

## 블랙베리(*Rubus fruticosus* L.)의 맹아절편체로부터 다경유도를 통한 식물체 재분화

신정순, 심옥경, 이종천, 조한직, 김이엽, 이강섭\*

(주)파낙시아 약용식물연구소

### Plant Regeneration via Multiple Shoots Formation from Sucker Explants of *Rubus fruticosus* L.

Jeong-Sun Shin, Oek-Kyeong Sim, Jong-Chon Lee, Han-Jik Cho, Ee-Yup Kim and Kang-Seop Lee\*  
Panaxia. Co. Ltd 452-32 Jangdong, Deokjingu, Jeonju, Jeonbuk, 561-360, Korea

#### ABSTRACT

This study was carried out to induce plant regeneration via shoot formation from sucker explants of *Rubus fruticosus* L. To induce adventitious shoots, sucker explants were sterilized in 1.2% NaOCl solution, and cultured on the MS solid medium supplemented with kinetin (0.5, 1.0, 3.0 mg/L) and BA (0.5, 1.0, 3.0 mg/L), respectively. As above, to induce adventitious shoots, sucker explants were cultured on the MS solid medium supplemented with IBA (0, 0.1, 1.0 mg/L) and BA (0, 0.1, 1.0, 2.0 mg/L). After 4 weeks of culture, the highest frequency (100%) of shoot formation from sucker explants was obtained from the medium with 1.0 mg/L BA. The highest shoot number per explant from in vitro shoot explants was 5.3. After 10 weeks of culture, the number of shoot per explant was increased. The highest frequency (85%) of root formation was obtained at 0.5 mg/L glycine medium, when the explant with shoot were cultured on the MS medium containing glycine at various concentrations from 0 to 2.0 mg/L. The survival rate of the plantlets after transfer to plastic pots containing sand, soil, and vermiculite (1:1:1, vol.) was 95%. The results indicate that micropropagation procedure can be applied for an efficient mass propagation of *Rubus fruticosus*.

**Key words :** Plant regeneration, multiple shoots, *Rubus fruticosus*

---

\*교신저자 : E-mail :

## 서론

나무딸기류에는 블랙베리(*Rubus fruticosus*) 외에도 복분자(*Rubus coreanus*), 명석딸기(*Rubus parvifolius*) 등 여러 종류가 있다. 이들은 장미과에 속하는 관목으로서 대부분의 품종은 가시를 가지고 있다. 국내에서는 나무딸기류 중 복분자가 현재 전북 고창 등에서 널리 재배되어 복분자주 등의 개발을 통한 농가소득의 증대를 이루고 있다. 여러 종류의 나무딸기류를 통한 제품개발에 의한 소비자의 다양한 기호도를 만족하기 위해서는 제품개발에 앞서, 여러 종류의 나무딸기의 번식방법의 개발을 통한 묘목의 대량보급이 필수적이다.

블랙베리중 가시없는 블랙베리는 가시가 없기 때문에 수확시 편리할 뿐 아니라, 열매가 기존 복분자보다 3-4배 크며, 맛에 있어서도 복분자와는 차이가 있으므로, 이 묘목의 대량생산과 이를 통한 제품개발은 산업적으로 기여도가 크다고 생각된다. 가시없는 블랙베리는 tip layer 또는 삼목에 의하여 상업적으로 증식되어지고 있는데 (Broome and Zimmerman, 1978; Caldwell, 1984), 근삼의 경우에는 신초의 형성율이 저조하며, tip layer를 이용한 증식의 경우에는 식물체당 이용가능한 tip이 적으므로, 대량번식을 하기에는 적합하지 않음을 알 수 있다(Broome and Zimmerman, 1978). 여러 종류의 블랙베리품종의 대량증식에 있어 상기한 문제점은 조직배양기술을 이용하면 해결할 수 있다 (Fernandez and Clark, 1991; Bobrowski et al., 1996). 블랙베리의 조직배양에 의한 식물체 재생유도는 체세포배 발생에 의한 경우(Cantoni et al., 1993)와 신초형성에 의한 경우가 있는데, 후자의 경우에는 대부분 배양재료로서 shoot tip을 사용하여 이루어졌다 (Broome and Zimmerman, 1978; Skirvin et al., 1981). 본 연구에서는 국내에서 자생하고 있는 나무딸기의 일종인 가시없는 블랙베리(*Rubus fruticosus*)의 맹아배양을 통한 묘목

