

거베라 기내 엽병조직으로부터 Callus 유도 및 식물체 재분화

정용모 · 나애실 · 고은경¹ · 송혜정 · 김정부 · 권오창^{1*}

경남농업기술원 화훼육종연구소, ¹동아대학교 생명자원과학대학

Received August 5, 2004 / Accepted September 30, 2004

Callus induction and plant regeneration from *in vitro* cultured petiole of 3 *Gerbera* cultivars. Yong-Mo Chung, Ae-Sil La, Eun-Kyung Ko¹, Hae-Jung Song, Jeong-Bu Kim and Oh-Chang Kwon^{1*}. *Flower Breeding Research Institute, Gyeongnam ARES, Changwon, 641-920, Korea, 1Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A Univ., Busan, 604-714, Korea* - The experiment was conducted to investigate optimal condition for callus induction and plant regeneration for transformation system of gerbera. Callus induction was more effective in 'white day' than other two cultivar 'Songsongee' and 'Love Song'. The optimized plant growth regulators concentration on callus induction, was MS basal medium with NAA 0.1 mg/L+TDZ 0.5 mg/L. The optimized plant growth regulators concentration on plant regeneration, which was used MS basal medium was IAA 1.0 mg/L+BA 1.0 mg/L+Zeatin 0.1 mg/L. The optimized petiole age for more effective plant regeneration was 32 days petiole after *in vitro* subculture and MS basal medium strength was 1/2 MS strength.

Key words - *Gerbera*, callus induction, plant regeneration, *in vitro* cultured petiole

거베라(*Gerbera hybrida* Hort.)는 국화과에 속하는 속근초화로서 약 40종의 품종이 있으며, 원산지는 온대 및 열대 아시아와 아프리카이다. 1878년 남아프리카의 트랜스발(Transval)지방에서 처음 발견되었으며, *G. jamesonii* Bolus가 오늘날의 재배품종의 기원이 되었다[5]. 그 후 1886년에 영국에 소개되었고 프랑스에서는 절화나 정원용으로 이용되었으며 1930년대에는 북아프리카에서 절화로 사용되었다[7]. 우리나라에서는 이벤트나 축하화환용 꽃꽂이에 주로 대륜계통이 이용되고 있으며, 최근 소륜계통의 다수성 품종의 재배가 증가하고 있는 실정이다. 선호하는 화색으로는 적색, 핑크색, 오렌지색, 백색 등이 있으며, 매년 외국 육종회사에서 300종 이상의 다양한 화색의 신품종 육성으로 인해 그 이용도가 증가하는 추세에 있다[1]. 또한 적정 생육 온도만 주어지면 시설 내에서 연중 절화 재배가 가능하고, 한번 정식 한 후 3-4년은 계속 재배할 수 있으며, 더욱이 생력적 생산이 가능한 영양·생식생장형(VR주기형: Vegetative Reproductive Growth Periodicity)식물로 시설재배의 중요한 절화로 이용되어 있다. 현재 거베라 재배농가에서는 품종 모두를 네덜란드의 육종회사에서 육성된 품종들을 수입하여 재배하고 있으며, 2004년으로 예정되고 있는 거베라의 품종보호대상작물지정으로 외국품종에 대한 로열티요구에 따른 재배농민들의 부담은 엄청날 것으로 생각된다.

따라서 우수한 신품종의 육성만이 국제경쟁력을 가질 수 있으며, 대 일본 수출은 일본현지의 소륜계통 위주로 재배되고 있는 일본의 틈새시장을 겨냥한다면 앞으로 수출의 기회는 더욱 많을 것으로 기대할 수 있고, 이에 따른 재배농민의

