

강원지역 패랭이꽃속의 캘러스로부터 식물체 재분화와 돌연변이체 유발

장미영, 홍성원, 김준철*
강원대학교 생명과학부

Plant Regeneration and Mutagenesis from Organogenic Callus of *Dianthus* Distributed in Gangwon Province

Mi-Young Chang, Sung-Won Hong, Joon-Chul Kim*

Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT Useful *Dianthus* species were collected and selected from two native and seven foreign species distributed in Gangwon province. For *in vitro* breeding, callus was induced from the explants of apical meristem, leaf, stem and the *in vitro* adventitious shoots on MS basal medium with 2.0 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L BA at 27°C under continuous light. After 3 weeks of culture, calli initiated the most highly from the leaf explants of *D. chinensis*. Organogenic calli were able to be selected from the adventitious shoot-derived calli. For shoot regeneration, these organogenic calli were cultured on MS medium with the combination of 0.1 mg/L NAA + 1.0 mg/L BA under continuous light. Multiple shoots were proliferated with low frequency (about 30%) from those adventitious shoot-derived calli. Also, shoots initiated directly from the adventitious shoot explants without callus formation at high frequency of 52% when cultured on N6 medium containing 0.1 mg/L NAA and 1.0 mg/L BA in *D. gratianopol.* Multiple shoots and plantlets grew well and rooted on MS medium supplemented with 0.1 mg/L NAA. Regenerants with well-developed roots were transferred to 8-cm pots containing vermiculite at 85% relative humidity and 27°C. These plantlets were acclimatized in artificial soil mixture and transferred to the greenhouse for flowering with normal phenotypes. M28 Mutant line was selected with white flowers from 0.03M EMS-treated organogenic calli derived from *in vitro* adventitious shoot explants of *D. chinensis* and set seeds.

Key words: *Dianthus*, organogenic callus, multiple shoots, regenerants, mutant

서 론

우리나라는 화일식물구계, 온대아구계의 한국구에 속해 면적에 비해 자생식물의 종류수가 많고 특히 내륙과 해안성기 후 적응된 종류들이 많이 분포하고 있으며 자생식물 총 4,191종류 (Nakai, 1952)의 식물 중 14.1%에 해당하는 590종류가 특산종 (Paik 1999)인 것만 보아도 국내 자생식물이 고유성과 화훼 자원으로 활용 가치가 높다는 것을 알 수 있다. 그러나

관상 가치가 높고 화훼식물로 이용 가능성이 높은 종류들 (붉은 섬초롱꽃, 제비동자꽃, 꽃창포, 백색금낭화, 슬패랭이꽃 등)은 무분별한 남획으로 개체수가 급격히 감소하여 국내 자생식물 중 특산, 희귀 및 멸종위기에 있는 126종류를 특정 야생동·식물로 지정하여 법적으로 보호되기에 이르렀으며 국내 자생식물을 이용하여 개량된 많은 화초들이 외국으로부터 역수입되어 이에 대한 대책이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

패랭이꽃속 (*Dianthus*)은 꽃이 아름답고 관상 가치가 높아 훼손이 더욱 심각한 실정으로 한국에는 7종이 자생하고 있는 것으로 알려져 있다. 이 중 수염패랭이꽃, 난쟁이패랭이꽃, 장백패랭이꽃, 구름패랭이꽃의 4종은 북한지역에 자생하고 있고 패랭이꽃, 갯패랭이꽃, 슬패랭이꽃의 3종은 남한지역에 자생하

*Corresponding author Tel 033-250-8526 Fax 033-251-3990
E-mail jckim@kangwon.ac.kr

고 있는 것으로 보고되어 있다 (Lee 1996).

최근 국내 자생식물의 중요성이 강조되면서 이들에 대한 개발 및 유용형질 도입 등 기초자료 연구가 국가적인 차원에서 활발히 진행되고 있다 (Hachey et al. 1991; Choi and Kim 1993). 자연자원은 남획할 때 고갈될 수밖에 없어 이를 보존하며 자연훼손도 막는 자연보호 측면에서도 자생식물은 채취하던 식물에서 재배하는 식물로의 전환이 요구되고 있고 이들의 *in vitro* 증식에 대한 연구는 거의 전무한 상태이다. 화훼, 관상용으로 재배되고 있는 석죽과 *Dianthus*속에는 carnation, Indian carpet, Chinese pink, 히노마루 패랭이꽃, 갯패랭이꽃, 술패랭이꽃 등이 있으며 이들은 주로 종자번식, 영양번식 및 포기나누기 등의 방법을 통해 증식되고 있다. 단지 카네이션은 영양번식과 생장점 (Mii et al. 1990), 잎 (Jain et al. 2001), 꽃잎 (Kakehi 1979; Gimelli et al. 1984; Frey and Janick 1991; Lu et al. 1991, Fisher et al. 1993), 줄기 (Frey and Janick 1991), 약 (Villalobos 1981) 및 액아 (Miller et al. 1991)의 배양을 통한 shoot의 획득이 보고된 바 있다.

석죽과 *Dianthus*속은 다년생식물로 줄기가 약하고 꽃의 화기가 짧고 꽃 색깔이 단조로워 개발하는 데 문제점으로 지적되고 있으나 산과 들의 특수한 환경에서 자라는 종류들은 꽃색이 화려하여 이용가능성이 높아 이러한 종류들에 대해 조직배양을 통해 개발 가능성을 파악하는 것이 절실히 요구되고 있다.

본 연구에서는 강원도 자생 패랭이꽃속 (*Dianthus*)의 분포 특성을 조사하고 패랭이꽃속을 기내배양하여 식물 조직 부위별 절편체에서 유도된 캘러스로부터 식물체를 재분화를 시도하여 패랭이꽃속의 기내배양체의 특성을 밝히고 기관발생캘러스로부터 돌연변이체를 유발하여 형질개량에 응용하고자 하였다.