의 대량생산체계를 확립하고자 시도되었다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

본 연구에서 사용된 시료는 (주)파낙시아 부설농장에서 재배되고 있는 블랙베리 V-3 품종(*Rubus fruticosus* L. var. V-3)으로부터 채취된 맹아 절편체를 사용하였다. 맹아는 70%에 1분, 1.2% sodium hypochlorite 용액에 15분간 침적하여 표면살균한 후, 멸균수로 3-4회 세척하여 약 5 mm의 크기로 잘라 일회용 배양접시(87 x 15 mm)에 절편체를 12개씩 치상하여 3반복 배양하였다. 배지는 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 sucrose 30 g/L, 한천 7 g/L 그리고 호르몬을 농도별로 첨가하고 pH를 5.8로 조정한 후, 121℃, 1.2 기압하에서 15분간 증기멸균하여 사용하였다. 배양은 온도 24 ± 1℃, 광도 46 μmol/cm<sup>2</sup>/sec, 16h 광주기하에서 약 10주간 실시하였다.

### 맹아로부터 신초형성 및 다경 유도

신초의 유도를 위하여 무균상태의 블랙베리 맹아 절편체를 kinetin(Kin, 0.5, 1.0, 3.0 mg/L)과 BA (0.5, 1.0, 3.0 mg/L)가 각각 첨가된 MS 배지에서 4주간 배양하여 절편당 형성된 신초의 수를 조사하였고, 동일한 방식으로 맹아 절편체를 IBA(0, 0.1, 1.0 mg/L)와 BA(0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L)가 조합 처리된 MS 배지에서 약 4주간 배양하여 신초 유도를 조사하였다. 위에서 얻어진 신초 절편체를 이용하여 IBA(0, 0.1, 1.0 mg/L)와 BA(0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L)가 조합 처리된 MS 배지에서 4주간 배양하여 multiple shoots를 유도하였다.

### 신초로부터 뿌리발생 유도 및 활착

형성된 multiple shoots로부터 뿌리발생을 유도하기 위하여, multiple shoots로부터 분리된 각각의 싌초를 glycine의 농도(0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L)를 달리한 MS 기본배지에서 4주간 배양하여 뿌리의 발생율을 조사하였다. 식물체의 토양 순화는 싌초와 뿌리가 잘 발달된 정상적인 식물체를 모래, 토양, 그리고 버뮤쿨라이트가 혼합된 토양(1:1:1, vol.)에 이식하여 실시하였다.

### 결과 및 고찰

절편당 형성된 싌초의 수에 대한 BA와 kinetin의 효과를 조사하기 위하여, 블랙베리의 멍아 절편체를 0.5, 1.0, 3.0 mg/L BA와 kinetin을 각각 첨가한 MS 배지에 4주간 배양한 결과, 절편체당 형성된 싌초의 수는 1.0 mg/L BA 처리구에서 4.1개로 최고를 나타내었고, 0.5 mg/L kinetin 처리구에서는 2.1개를 나타내어 BA가 kinetin보다 효과적임을 알 수 있었다(Fig. 1). 따라서 싌초 형성에 대한 BA와 kinetin의 복합 효과를 구명하기 위하여 블랙베리의 멍아 절편체를 BA(0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L)에 IBA(0, 0.1, 1.0 mg/L)를 조합 처리한 배지에서 약 4주간 배양하였다. 가장 높은 싌초 형성율(100%)은 1.0 mg/L 또는

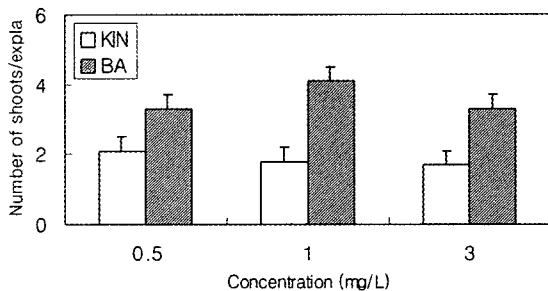


Fig. 1. Frequency of shoot formation from sucker of *Rubus fruticosus* on MS medium supplemented with kinetin (KIN) or BA after 4 weeks of culture. Data represent the mean  $\pm$  SE of three replicates.