소득증대 또한 기대할 수 있다. 하지만 현재의 육종은 교배에 의한 전통육종에 전적으로 의존하고 있어 유전자원의 한계성을 극복하지 않고는 국제 경쟁력에서 뒤질 수밖에 없는 실정이다. 이러한 한계성을 극복하기 위해서 최근 RAPD기법에 의한 유전적 근연관계구명[2], 원형질융합에 의한 속간교잡종 창출[4,8], 조직배양을 통한 기내 돌연변이 유기[15], 체세포잡종을 이용한 새로운 유전자 창출[22], 유전자 조작[3] 등의 방법들이 이용되고 있다. 거베라의 형질전환연구는 Elomaa 등 [3]이 'Terra regina' 품종을 이용하여 엽병조직으로부터 형질전환체를 얻는데 성공하였는데, 형질전환의 성공에 관여하는 요인을 들면, 품종, 식물체의 선택, *Agrobacterium*의 strain, marker gene의 선발, co-culture 조건, 형질전환식물체 선발 방법, 그리고 식물체 재분화시스템 등[18]이 관여하는 것으로 보고하였다. 그 중 식물체의 재분화시스템 확립은 무엇보다 먼저 이루어져야 할 중요한 조건이라 할 수 있다. 거베라의 식물체 재분화를 위하여 미숙배[10, 20], 생장점[6,11,19], 엽병[14,15,19,21], 잎[17,19], 두상화[15-17], 화경[9] 등 여러 부위의 조직을 사용하였으며, 재분화의 성공여부는 사용하는 품종 및 식물재료의 부위에 따라 그 정도는 다를 수 있다.

따라서 본 실험은 거베라의 형질전환시스템을 확립하기 위한 기초자를 얻기 위하여 국내에서 육성한 거베라 신품종의 배양종인 엽병으로부터 callus의 유기 및 식물체 재분화에 미치는 적정 식물생장조절제의 종류, 조합, 농도 및 배양환경을 구명코자 수행하였다.

재료 및 방법

시험재료

시험재료는 경남농업기술원 화훼육종연구소에서 최근 육

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7520, Fax : +82-51-200-7505

E-mail : ockwon@daunet.donga.ac.kr

중한 절화용의 백색 반겹꽃 '화이트 데이', 절화용의 오렌지 색 홑꽃 '송송이', 그리고 절화용의 적색 중·소륜계 '러브송' 등 3품종의 기내배양중인 엽병을 이용하였다.

배양방법

이들 3품종의 엽병을 기내 배양하여 성장한 어린 묘의 엽병을 1 cm 정도 절단하여 MS배지(Murashige and Skoog 기본배지)에 치상하였다.

Callus유도를 위한 적정배지조건을 규명하기 위하여 MS 배지에 식물생장조절물질 NAA, BAP, TDZ, 그리고 2ip를 각각 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L 농도로 혼용한 배지에 배양하여 4주 후 그 결과를 관찰하였다. 식물체 재분화 조건을 검토하기 위하여는 식물생장조절물질로는 IAA, BA, 그리고 Zeatin을 0.1, 0.5, 1.0 mg/L 농도로 혼용한 배지에 배양하여 6주 후 그 결과를 관찰하였다. 또 식물체 재분화에 있어 분화식물의 배양기간을 규명하기 위하여 분화배지에 배양 21, 25, 28, 32, 38일의 엽병을 실험재료로 비교하였고, 또 MS배지의 적정농도를 알아보기 위하여 1, 1/2MS로 나누어 그 결과를 관찰하였다. Callus 유도 및 식물체 재분화를 위하여 3반복으로 처리하였으며, 반복 당 엽병을 20개체를 치상한 후 조사하였다.

Callus 유도를 위하여 4주 동안 암배양을 실시하였고, 식물체 재분화를 위하여 1주일 동안 암배양 하였으며, 그 후 명배양하였다. 배양환경은 25±1℃, 16/8시간(명/암)의 일장조건 하에서 1,500 Lux 광조건으로 배양하였다.

결과 및 고찰

배양 엽병조직으로부터 callus 유도

육성한 거베라 3품종 '화이트데이', '송송이' 그리고 '러브송'의 배양엽병조직으로부터 callus의 유도에 미치는 식물생장조절제의 영향을 검토하기 위하여 실시한 실험 결과는 Table 1과 같다. 배양엽병을 치상 1주일이 경과하면서 엽병이 부풀어지면서 엽병의 아래쪽 절단면으로부터 callus가 유도되기 시작하였다(Fig. 1). Callus의 형성은 품종 간 큰 차는 없었으나 그 중 '화이트데이'에서 양호한 경향이였다. 식물생장조절제의 종류, 농도 및 조합의 영향은 MS 배지에 NAA 0.1 mg/L + TDZ 0.5 mg/L의 혼용처리에서 타 처리구에 비하여 양호한 callus의 형성을 관찰할 수 있었다.