재료 및 방법

패랭이꽃속의 분포조사

강원도 일원 48개 지역에 분포하는 패랭이꽃속 (*Dianthus*)을 조사하였다. 조사지역은 용두산, 두위봉, 임원, 태화산, 치악산, 백덕산, 가리왕산, 고양산, 청옥산, 문래산, 봉복산, 태기산, 백석산, 발왕산, 팔봉산, 금병산, 공작산, 용봉산, 계방산, 오대산, 소금강, 석룡산, 북배산, 삼악산, 춘천, 대룡산, 오봉산, 명성산, 용화산, 사명산, 가리봉, 점봉산, 태백산, 두타산, 옥녀봉, 옥계, 방태산, 강릉, 정족산, 설악산, 학저수지, 송지호, 거진, 대암산, 속초, 건봉산, 응봉산, 가칠봉, 만덕봉, 백봉령, 화악산, 대성산, 석룡산, 치악산, 환바위산, 강선봉의 채집 및 강원대학교에 소장되어 있는 자료를 토대로 하였다.

식물의 *In vitro* 육성과 배양재료

식물재료로 강원지역 자생종인 *D. chinensis*와 *D. superbus*, 그리고 강원도 농업과학기술원등 강원지역에서 수집된 *D. japonicus*, *D. chinensis* var. *lacinitus*, *D. alpinus*, *D. plumarius*, *D. deltoides*, *D. myrtinervius* 및 *D. gratianopol* 'Rosafeder'를 기내에서 육성하였다. 패랭이꽃속 (*Dianthus*)의 종자는 1 L당 Triton-X100 2방울이 포함된 4% sodium hypochlorite 용액에서 30분간 소독한 후 멸균 증류수로 5회 세척하여 배양병의 MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지에 접종하였다.

기내에서 2개월 정도 생장한 식물로부터 0.5 cm 길이로 자른 정단분열조직, 0.5 cm² 크기로 만든 잎절편체, 0.5 cm 길이로 자른 줄기절편체를 배양재료로 사용했고 또한 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA가 포함된 MS배지에서 3주간 배양된 줄기정단부로부터 새로 분화된 adventitious shoot를 0.5 cm 크기로 자른 절편체를 배양재료로 사용하였다. 치상된 배양절편체의 수는 처리구당 10개씩 4반복으로 하였고 모든 절편체는 27°C 연속광의 조건에서 20 mL 배지가 담긴 8.5 cm의 petri dish에서 배양되었다. 배지에 사용된 MS 배지, sucrose와 phyto agar는 Duchefa에서 구입하여 사용하였으며 2,4-D, BA, NAA 등의 식물생장조절물질은 모두 Sigma chemical 회사로부터 구입하여 사용하였다. MS배지는 3% sucrose와 0.8% phyto agar가 첨가되었고, pH는 5.8로 조정되었다.

발아율과 염색체 검경

종자발아율은 상온에서 증류수에 젖어 있는 여과지에서 파종 14일 후에 조사되었고 염색체 검경을 위해 뿌리근단을 암조건에서 12~14시간 동안 0.05% 콜히친용액에 담근 후 방초산-알코올 (1:3)에 고정하고 염산에 가수분해하여 Schiff시약에 염색하여 염색체 수를 조사하였다 (Kim et al. 1992).

Organogenic 캘러스, shoot 원기 형성 및 식물체 재분화

배지는 0.1, 0.5 mg/L 2,4-D, 0.1, 0.5 mg/L NAA와 0.1, 0.5 mg/L BAP를 조합 또는 단독처리된 MS와 N6 (Chu et al. 1975)배지에서 조직부위별로 callus를 유도하였다. 식물생장조절물질의 조합에 따른 기관분화양상은 배양 8주 후에 각 callus 별로 조사·비교하여 재분화에 유리한 조건을 알아보았다. 배양은 27°C가 유지되는 배양실에서 연속 광조건 (21.5 μE · m⁻² · s⁻¹)에서 배양절편체와 식물생장조절물질에 따른 캘러스 유도율을 비교하였다. 배양 8주 후에 각 절편체에서 유도된 캘러스는 4주 단위로 계대배양을 하였다. 식물생장조절물질에 따라 조직부위별로 유도된 callus는, 해부현미경 하에서 organogenic 캘러스 (Nabors et al. 1983)를 외부 형태적인 관찰을 통해 선별하였다. 이들 organogenic 캘러스는 0.1, 0.5 mg/L NAA와 1.0~3.0 mg/L BA를 조합처리 하였으며 조직부

위별로 계대배양을 통해 증식시킨 callus를 각 배지당 10개씩 4반복으로 치상하여 연속 광조건에서 배양함으로써 shoot 원기 형성을 유도하였다. 연속광 ($21.5 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$)하에서 4주간 고체배지에서 배양된 직경 8~10 mm의 녹색 organogenic 캘러스는 0.1 mg/L 2,4-D, 2.0 mg/L kinetin 및 2.0 g/L casein hydrolysate가 포함된 N6 배지에서 치상하여 shoot 원기를 유도하였다.

Shoot 원기와 adventitious shoot의 절편체로부터 소식물체로 재생되는 것을 조사하였으며 소식물체의 뿌리는 2.0 mg/L NAA가 포함된 MS 배지에서 유도되었다. 이들 재분화식물체는 pot로 이식하여 완전한 식물체로 성장하였다.

EMS 처리에 의한 돌연변이체 유도

7~8주된 캘러스 중 녹색표면을 갖고 있는 캘러스를 millipore-filtered 된 0.03 M의 EMS 용액에 20°C에서 36시간 동안 처리한 후 증류수로 세척하였다. 이들 처리 캘러스는 2.0 mg/L 2,4-D가 첨가된 고체배지에서 배양 30일 후 배발생과정을 거쳐 0.1 mg/L 2,4-D, 2.0 mg/L kinetin 및 2.0 g/L casein hydrolysate가 포함된 N6 배지에서 분화를 유도하였다.