2.0 mg/L BA가 단독 첨가된 배지에서 이루어졌다(Fig. 2). 이러한 현상은 다른 종의 블랙베리에서도 유사하게 관찰된다(Bobrowski et al., 1996).

1.0 mg/L 또는 2.0 mg/L BA가 단독 첨가된 배지에서 얻어진 싌초의 절편체를 IBA(0, 0.1, 1.0 mg/L)와 BA(0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L)가 조합 처리된 배지에 약 4주간 배양하였을 때, 최대의 multiple shoot 형성율(100%)은 1.0 또는 2.0 mg/L BA가 단독 처리된 배지에서 이루어졌다(Fig. 3). 이때 절편체당 형성된 싌초의 수는 2.0 mg/L 처리구에 비하여 1.0 mg/L 처리구에서 높게 나타났으며, 최고의 싌초 수는 평균 5.3개 이었다(Fig. 4).

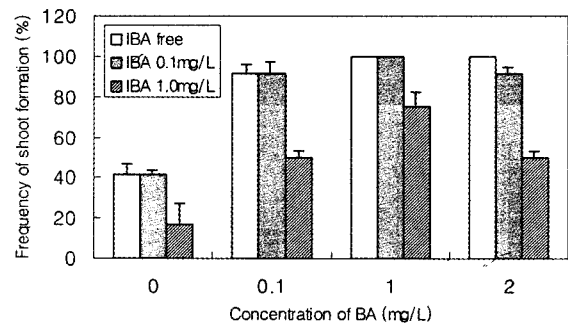


Fig. 2. Frequency of shoot formation from sucker of *Rubus fruticosus* on MS medium supplemented with IBA and BA after 4 weeks of culture.

Data represent the mean  $\pm$  SE of three replicates.

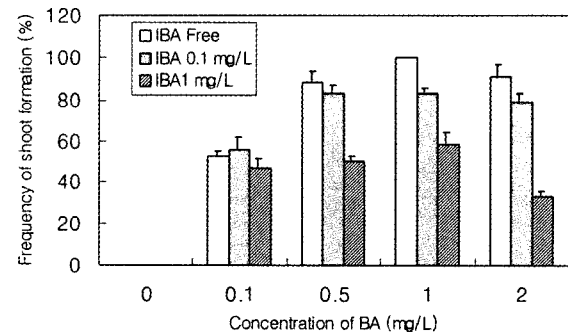


Fig. 3. Frequency of shoot formation from shoot explants formed in vitro of *Rubus fruticosus* on MS medium supplemented with IBA and BA after 4 weeks of culture. Data represent the mean  $\pm$  SE of three replicates.

이러한 결과는 블랙베리의 품종의 일종인 "Marion"의 경우, 잎 절편을 1 mM의 TDZ에 약 3주간 전처리하여 5 mM BA 와 0.5 mM IBA가 조합처리된 WPM 배지에 배양하였을 때, 약 70%의 신초 형성율, 절편체당 신초 수는 5.1개를 나타낸 연구결과(Meng *et al.*, 2004)에 비하여 훨씬 높은 결과이다. 이러한 차이는 품종 및 사용 배지가 다르기 때문으로 해석된다.

본 연구에서 약 10주 정도 배양을 더 오래하였을 때, multiple shoot 형성율이 더 높아질 뿐 아니라, 절편체당 신초의 수도 많아짐을 관찰할 수 있었다(data 미제시). 특히 0.5 및 2.0 mg/L BA 단독 처리구에서도 약 100%에 가까운 multiple shoot 유도를 관찰할 수 있었으며, 절편체당 신초의 수도 증가되었다(data 미제시). 이러한 현상은 배양기간의 연장에 따른 결과이므로 대량생산의 공정과정의 설계시에 적용한다면 유용할 것으로 생각된다.

