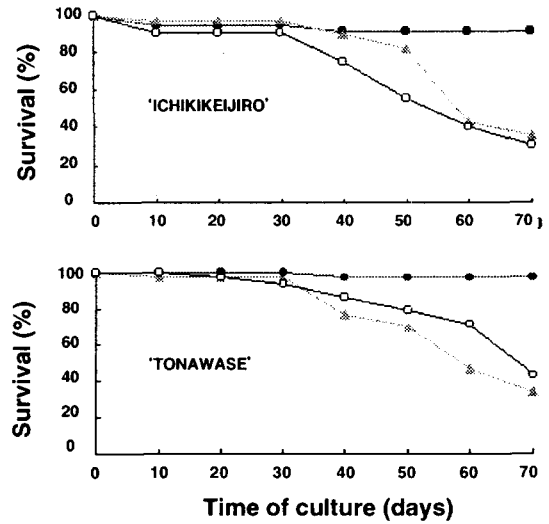


Figure 1. Effect of three media supplemented with 5 mg/L BAP on survival of shoot tip in persimmon cv. 'Ichikikeijiro' and 'Tonawase'. -○- 1/2N-MS ; -▲- BDS ; -□- B₅

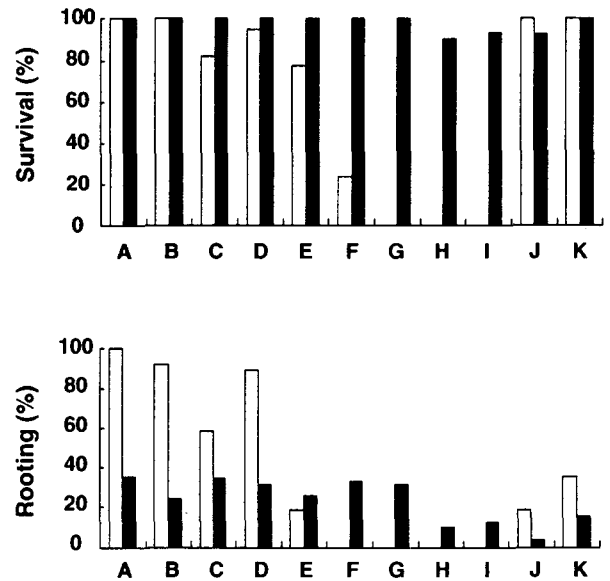


Figure 2. Effect of auxins on survival and rooting of persimmon cv. 'Ichikikeijiro' at rooting stage.

Shoots were cultured in 1/2N-MS medium supplemented with 1 mg/L IBA (A), 2 mg/L IBA (B), 5 mg/L IBA (C), 1 mg/L NAA (D), 2 mg/L NAA (E), 5 mg/L NAA (F), 1 mg/L picloram (G), 2 mg/L picloram (H) and 5 mg/L picloram (I), respectively and were cultured same medium of hormone free after being immersed in 250 mg/L (J) and 500 mg/L (K) IBA solution for 30 sec., □ charcoal-free ; ■ 0.1% charcoal

초들이 배양 30일 이후부터 급격히 고사하여 배양 70일에는 생존율이 40% 내외로 저조하였다 (Figure 2). 이는 MS 배지의 NO₃:NH₄⁺의 비율이 1.7:1 인데 비해 BDS와 B₅ 배지는 각각 4.2:1, 12.2:1로 NO₃에 대한 NH₄⁺의 비율이 너무 낮은 때문으로 생각되었다.

Fukui 등 (1989)은 단감인 서촌조생 (Nishimurawase)으로 시험한 결과 1/2N-MS배지에서는 신초의 성장이 활발한 반면 질소원을 포함하지 않는 LYR 배지 (Wolfe et al. 1983)에서는 절편체가 고사한다고 보고하였다. 따라서 MS 배지내 질소원의 함량변화가 신초의 증식 및 성장에 미치는 영향을 알아보고자 앞서 공시한 일목계차랑, 도근조생 외에 평핵무 (Hiratenenasi)를 공시하여 질소원의 농도를 1, 1/2, 1/4, 1/8로 MS배지에 배양하였다. 그 결과 배양 초기부터 3 품종 모두 질소 함량이 높은 배지 (MS, 1/2N-MS)에서 활발히 성장하고 질소 함량이 적을수록 증식되는 신초의 수나 길이도 작아지는 경향이었으며 (Table 1), 3 품종 중에는 도근조생이 신초의 성장 및 활력이 가장 왕성하였다. 따라서 품종에 따라 성장률의 차이는 있으나 질소원이 감나무의 기내배양에는 필수적인 것으로 생각되었다.