결과 및 고찰

강원도 지역의 패랭이꽃속 (*Dianthus*)의 분포

패랭이꽃속 (*Dianthus*)은 한국 전지역에 분포하고 현재 7종이 자생하고 있는 것으로 알려져 있다 (Lee and Yim 1978). 이 중 수염패랭이꽃, 난쟁이패랭이꽃, 장백패랭이꽃, 구름패랭이꽃의 4종은 북부 고산지역에 한정되어 분포하고 있고 패랭이꽃, 갯패랭이꽃, 술패랭이꽃의 3종은 중부 이남지역에 골고루 분포하는 특징을 갖고 있다. Table 1에서와 같이 강원도 지역에서 발견된 패랭이꽃속은 패랭이꽃 (*D. chinensis*)과 술패랭이꽃 (*D. superbus*), 2종이었으며 정확한 분포지 파악은 어려우나 넓은 분포역을 갖고 있고 강원도 전체에 분포하는 것

Table 1. *Dianthus* species in Korea.

Scientific name	Korean name	Distribution in Gangwon province
<i>Dianthus barbatus</i> var. <i>asiaticai</i>	수염패랭이꽃	None
<i>D. chinensis</i>	패랭이꽃	Chuncheon etc.
<i>D. chinensis</i> var. <i>morii</i>	난쟁이패랭이꽃	None
<i>D. japonicus</i> 'Thumb'	갯패랭이꽃	None
<i>D. repens</i> Willd	장백패랭이꽃	None
<i>D. superbus</i>	술패랭이꽃	Soekchoi etc
<i>D. superbus</i> var. <i>speciosus</i>	구름패랭이꽃	None

으로 조사되었다. 서울대, 성균관대 및 강원대의 표본실의 소장된 자료 검색에서 전라남도, 강원도, 경기도(서울 포함) 순으로 중부아구와 남부아구에 주로 분포하는 특징을 갖었다. 패랭이꽃의 집단 서식지가 강원도 춘천과 속초에서 발견되었으며 패랭이꽃은 줄기가 총생하고 전체에 분백색이 돌며 초장은 약 40 cm였고 잎은 대생하고 꽃은 6~8월에 홍자색으로 피고 꽃받침은 5개로 갈라졌다. 패랭이꽃의 분포지역은 주로 고도가 낮은 지역의 건조한 곳이나 냇가의 뚝 주위 풀밭 부근이었으며 용두산, 두위봉, 임원, 태화산, 치악산, 백덕산, 가리왕산, 고양산, 청옥산, 문래산, 봉복산, 태기산, 백석산, 발왕산, 팔봉산, 금병산, 공작산, 용봉산, 계방산, 오대산, 소금강, 석룡산, 북배산, 삼악산, 춘천, 대룡산, 오봉산, 명성산, 용화산, 사명산, 가리봉, 점봉산, 대암산, 속초 등에 분포하였다. 또한 강원도 속초에서 자생하는 술패랭이꽃도 전체에 분백색이 돌고 선형 또는 피침형의 대생 잎을 갖고 있었고 꽃은 5~7월에 홍자색으로 피었으며 패랭이꽃에 비해 꽃잎이 가늘고 꽃의 폭이 넓어 관상가치가 높았지만 개화기간이 다소 짧았다. 술패랭이꽃의 분포지역은 주로 야산 부근이었으며 태백산, 두위봉, 임원, 두타산, 태기산, 백석산, 옥녀봉, 옥계, 방태산, 강릉, 정족산, 점봉산, 설악산, 학저수지, 대암산, 속초, 송지호, 거진 등에 분포하였다.

패랭이꽃속 (*Dianthus*)의 종자발아, 염색체 및 기내 배양 특성

패랭이꽃속 (*Dianthus*)의 종자발아율은 비교적 높은 것으로 알려졌으며 Table 2에서와 같이 조사된 패랭이꽃속의 발아율은 대부분 70% 이상이었다. 강원도 자생 패랭이꽃과 술패랭이꽃은 각각 79%와 81%로 높은 발아율을 보였다. 조사된 패랭이꽃속의 염색체수에서도 2n=30을 보였으며 패랭이꽃속의 염색체수는 대부분 2n=30이고 2n=60 또는 90인 것도 있는 것으로 알려졌으나 조사된 패랭이꽃속에서는 2n=60 또는 90

Table 2. Germination rate, chromosome number and in vitro culture of *Dianthus* species.

Scientific name	Germination rate (%)	Chromosome number	Callus Induction*
<i>D. chinensis</i>	81	30	++++
<i>D. superbus</i>	84	30	+++
<i>D. japonicus</i>	77	30	++
<i>D. chinensis</i> var. <i>laciniatus</i>	79	30	+++
<i>D. alpinus</i>	70	30	+
<i>D. plumarius</i>	74	30	+++
<i>D. deltoides</i>	75	30	+++
<i>D. myrtinervius</i>	71	30	+
<i>D. gratianopol</i> 'Rosafeder'	72	30	+++

*For callus induction, MS medium with 1.0 mg/L 2,4-D was used. -, none; +, less than 10%; ++, 10~30%; +++, 30~50%; +++++, 50~70%; ++++++, more than 70%.