거베라의 배양조직으로부터 callus유도는 주로 형질전환 및 돌연변이를 위하여 부정아분화의 전단계로 이루어지는 데, Orikowska T. 등[15]은 기내배양 중인 어린 엽병으로부터 0.5 mg/L의 TDZ와 0.1mg/L NAA의 조건에서 양호한 callus를 얻을 수 있었으며, 또 Nagaraju 등[12]은 BA 1.0 mg/L + Kin. 1.0 mg/L + NAA 0.5 mg/L의 조건에서 분화율이 높은 callus을 얻는데 성공하였다. 본 실험에서도 callus형성을 위한 세포의 분열에 2ip보다는 TDZ가, 그리고 BA보다는 NAA가 더 효과적이었다.

식물체 재분화를 위한 식물생장조절제의 종류, 조합 및 농도
거베라 3품종 '화이트데이', '송송이' 그리고 '러브송'의 엽

Table 1. Effects of plant growth regulators on callus induction from petiole of 3 gerbera cultivars

Plant Growth Regulators (mg/L)				Callus Induction ^z		
NAA	BA	TDZ	2ip	White Day	Songsongee	Love Song
0.1	-	0.1	-	++	++	++
0.1	-	0.5	-	+++	++	+++
0.1	-	1.0	-	+++	++	++
0.5	-	0.1	-	++	++	++
0.5	-	0.5	-	++	++	++
0.5	-	1.0	-	++	++	++
1.0	-	0.1	-	++	++	++
1.0	-	0.5	-	++	++	++
1.0	-	1.0	-	++	++	++
-	0.1	-	0.5	+	+	+
-	0.1	-	1.0	+	+	+
-	0.1	-	2.0	++	++	++
-	0.5	-	0.5	++	++	++
-	0.5	-	1.0	++	++	++
-	0.5	-	2.0	++	++	++
-	1.0	-	0.5	++	++	++
-	1.0	-	1.0	++	++	++
-	1.0	-	2.0	++	++	++

^z -: < 0.1mm, +: 0.1~0.3, ++ :0.3~0.5, +++ : 0.5<

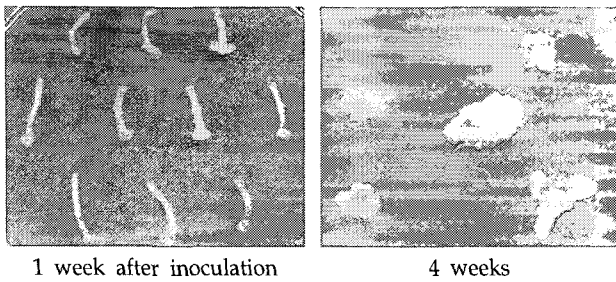


Fig. 1. Callus induction from *in vitro* petiole of gerbera.

병조직으로부터 식물체 재분화에 미치는 성장조절제의 영향을 검토하기 위하여 실시한 시험의 결과는 Table 2와 같다. 품종에 따른 재분화율은 다소의 차는 있었으나, 전반적으로 백색품종의 '화이트데이'가 양호한 경향이였다. 식물생장조절제의 종류, 조합 및 농도에 있어서는 3품종이 모두 IAA 0.1 mg/L+BA 0.5~1.0 mg/L+Zeatin 1.0 mg/L의 처리구에서 대체로 양호한 경향이였다.

거베라의 배양조직으로부터 식물체 분화는 식물생장조절제의 종류, 조합 및 농도에 따라 다르게 나타나는데, 잎조직으로부터는 BA 0.2 mg/L+NAA 0.5 mg/L의 처리에서 효과적이였다. 또 이 배지에 0.01~0.1 mg/L의 TDZ를 첨가하였을 때 높은 식물체 재분화율을 보였다[9]. 또한 Elomaa 등 [3]은 Terra Regina 품종을 이용하여 엽병과 잎조직으로부터 식물체의 재분화시스템을 확립하였는데, 잎으로부터는 재분화를 관찰할 수 없었으나, 엽병조직으로부터는 IAA 0.1 mg/L+BA 1.0 mg/L+Zeatin 1.0mg g/L의 처리에서 33%의 재분화 식물체를 얻었다는 보고는 본 실험의 식물생장조절제의 조건과 유사한 경향이였다.