감나무의 신초의 증식 및 신장에 있어 cytokinin은 필수적인 것으로 Sugiura 등 (1986)은 평핵무 (Hiratenenasi)에서 5 mg/L의 BAP가 신초의 증식에는 효과적이었다고 보고하면서 이때 발생하는 신초는 rosette형이므로 이후 2iP 5 mg/L를 첨가한 배지로 옮겨 신초를 신장시킨 후 발근시키는 방법을 제안하였다. 1/2N-MS 배지에서 일목계차랑을 공시하여 시험한 결과 (Table 2), 신초 증식은 zeatin 5 mg/L 처리시 BAP 처리구보다 많은 6.2개의 신초가 형성되었고, zeatin 2 mg/L 처리시 0.9 cm의 신초신장을 보여, zeatin 처리가 BA나 2iP 처리보다 신초 증식 및 신장에 효과적인 것으로 생각되었다. 그밖에 2iP 10 mg/L 처리시는 신초수 5.3개, 신초 길이 0.6 cm로 신초의 증식 및 신장 모두 우수한 결과를 보였지만 생존율이 낮은 경향이였다.

신초의 분화는 BAP를 첨가한 경우는 치상한 경정이 다소 성장하면서 기부가 확대되고 확대된 기부에 수 개의 눈이 형성되며 형성된 눈은 길이 신장보다는 길이 먼저 분화되므로 rosette형으로 되는데 비해, zeatin을 첨가한 경우는 초기부터 길이 신장과 증식이 동시에 일어나는 양상이었다. 신초의 활력은 zeatin 2 mg/L 처리에서 가장 왕성하였으며 2iP 처리구는 신초 끝부분이 마르는 경우가 많았다.

Sugiura 등 (1986)은 평핵무에서 250 mg/L의 IBA에 30초간 침지 처리하는 경우 기내 신초의 발근율이 60%에 이르고 보고하였으며, Murayama 등 (1989)은 동일처리에 9일간의 암흑처리를 병행하여 5품종에 대한 발근율을 조사한 결과 평핵무가 가장 높은 발근율 (96%)을 보였으며 차랑 (Jiro)이 80%, 회어소 (Aizumishirazu) 및 화진신부지 (E-gosho)가 44%, 흑시 (kurogaki)가 8%로 품종에 따라 상당한 차이를 보인다고 하였다. 또 Breessan 등 (1982)은 활성탄이 적정농도로 첨가되면 줄기의 기부가 어두워져 암처리 효과가 있고 또 발근에 해로운 물질을 흡수하여 장미의 발근에 효과적이었다고 보고하였다. 따라서 발근에 미치는 auxin과 활성탄의 영향을 알아보기 위해 일목계차랑을 공시하여 발근 시험한 결과 (Figure 2), 0.1%의 활성탄 첨가는 auxin의 종류에 관계

없이 신초의 생존율을 향상시키는 결과를 보였다. 그러나 발근율에 있어서는 오히려 활성탄을 첨가하지 않은 경우보다 낮았으며 전처리구에서 20~40%내외로 생장조정제의 효과가 나타나지 않았다. 이제까지 감나무의 기내배양에 대한 보고에서는 발근배지에 활성탄을 첨가하지 않은 경우가 (Sugiura et al. 1986; Fumuro et al. 1988; Murayama et al. 1989) 대부분이므로 0.1% 이하의 저농도의 활성탄에서 발근 효과를 검토할 필요가 있을 것으로 생각되었다.