인 것은 관찰되지 않았다. *D. chinensis*, *D. superbus*, *D. japonicus*, *D. chinensis* var. *lacinitus*, *D. alpinus*, *D. plumarius*, *D. deltoides*, *D. myrtinervius* 및 *D. gratianopol* 'Rosafeder'의 9종을 모두 MS 기본배지에서 발아시켜 *in vitro* 상태로 전환시킨 결과 *D. japonicus*, *D. alpinus*와 *D. myrtinervius*는 다소 양호하지 않았으나 나머지 5종들은 모두 100% 뿌리가 생성되고 생육이 양호하였다 (Table 2).

강원도 지역의 패랭이꽃속 (*Dianthus*)의 캘러스 유도 및 기내 배양체의 특성

석죽과 *Dianthus*속은 다년생식물로 줄기가 약하고 꽃의 화기가 짧고 꽃 색깔이 단조로워 개발하는데 문제점으로 지적되고 있어 패랭이꽃속을 기내배양하여 형질개량에 응용하기 위한 전단계로서, 기내 (*in vitro*)에서 생육된 식물체 절편체로부터 캘러스를 유도하고 기내배양체의 특성을 밝히고자 하였다.

강원지역 자생종인 *D. chinensis*와 *D. superbus* 그리고 강원도 농업과학기술원등 강원지역에서 수집된 *D. japonicus*, *D. chinensis* var. *lacinitus*, *D. alpinus*, *D. plumarius*, *D. deltoides*, *D. myrtinervius* 및 *D. gratianopol* 'Rosafeder'의 식물로부터 기내 무근식물을 육성하고, 캘러스의 유도를 위해 조직부위별 다양한 절편체들을 2,4-D, NAA, BA가 농도별로 처리된 MS 배지에 치상한 후, 27°C 광조건에서 배양한 결과, 절편체들로부터 배양 3주 후 절단면에서 callus가 형성되기 시작하였으며, 식물생장조절물질의 종류와 농도에 따라 서로 다른 캘러스 형성률을 나타내었다 (Table 3). 캘러스 유도에 가장 좋은 부위는 대체로 모든 품종에 있어서 잎절편체로 나타났으며 callus의 성장도 잎절편체에서 가장 양호하였다 (Bansal and Pandey 1993). 패랭이꽃속에서 캘러스에 따라 백색, 옅은 녹색 혹은 노란색 계통으로 유도되었으며 (Figure 1 & 2), 형태 역시 다소 차이를 보였는데 연노랑색의 friable한 형태를 보이거나 단단한 양상을 보이기도 했다 (Nabors et al. 1983; Trolinder and Goodin 1988). 기내 배양을 통한 캘러스의 유도는 식물 종에 따라서 또는 식물체내에서도 배양에 사용되는 조직절편체의 종류에 따라서 그 능력에 상당한 차이가 있을 수 있으며 (Thorpe 1993), 배지에 첨가하는 식물생장조절물질의 조성이나 배양조건 등에 의해서도 캘러스의 유도 양상이 크게 다른 것으로 알려져 있다 (Binh and Heszky 1990; Data et al. 1990; Kallak et al. 1997). 캘러스의 유도를 위해 기내배양된 패랭이꽃속의 다양한 절편체들을 2,4-D, NAA, BA가 농도별로 처리된 MS 배지에 치상한 후, 27°C 광조건에서 배양한 결과, 절편체들로부터 배양 3주 후 절단면에서 캘러스가 형성되기 시작하였으며, 식물생장조절물질의 종류와 농도에 따라 서로 다른 캘러스 형성률을 나타내었다 (Table 3). 줄기 절편체에서 유도한 callus는 모든 품종에 있어서 캘러스 유도가 가장 낮았다. 줄기절편체에서는 상처부위에서 캘러스만 약간 발생되었고, 시간이 경과함에 따라 고사하거나, 유도된

캘러스는 암갈색을 띄었으며 생장이 좋지 않았다. Table 3에서와 같이 패랭이꽃속의 callus 유도를 위한 생장조절물질에 있어서는 NAA 처리구보다는 2,4-D 처리구가 좋았으며, 이와 같은 2,4-D는 술패랭이꽃의 원형질체배양에서도 효과적인 것

Table 3. Effect of plant growth regulators on organogenic callus induction from the various explants of *Dianthus* species.

Species	Plant growth regulators (mg/L)	Callus induction ^b			
		Apical meristem	Adventitious shoot	Leaf	Stem
<i>Dianthus chinensis</i>	BA 0.1 + 2,4-D 1.0	++	++	++	+
	+ 2,4-D 2.0	++	++	++	+
	+ NAA 1.0	+	+	+	-
	+ NAA 2.0	+	+	+	-
	BA 0.5 + 2,4-D 1.0	++	++	++	+
	+ 2,4-D 2.0	++	++	+++	+
	+ NAA 1.0	+	+	+	-
	+ NAA 2.0	-	+	+	-
	2,4-D 1.0	++	++	++	+
	2,4-D 2.0	++	++	+++	+
<i>Dianthus superbus</i>	BA 0.1 + 2,4-D 1.0	++	++	++	+
	+ 2,4-D 2.0	++	++	++	+
	+ NAA 1.0	+	+	+	-
	+ NAA 2.0	+	-	-	-
	BA 0.5 + 2,4-D 1.0	++	++	++	+
	+ 2,4-D 2.0	++	++	++	+
	+ NAA 1.0	+	+	+	-
	+ NAA 2.0	+	-	+	-
	2,4-D 1.0	++	++	++	+
	2,4-D 2.0	++	++	++	+
NAA 1.0	+	+	-	-	
NAA 2.0	+	-	-	-	

^aGrowth regulators were supplemented to MS basal medium.

^b-, none; +, less than 10%; ++, 10~30%; +++, 30~50%; +++++, 50~70%; ++++++, more than 70%.