기내 묘의 배양기간 및 MS 배지의 농도

기내 묘의 배양기간에 따른 식물체 재분화 효과를 조사하기 위한 실험에서는, 식물체 재분화를 위한 엽병의 적정배양기간은 32일 후의 엽병에서 그 효과가 가장 높았으며, 이러

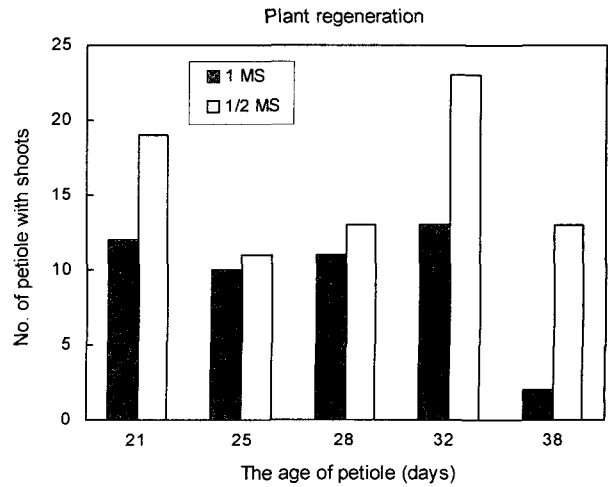


Fig. 2. Effects of plant regeneration on the different MS strength and the age of a petiole after 1 week culture on callus induction medium.

한 경향은 3품종 모두 비슷한 경향이였다. 기내 묘에 있어서 21일 이전의 어린 엽병은 조직이 유연하였으며, 또 38일 이후의 엽병은 경화되어 조직편으로 사용하기에는 적합하지 못하였다(Fig. 2). 엽병의 나이에 있어서 Orlikowska, T. 와 E. Nowak [13]는 잎이 완전히 전개되지 않은 어린 엽병을 사용하여 유도된 callus에서 식물체의 분화를 보고하였으나, 본 실험에서는 이보다는 좀 더 성장한 계대배양 후 32일 전후의 엽병에서 식물체의 재분화율이 높았다. 또한 이때의 MS 배지의 농도는 1MS 보다는 절반으로 줄인 1/2MS의 농도에서 재분화율이 높았다.

요 약

본 연구는 거베라의 신품종을 육성하여 식물체 재분화 조건을 찾기 위하여 경남농업기술원 화훼육종연구소에서 육성한 화이트데이, 송송이 그리고 러브송 등 3품종을 이용하여

Table 2. Effects of plant growth regulators on plant regeneration from petiole of 3 gerbera cultivar

Plant Growth Regulators (mg/L)			No. of cultured petiole	White Day		Songsongee		Love Song	
IAA	BA	Zeatin		No. of petiole with shoot	Rate of Reg. (%)	No. of petiole with shoot	Rate of Reg. (%)	No. of petiole with shoot	Rate of Reg. (%)
0.1	-	0.5	60	32	53.3	25	41.7	27	45.0
0.1	0.5	-	60	27	45.0	23	38.3	25	41.7
0.1	0.5	1.0	60	52	86.7	50	83.3	47	78.3
0.1	1.0	1.0	60	53	88.3	49	81.6	51	85.0
0.5	1.0	1.0	60	50	83.3	45	75.0	49	81.6
1.0	0.5	0.5	60	47	78.3	43	71.7	45	75.0
1.0	0.5	1.0	60	46	76.7	47	78.3	46	76.7
1.0	1.0	1.0	60	47	78.3	46	76.7	43	71.7

기내배양묘의 엽병으로부터 callus 유도조건 및 식물체 재분화에 미치는 몇 가지 요인을 구명하기 위해 실시되었다. Callus의 유도에 있어서는 3품종 중 '화이트데이'가 다른 품종보다 callus형성이 양호하였다. Callus의 유도를 위한 가장 효과적인 식물생장조절물질의 조건은 MS 기본배지에 NAA 0.1 mg/L+TDZ 0.5 mg/L의 조건에서 양호하였다.

식물체 재분화를 위한 가장 효과적인 식물생장조절물질의 조건은 MS 기본배지에 IAA 1.0 mg/L+BA 1.0 mg/L+Zeatin 0.1 mg/L의 혼용조건에서 양호한 경향이였다. 배양 식물체 재분화를 위한 엽병의 적정 계대배양 기간은 계대배양 후 32일이 경과된 엽병에서 양호한 경향이였다. 또한 식물체 재분화를 위한 적정 MS 배지의 농도는 1/2MS에서 식물체의 분화가 양호하였다.