일반적으로 조직배양시에 사용되는 배지는 조성물의 종류 및 농도에 따라 여러 종류가 있으므로, 연구목적에 적합한 배지의 선택이 요구된다. Glycine은 MS 배지에는 2.0 mg/L가 첨가되며, SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) 배지에는 첨가되지 않고 있다. 형성된 신초로부터 뿌리발생을 유도하기 위하여 신초를 MS 기

본배지에 glycine의 농도를 달리하여(0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L) 첨가한 배지에 약 4주간 배양하였을 때 발근율은 각각 50, 62.7, 85, 60.4, 36.1% 이었다(Fig. 5). 가장 높은 발근율은 glycine의 농도를 1/4로 희석한 배지(0.5 mg/L 첨가배지)에서 85%로 나타나, 이 조건이 발근에 있어 가장 효과적임을 알 수 있었다. Glycine이 2.0 mg/L 첨가되는 MS기본배지에 배양한 경우에는 발근율은 36.1%로서, glycine을 첨가하지 않은 경우(50%)에 비하여 오히려 낮은 결과를 나타내어 발근 유도시 glycine을 첨가하지 않거나 희석하여 첨가하는 것이 효과적임을 알 수 있었다. Glycine과 관련하여 기관분화에 있어서 효과적인 연구결과는 사과에서 아미노산의 일종인 glycine을 첨가하지 않고 BA와 NAA를 첨가한 MS 배지에서 고빈도(100%)의 신초를 유도하고, 이로부터 약 90%의 발근을 유도한 경우에서 살펴 볼 수 있다(Caboni *et al.*, 2000). 본 연구결과에서 보여준 glycine의 농도조절에 의한 발근 촉진효과는 다른 연구에서 찾아보기 드문 긍정적 결과이므로, 향후 다른 작물에 있어서도 적용할 필요성이 있을 것으로 생각된다. 본 연구에서 최고의 발근율이 85%이었는데, 이러한 결과는 Broome과 Zimmerman(1978)이 여러 품종의 블랙베리로부터 뿌리 유도시에 MS배지에 옥신의 일종인

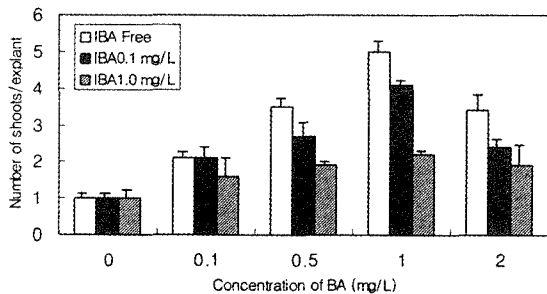


Fig. 4. Number of shoots from shoot explants formed in vitro of *Rubus fruticosus* on MS medium supplemented with IBA and BA after 4 weeks of culture. Data represent the mean  $\pm$  SE of three replicates.

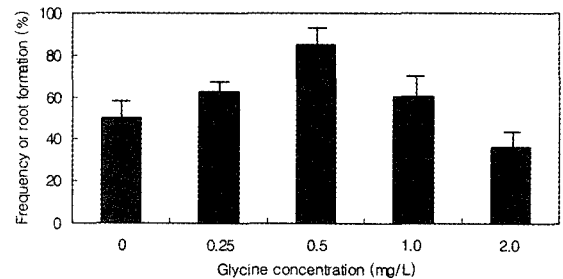


Fig. 5. Effects of glycine on the root formation from shoot explants formed in vitro of *Rubus fruticosus* after 4 weeks of culture. Glycine was treated with various concentration from 0 to 2.0 mg/L. Data represent the mean  $\pm$  SE of three replicates.

IBA를 1 mg/L 첨가하여 64%의 발근율을 유도한 것에 비하여 상당히 높은 빈도이므로, 생산 측면에서 매우 효과적임을 알 수 있었다.