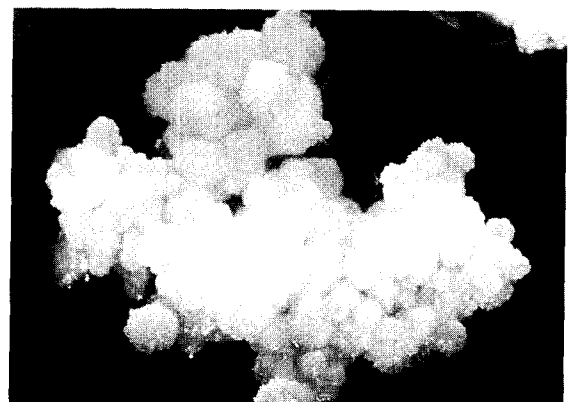


Figure 1. Callus induction from the stem explants of *D. plumarius*. Organogenic callus formed after 8 weeks of culture on MS medium containing 2.0 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L BAP under light condition.

으로 알려졌다 (Kim and Lee 1996). 켈러스 유도에 가장 좋았던 처리구는 2.0 mg/L 2,4-D 단독배지와 2.0 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L BA의 조합배지로 70% 이상의 유도율을 보였다. 반면 식물생장조절물질 중 auxin으로 2,4-D대신 NAA를 단독처리하거나 BA와 조합처리한 경우, 조직이 팽대해지는 것이 켈러스 유도의 초기 현상과 같았지만, 시간이 지남에 따라 켈러스는 발생하였으나 생장이 더디었고, 켈러스의 발생과 함께 다량의 부정근이 발달하여 시간이 지남에 따라 켈러스는 부정근에 의해 거의 덮히는 현상을 나타내 켈러스 유도에 부적합한 조건으로 판단되었다 (Figure 3).

Shoot 형성켈러스로부터 식물체 재분화

D. chinensis, *D. superbus*, *D. japonicus*, *D. chinensis* var. *laciniatus*, *D. alpinus*, *D. plumarius*, *D. deltoides*, *D. myrtinervius* 및 *D. gratianopol* 'Rosafeder'의 켈러스는 1.0 mg/L 2,4-D가 포함된 MS 배지에서 계대배양되었고 21.5 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 의 광조건에서 비교적 잘 증식하였다. 이들 중 *D. chinensis*, *D. superbus*, *D. gratianopol* 'Rosafeder', *D. plumarius*, *D.*

chinensis var. *laciniatus* 및 *D. deltoides*의 켈러스 증식이 비교적 양호하였다. 이들 유도된 켈러스는 MS 배지를 기본으로 식물 성장조절제의 종류와 농도를 달리한 배지를 이용하여 shoot 형성을 시도하였다. 식물체 재분화에 미치는 성장조절물질의 영향도 식물의 품종이나 배양부위에 따라 다른 양상을 보이는데, 9종 (1품종 포함)의 패랭이꽃속에서도 잎과 줄기로부터 유도된 켈러스에서는 shoot가 거의 일어나지 않았으나, 정단분열조직과 *in vitro*에서 증식된 adventitious shoot에서 유도된 켈러스에서는 shoot의 형성을 관찰할 수 있었다. 또한 BA 단독 첨가배지에서도 극히 낮은 shoot 형성률을 보인 반면, NAA과 BA 혼합배지에서는 높은 shoot 형성률을 보였다 (Figure 3). 이러한 경향은 국화, 딸기, 배추에서도 볼 수 있는데, NAA와 BA 혼합 배지에서 shoot 형성이 가장 양호하며, 국화와 딸기의 잎 절편체 배양에서는 BA 첨가 없이 NAA만을 첨가하였을 경우 shoot 분화가 이루어지지 않는 것으로 보고되어 있다 (Kaul et al. 1990; Hachey et al. 1991; Yoon and Kim 1993; Choi et al. 1998). 반면 고농도의 BA 첨가는 shoot 분화율을 저하시키는데, 딸기, 반하의 잎 절편체 배양에서도 4.0 mg/L 이상의 BA 첨가배지에서는 shoot 분화율이 저하되어 본 실험결과와 유사하였다 (Kim et al. 1994; Choi et al. 1998). 켈러스로부터 shoot 형성에 가장 좋은 조건은 *in vitro*에서 증식된 adventitious shoot으로부터 유도된 켈러스를 1.0 mg/L BA와 0.1 mg/L NAA가 조합된 배지에 치상하였을 때 약 30% 정도의 shoot 형성률을 보였고 (Figure 3A & 3B) 또한 multiple shoot의 분화를 관찰할 수 있었다 (Figure 3C). 그러나 잎 절편체로부터 유도된 켈러스를 광조건에서 배양한 결과, 배양 3주 후부터 callus의 녹화 (greening)가 진행되기 시작하였으나, callus의 증식과 부정근의 형성이 관찰되었고, shoot는 배양 5~6개월 뒤에 드물게 관찰될 뿐 거의 나타나지 않았다. 줄기조직에서 유도한 callus의 분화 양상도 잎의 경우와 동일한 결과를 나타내었으며, Figure 2에서와 같이 켈

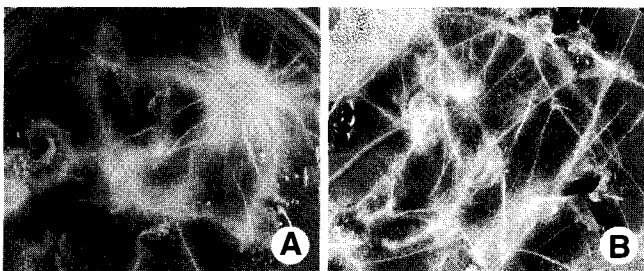


Figure 2. Adventitious root formation from the leaf explants. Explants were cultured on MS medium containing 2.0 mg/L NAA and 0.1 mg/L BAP. A, *D. chinensis*; B, *D. superbus*.