감사의 글

“이 논문의 2003년도 동아대학교 학술연구비(단기과제) 지원에 의하여 연구되었음” 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Agriculture and Horticulture. 1997. *Agriculture and Horticulture company*. 125-135.
2. Chung, Y. M., H. A. Kim, K. Y. Kim, S. W. Park, Y. B. Yi, J. H. Lee, and O. C. Kwon. 2001. Morphological characteristics and genetic variation of gerbera (*Gerbera hybrida* Hort.). *Kor. J. Plant Biotech.* **3(3)**, 113-121.
3. Elomaa P., J. Honkanen, R. Puska, P. Suppanea, Y. Herariutta, M. Mehto, M. Kotilainen, L. Nevalainen and T. H. Teeri. 1993. *Agrobacterium*-mediated transfer of anti-sense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation. *BioTech.* **11**, 508-511.
4. Griffing, B. 1959. Concept for general and specific combining ability in relation to diallel crossing system. *Aust. J. Biological Sci.* **9**, 462-493.
5. Hutchinson, J. F., V. Kaul, G. Maheswaran, J. R. Moran, M. W. Graham and D. Richards. 1992. Genetic improvement of floricultural crops using biotechnology. *Aus. J. Bot.* **40**, 765-787.
6. Jerzy, M. and M. Lubomski. 1992. In vitro adventitious bud techniques for mutation breeding of *Gerbera jamesonii*. *Acta Hort.* **314**, 269-274.
7. John M. Dole, Harold F. Wilkins. 1999. *Floriculture Principles and species*. Prentice Hall. 356-361.
8. Jung, S. Y. 2000. Protoplasts Isolation and Culture System between *Gerbera Hybrida* Hort. 'Beauty' and *Aster magnus*. *MS Thesis, Dong-A Univ.*
9. Laliberte, S., L. Chretien, and J. Vieth. 1985. In vitro plantlet production from young capitulum explants of *Gerbera jamesonii*. *Hortscience.* **20(1)**, 137-139.
10. Miyoshi, K. and N. Asakura. 1996. Callus induction, regeneration of haploid plants and chromosome doubling in ovule cultures of pot gerbera (*Gerbera jamesonii*). *Plant Cell Rep.* **16**, 1-5
11. Murashige T., Serpa M., and B. Jones J. 1974. Clonal multiplication of gerbera through tissue culture. *Hortscience*, **Vol. 9(3)**, 175-180.
12. Nagaraju, V., G. S. L. Srinivas and G. Lakshmi Sita. 1998. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Gerbera hybrida*. *Current Sci.* **74(7)**, 630-634.
13. Orlikowska, T. and E. Nowak. 1997. Factors affecting transformation of *Gerbera*. *Acta Hort.* **447**, 619-621.
14. Orlikowska, T., E. Nowak, A. Marasek and D. Kucharska. 1999. Effects of growth regulators and incubation period on *in vitro* regeneration of adventitious shoots from gerbera petioles. *Plant Cell Tissue and Org. Cul.* **59**, 95-102
15. Pierik, R.L.M., H.H.M. Steegmans, and J.J. Marelis. 1973. *Gerbera* plantlets from in vitro cultivated capitulum explants. *Scientia Hort. Sci.* **28**. 9-17(1973).
16. Pierik, R. L. M., J. L. M. Jansen, A. Maasdam and A. C. M. Binnendijk. 1975. Optimization of *Gerbera* plantlet production from excised capitulum explants. *Sci. Hortic.* **3**, 351-357.
17. Reynoird, J. P., D. Chrique, M. Noin, S. Brown and D. Marie. 1993. Plant regeneration from in vitro leaf culture of several *Gerbera* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* **33**, 203-210.
18. Robinson, K. E. P. and E. Firoozababy. 1993. Transformation of floriculture crops. *Scientia Hort.* **55**, 83-99.
19. Ruffoni, B. and F. Massabo. 1991. "Tissue culture in *Gerbera jamesonii* hybrida", *Acta Horticulturae, Plant Biotechnology*, 289.
20. Sitbon, M. 1981. Production of haploid *Gerbera jamesonii* plants by in vitro culture of unfertilised ovules. *Agronomie.* **1**, 807-812.
21. Teresa Orlikowska, Elzbieta Nowak, Agnieszka Marasek & Danuta Kucharska, 1999 "Effects of growth regulators and incubation period on in vitro regeneration of adventitious shoots from gerbera petioles", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **59**, 95-102.
22. Tosca, A., L. Arcara and P. Frangi. 1999. Effect of genotype and season on gynogenesis efficiency in gerbera. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* **59**, 77-80.