활성탄을 첨가하지 않은 배지에서 발근에 미치는 auxin의 영향을 보면, IBA, NAA 처리구가 picloram 처리구보다는 신초의 생존 및 발근에 양호하였고, 특히 저농도의 IBA, NAA 처리가 효과적이었다. 또 서촌조생 등 몇몇 품종에서 발근에 효과적이라고 밝혀진 고농도 IBA의 침지처리는 일목계차랑에서는 IBA 첨가보다 낮은 발근율을 보여 효과적이지 못했다.

Auxin별 근형성 정도를 보면 (Table 3), IBA는 2 mg/L에서 가장 많은 근이 형성되나 신초 줄기의 캘러스화가 동시에

Table 1. Effect of nitrogen strength of MS medium supplemented with 2 mg/L zeatin on proliferation and growth of shoot tip in persimmon cv. 'Ichikikeijiro', 'Tanawase' and 'Hiratenenasi'.

Cultivars	Nitrogen strength	No. of shoots	Shoot length (cm)
'Ichikikeijiro'	1N	2.3	0.6
	1/2N	2.4	0.4
	1/4N	2.2	0.2
	1/8N	1.9	0.3
'Tonawase'	1N	3.1	0.9
	1/2N	3.3	1.0
	1/4N	2.6	0.3
	1/8N	1.8	0.2
'Hiratenenasi'	1N	2.2	0.5
	1/2N	2.5	0.4
	1/4N	1.7	0.2
	1/8N	1.1	0.1

Table 2. Effect of cytokinin source on shooting and proliferation of shoot tip in persimmon cv. 'Ichikikeijiro' after 40 days in cultures.

Cytokinins (mg/L)	Survival (%)	Shooting (%)	No. of shoots	Shoot length (cm)	
2iP	2	100.0	87.5	2.4 de ¹	0.2 cd
	5	80.0	100.0	4.3 bc	0.5 bc
	10	87.5	85.7	5.3 ab	0.7 ab
zeatin	2	100.0	100.0	4.3 bc	0.9 a
	5	93.3	100.0	6.2 ab	0.3 bcd
	10	86.6	100.0	3.9 cd	0.2 cd
BAP	2	100.0	93.3	3.4 cd	0.3 cd
	5	93.3	100.0	4.1 bc	0.6 abc
	10	93.3	100.0	5.0 abc	0.5 bcd

¹Mean separation by Duncan's Multiple Range Test, P=0.05.

이루어져 효과적이지는 못했고, 저농도일수록 근의 신장이 촉진되고 지상부의 생육도 양호한 경향이었다. NAA 처리구에서는 1 mg/L에서 발근수가 13.4개로 전처리구 중 가장 많은 근이 형성되었으며, 2 mg/L 이상의 농도에서는 신초 줄기 뿐만 아니라 기부의 캘러스화가 두드러져 발근이 오히려 저해되는 양상이었다. Picloram 처리구에서는 배양 40일 경에는 모든 신초가 고사하거나 황화하여 발근하는 개체는 없었다. NAA 1 mg/L와 IBA 2 mg/L 처리시는 지상부에 비해 지나치게 많은 근 형성을 보였으며, IBA 1 mg/L 처리시 5.2개의 근형성과 2.6 cm의 발근장으로 건전한 식물체가 유도되었다 (Figure 3).

적 요

감나무 (*Diospyros kaki* Thunb.)의 기내번식에 효과적인 배지 및 생장조정제를 구명하고자 일목계차랑 (Ichiki-

Table 3. Effect of auxins on rooting of persimmon cv. 'Ichkikeijiro' after 40 days in culture.

Auxin (mg/L)	No. of roots	Root length (cm)	Callus formation (%)
IBA ^a	1	5.2	2.6
	2	9.2	2.2
	5	5.8	1.3
NAA	1	13.4	2.6
	2	5.0	1.2
	5	-	-
IBA ^b	250	2.5	4.2
	500	2.0	3.7

^a Auxins were supplemented with medium.

^b Basal part of shoots were immersed in IBA solution for 30 sec.