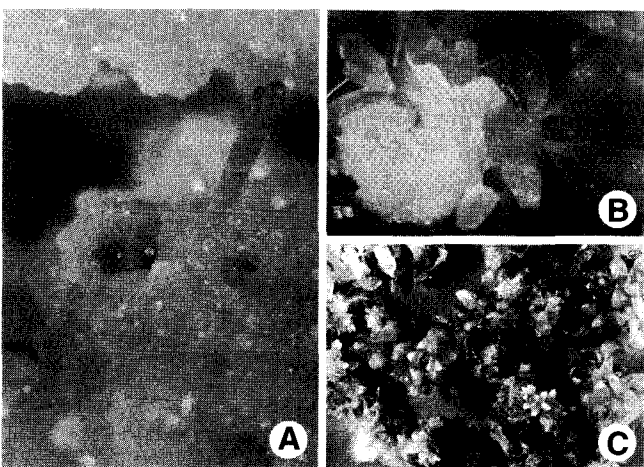


Figure 3. Regeneration of shoots from organogenic callus in *D. gratianopol* 'Rosafeder'. A, Shoot formation from organogenic calli; B, Shoot development under continuous illumination; C, Development of multiple shoot in MS basal medium supplemented with 1.0 mg/L BAP and 0.5 mg/L NAA.

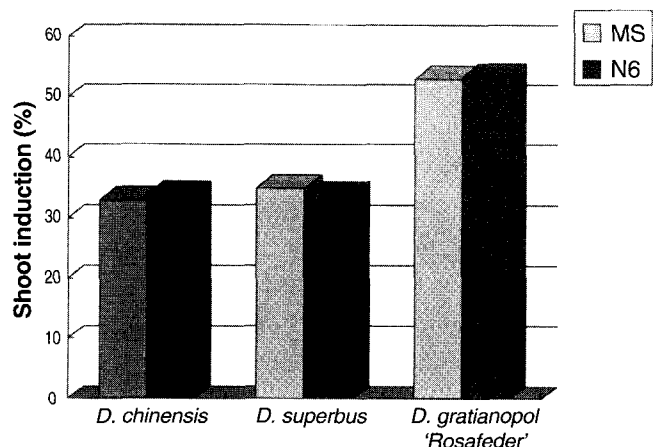


Figure 4. Comparison of direct shoot induction frequencies from the adventitious shoots of *Dianthus* species between MS and N6 media containing 1.0 mg/L BAP + 0.1 NAA.

러스의 증식과 함께 부정근의 분화만 관찰될 뿐, 어느 처리구에서도 shoot가 형성되지 않았다.

재분화과정에서 뿌리가 유도되는 효율을 조사하기 위해서 유도된 shoot를 MS 기본배지에 NAA 농도 (0.1~2.0 mg/L)를 달리한 배지와 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 배지에 배양하여 기내 발근을 유도하였다. 이때 배양은 연속광 조건에서 수행하였다. 뿌리가 유도되어 완전한 식물체로 재분화된 개체를 배양병에서 꺼낸 후, 증류수에 부드럽게 행구어 뿌리에 묻은 배지성분을 제거한 후, vermiculite와 perlite가 1 : 1 (v/v)로 혼합된 토양에 이식하여 순화시켰다. 처음 3~4일은 비닐을 씌워서 수분을 유지하도록 하고 그후에 조금씩 노출시켰으며, 약 3~4주 후에 성장한 재분화 개체는 순화과정을 거친 후 활착시켰다 (Figure 5).

Adventitious shoot로부터 직접 식물체 재분화

정단분열조직에서 유래된 adventitious shoot의 절편체를 1.0 mg/L BA와 0.1 mg/L NAA가 포함된 배지에 치상했을 때, callus의 단계를 거치지 않고 direct shoot이 형성되는 것을 관찰하였으며 MS와 N6 배지에 따른 shoot 형성률을 비교하였다. Figure 4와 같이 두 배지에서 33~52% 범위의 비교적 높은 shoot 형성률을 보였고, 또한 형성된 shoot의 형태와 상태도 큰 차이점이 없어 MS와 N6배지를 비교해 볼 때 배지에 따른 큰 차이를 나타내지 않는다고 판단되었다. Shoot는 주로 절편체의 절단면으로부터 분화되어 나왔는데, 이는 상처가 주변부위의 세포에 물리, 화학적인 변화를 일으켜 shoot 형성이 활발하게 일어나도록 유도한 것으로 보인다. 일반적으로 상처를 받은 부위는 내재 auxin이나 ethylene의 농도가 증가한다는 보고가 있으며 (Reid 1987; Moncousin et al. 1989), 이러한 변화가 외부에서 첨가한 식물호르몬과의 상호작용을 통해 shoot 발생이 이루어지는 것으로 추정된다. 배양 2주 후부터 절편의 절단면으로부터 형성된 primordial shoot는 배양이 진전됨에 따라 지속적으로 성장하여 배양 4주 후에는 multiple한 shoot를 관찰할 수 있었고, 형성된 shoot는 동일배지에 계대 배양하여 광조건에서 배양함으로써 완전한 잎과 줄기의 형태를 갖춘 소식물체로 분화시킬 수 있었다 (Figure 5). 재분화 소식물체는 0.1 mg/L NAA가 포함된 MS 배지에서 뿌리를 유도하고 vermiculite와 perlite가 1 : 1로 조합된 pot에 이식 후 토양에 활착시킴에 따라 완전한 재분화 개체를 획득할 수 있었다 (Figure 5C, 6A & 6B). 꽤

랭이꽃은 온실 주위 야지에서 집단 서식이 가능하였고 꽃은 홍자색이고 꽃받침은 5개로 갈라졌다 (Figure 6C & 6D).

EMS 처리에 의한 돌연변이체 유도과 식물체 재분화

In vitro에서 증식된 adventitious shoot으로부터 유도된 callus중 녹색표면을 갖고 있는 7~8주된 *D. chinensis* 캘러스



Figure 5. Multiple shoots and regenerants from the organogenic calli derived from *D. gratianopol* 'Rosafeder'. A, Multiple shoots with roots; B, Regenerants potted in soil; C, Flowering plant.

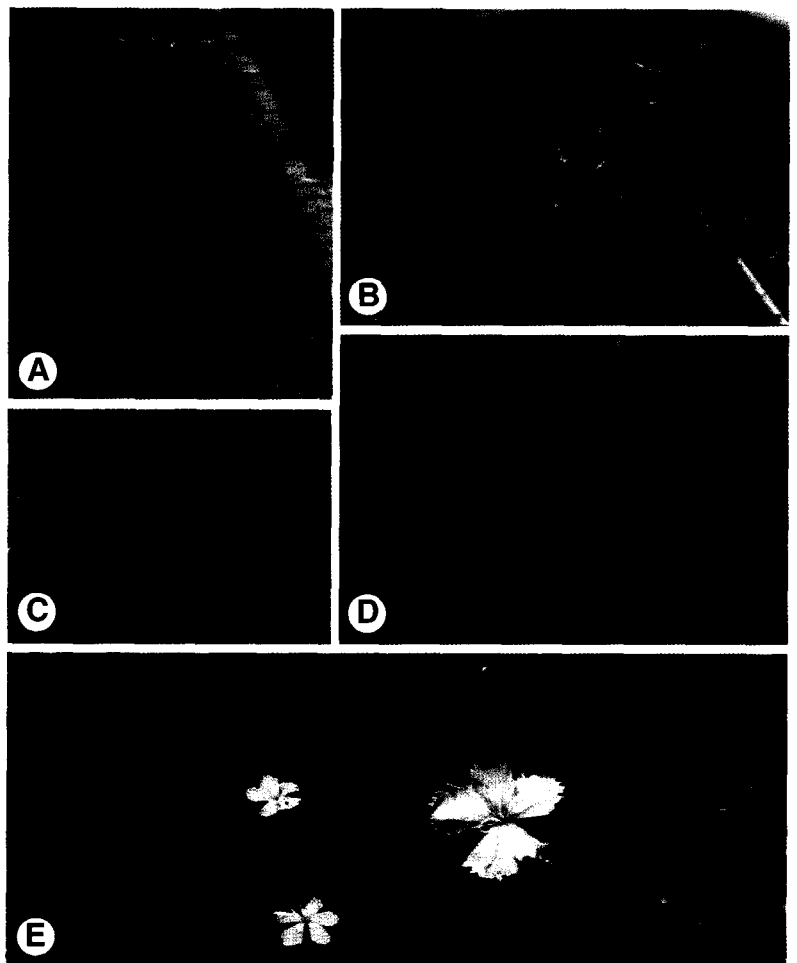


Figure 6. The *Dianthus* plants were acclimatized in the greenhouse for flowering. The regenerated plants showed normal phenotypes. A, *D. superbus*; B, *D. japonicus*; C and D, Native *D. chinensis* at Chuncheon; E, M28 Mutant line of *D. chinensis* with white flowers and seeds.

를 0.03 M의 EMS 용액에 20°C에서 36시간 이상 처리했을 때 대부분 갈변하여 배발생과정으로 진행되지 못했으나 24~30 시간 범위 내의 대부분 캘러스에서는 2.0 mg/L 2,4-D가 첨가된 고체배지에서 organogenic 형태의 캘러스를 관찰할 수 있었다. 이들 organogenic 캘러스는 0.1 mg/L 2,4-D, 2.0 mg/L kinetin 및 2.0 g/L casein hydrolysate가 포함된 N6 배지에서 분화되어 흰꽃의 패랭이꽃식물체가 유발되었으며 이 식물체는 종자를 형성하였다 (Figure 6E).

사사 - 본 연구는 21세기 프론티어 연구개발사업인 자생식물 이용기술개발사업단의 연구비 지원 (PF 001201-02)에 의해 수행되었습니다.

적 요

패랭이꽃속의 분포와 개발을 위한 기초자료로 강원도에서 자생 2종과 수집가능한 7 외래종에 대한 기내배양체의 특성을 조사하였다. 캘러스의 유도를 위해 조직부위별 다양한 절편체들을 2,4-D, NAA, BA가 농도별로 처리된 MS 배지에 치상한 후, 27°C 광조건과 2.0 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L BA의 조합배지에서 배양했을 때 3주 후 절단면에서 callus가 형성되기 시작하였으며, 패랭이꽃 (*Dianthus chinensis*)의 잎절편체에서 가장 양호하였다. Organogenic 캘러스의 선발은 기내에서 증식된 adventitious shoot의 절편체 유래 캘러스로부터 가능했으며 이들 캘러스를 1.0 mg/L BA와 0.1 mg/L NAA가 조합된 배지에 치상하였을 때 약 30% 정도의 shoot 형성률을 보였고 multiple shoot의 분화를 관찰할 수 있었다. *In vitro*에서 증식된 adventitious shoot 절편체를 1.0 mg/L BA와 0.1 mg/L NAA가 포함된 N6배지에 치상했을 때, 캘러스 단계를 거치지 않고 직접 shoot이 형성되었고 *D. gratianopol* 유래 adventitious shoot 절편체는 52%의 높은 shoot 형성률을 보였다. 이들 multiple shoot로부터 재분화된 소식물체는 0.1 mg/L NAA가 포함된 MS 배지에서 뿌리가 유도되고 vermiculite가 담긴 pot에 이식 후 85% 습도하에서 활착되어 정상적인 개화된 개체를 획득할 수 있었다. 0.03 M EMS 처리된 패랭이꽃의 adventitious shoot 절편체 유래 캘러스로부터 흰꽃의 패랭이꽃의 도연변체식물 (M23)이 분화되었으며 종자 형성이 가능하였다.