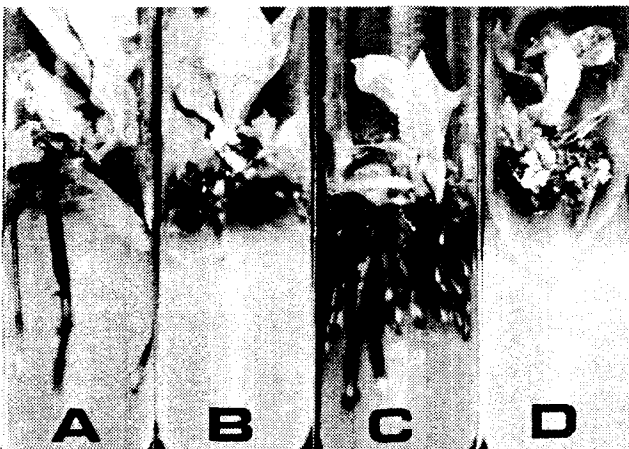


Figure 3. Rooting of proliferated shoot on 1/2N-MS medium with IBA or NAA. (A) IBA 1 mg/L; (B) IBA 2 mg/L; (C) NAA 1 mg/L; (D) NAA 2 mg/L.

keijiro), 도근조생 (Tonawase), 평핵무 (Hiratenenasi) 3품종을 공시재료로 하여 시험한 결과, 신초의 생존에 가장 효과적인 배지는 MS배지였으며 MS 배지내 질소원의 함량을 1/2~1배로 조정된 경우가 신초의 증식 및 신장에 효과적이었다. 1/2N-MS 배지에 2 mg/L zeatin 처리시 0.9 cm로 가장 많은 신초 신장을 보였고, 5 mg/L 처리시 증식된 신초수가 6.2개로 가장 많았다. 증식된 신초의 발근은 동일 배지에 1 mg/L IBA 처리시 가장 효과적이었다.

인용문헌

- Breessan PH, Kim YJ, Hydman SE, Hasegawa PM, Breessan RA (1982) Factors affecting *in vitro* propagation of rose. *J Am Soc Hort Sci* 107:979-990
- Copper PA, Cohen D (1984) Micropropagation of japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). *Comb Proc Intl Plant Prop Soc* 34:118-124
- Dunstan DI, Short KC (1977) Improved growth of tissue cultures of onion (*Allium cepa*). *Physiol Plant* 41:70-72
- Fukui H, Sugiyama M, Nakamura M (1989) Shoot tip culture of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). *J Jpn Soc Hort Sci* 58:43-47
- Fumuro M, Murayama H, Tao R, Murata R, Sugiura A (1988) Studies on rearing of dwarfing rootstocks for Japanese persimmon. *Res Rep Shiga Pref Agri Exp Sta* 29:20-32
- Gamborg OI, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50:151-158
- Ministry of Agriculture and Forestry (1997) Survey of fruit cultivation. pp 972-987
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-477
- Murayama H, Tao R, Tanaka T, Sugiura A (1989) *In vitro* proliferation and rooting of several Japanese persimmon cultivars. *J Jpn Soc Hort Sci* 58:55-61
- Park TS, Cho DH, Jeong YS, Song IK, Ryu JA, Son DS (1998) Collection and characteristic survey of persimmon: *In '97 Res Rep Kyungbuk RDA, Taegu*, pp 830-831
- Sugiura A, Tao R, Murayama H, Tomana T (1986) *In vitro* propagation of Japanese persimmon. *HortSci* 21:1205-1207
- Tao R, Murayama H, Moriguchi K, Sugiura A (1988) Plant regeneration from callus culture derived from primordial leaves of adult Japanese persimmon. *HortSci* 23:1055-1056
- Tao R, Tamura M, Yonemori K, Sugiura A (1991) Plant regeneration from callus protoplast of adult Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.). *Plant Sci* 79:119-125
- Wolfe DE, Eck P, Chin C (1983) Evaluation of seven media for

micropropagation of highbush blueberry. HortSci 18:703-705

Yokoyama T, Takeuchi M (1981) The induction and formation of organs in callus cultures from twig of mature Japanese persimmon (*Diospyros kaki Thunb .*). J Jpn Soc Hort Sci 49:557-562

(접수일자 1999년 12월 13일)