인용문헌

Bansal YK, Pandey P (1993) Micropropagation of *Sesbania aculeata* by adventitious organogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 32: 351-355
 Binh OQ, Heszky LE (1990) Restoration of the regeneration potential

of long term cell culture in rice (*Oryza sativa*) by salt pretreatment. *Plant Physiol* 136: 336-340
 Choi SJ, Kim JC (1993) Transmission of insecticidal endotoxin gene in self-pollinated progeny of transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Korean J Plant Tiss Cult* 20: 321-327
 Choi YJ, Kim HJ, Hyung NI (1998) Plant regeneration via organogenesis from leaf and stipule segments of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). *Korean J Plant Tiss Cult* 25: 347-351
 Chu C, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin C, Chu CY, Bi FY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice thought comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sin* 18: 659-668
 Data SK, Data K, Potrykus I (1990) Embryogenesis and regeneration from microspores of both indica and japonica rice (*Oryza sativa*). *Plant Sci* 67: 83-88
 Fisher M, Ziv M, Vainstein A (1993) An efficient method for adventitious shoot regeneration from cultured carnation petals. *Sci Hort* 53: 231-237
 Frey L, Janick J (1991) Organogenesis in carnation. *J Amer Soc Hort Sci* 116: 1108-1112
 Gimelli F, Ginatta G, Ventura R, Positano S, Buiatti M (1984) Plantlet regeneration from petals and floral induction *in vitro* in the Mediterranean carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Riv. Ortoflorofrutt* 68: 107-120
 Hachey JH, Shama KK, Moloney MM (1991) Efficient shoot regeneration of *Brassica campestris* using cotyledon explants cultured *in vitro*. *Plant Cell Rep* 9: 549-554
 Jain A, Kantia A, Kothari SL (2001) De novo differentiation of shoot buds from leaf-callus of *Dianthus caryophyllus* L. and control of hyperhydricity. *Sci Hort* 87: 39-326
 Kallak H, Reidla M, Hilpus I, Virumäe K (1997) Effects of genotype, explant source and growth regulators on organogenesis in carnation callus. *Plant Cell Tiss Org Cult* 51: 127-135
 Kakehi M (1979) Studies on the tissue culture of canation. V. induction of redifferentiated plants from the petal tissue. *Bull Hiroshima Agric Coll* 6: 159-166
 Kaul V, Miller RM, Hutchinson JF, Richards D (1990) Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelez (syn. *Crysanthemum molifolium* Ramat.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 21: 21-30
 Kim JC, Choi SJ, Kim MD, Cho DH, Hwang B, Ahn BJ (1992) Gametosomatic hybridization through the fusion of *Nicotiana tabacum* mesophyllprotoplasts(2n) and *Petunia hybrida* tetrad protoplasts(n). *Korean J Plant Tiss Cul* 19: 241-247
 Kim JC, Lee EA (1996) Plant Regeneration from mesophyll protoplasts of *Dianthus superbus*. *Plant Cell Rep* 16: 18-21
 Kim TS, Park MS, Park HK, Kim S, Jang YS (1994) Plant regeneration and *in vitro* tuber enlargement from callus in *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. *Kor J Med Crop Sc* 2: 146-250
 Lee WT (1996) *Lineamenta Florae Koreae*. Academy press. pp 252-

255

- Lee WT, Yim YJ (1978) Studies on the distribution of vascular plants in the Korean peninsula. *Kor J Plant Tax* 8: 1-33
- Lu C, Nugent G, Chandler S, Young R, Dalling M (1991) *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Biotechnology* 9: 864-868
- Mii M, Buiatti M, Gimelli F (1990) Carnation. In Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR and Bajaj YPS eds, *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 5. Macmillan, New York. pp 248-318
- Miller RM, Kaul V, Hutchinson JF, Richards D (1991) Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) from axillary bud explants. *Ann Bot* 67: 35-42
- Moncousin C, Favre JM, Gasper T (1989) Early changes in auxin and ethylene production in vine cuttings before adventitious rooting. *Plant Cell Tiss Org Cult* 19: 235-242
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nabors MW, Heyser TA, Demott KJ (1983) Long duration high frequency of plant generation from cereal tissue culture. *Planta* 157: 385-389
- Nakai T (1952) A synoptical sketch of Korean flora. *Bull Nat Sci Mus Tokyo* 31: 1-152
- Paik WK (1999) The status of endemic plants in Korea and our tasks in the 21st century. *Kor J Plant Tax* 29: 263-274
- Radojevic L, Nevena D, Petrovic J (1990) *In vitro* culture techniques for carnation breeding. *Acta Hort* 280: 163-167
- Reid MS (1987) Ethylene in plant growth, development and senescence. In Davies PJ, ed, *Plant hormones and their role in plant growth and development*, Martinus Nijhoff. Dordrecht, pp 257-279
- Thorpe TA (1993) *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis: Physiological and biochemical aspects. In Roubelakis-Angelakis, K. A., and Tran Thanh Van, K. eds, *Morphogenesis in Plants*. Plenum Press. New York. pp 19-38
- Trolinder N, Goodin JR (1998) Somatic embryogenesis in cotton. 1. Effect of source of explant and hormone regime. *Plant Cell Tiss Org Cult* 12: 31-42
- Villalobos V (1981) Floral differentiation in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) from anthers cultivated *in vitro*. *Phyton Argentina* 41: 71-75
- Yoon KE, Kim HY (1993) Root and shoot regeneration from leaf disks of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis*, *B. rapa* and *Paphanus sativus*. *Korean J Plant Tiss Cult* 20: 167-170

(접수일자 2003년 2월 11일, 수리일자 2003년 3월 13일)