한편, 신초와 뿌리가 잘 발달된 유식물체를 모래, 토양, 그리고 버뮤쿨라이트가 혼합된 토양(1:1:1, vol.)에 이식하여 약 6주간 순화를 유도하였다(Fig. 6E). 순화된 식물체를 노지에 이식하였을 경우 약 95%의 생존율을 나타내었으며, 1년 이상의 재배결과 정상적으로 생육되어 과실이 양호하게 수확되었다(Fig. 6F-G). 이상의 결과를 통하여 가시없는 블랙베리 묘목의 대량생산이 가능하고 원예 농가에 원활한 공급이 가능할 것으로 생각된다.

### 적요

블랙베리의 다경유도를 통한 식물체 재생을 위하여, 노지에서 생육되고 있는 맹아를 채취하여 1.2% NaOCl 용액에 침지하여 표면 살균한 후, kinetin과 BA가 각각 포함된 MS 배지에서 4주간 배양하여 절편당 형성된 신초의 수를 조사하여 BA가 효과적임을 밝혔다. 동일방식으로 맹아를 IBA와 BA를 첨가한 MS 고체배지에서 4주간 배양하여 신초를 유도하였는데 1.0 mg/L BA가 첨가된 배지에서 신초유도는 100% 이루어졌다. 기내배양한 신초의 절편체를 1.0 mg/L BA가 첨가된 MS 배지에 치상하여 형성

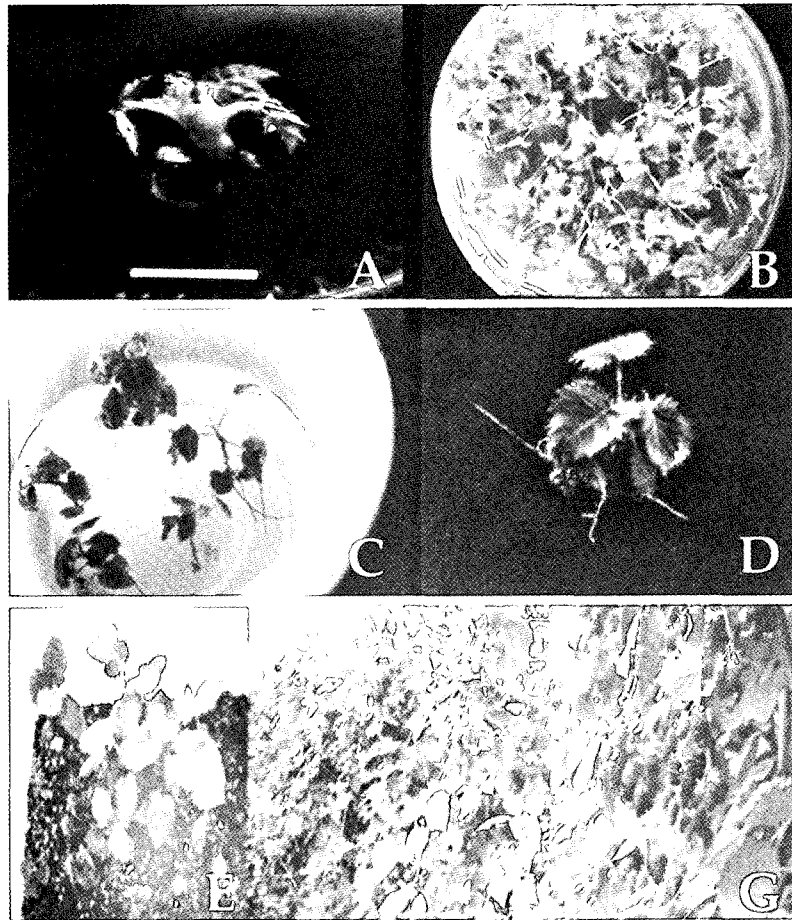


Fig. 6. Plant regeneration via shoot formation in *Rubus fruticosus*. A, Shoot derived from a sucker; B, Multiple shoots; C · D, Plantlets with shoots and roots in the plastic culture jar; E, Acclimatization of plantlets in soil; F · G, Adult plants and fruits of *Rubus Fruticosus*.

된 신초의 수는 절편체당 5.3개로 최고를 나타내었다. 약 10주 정도 배양을 더 오래하였을 때, 다경 형성율이 더 높아질 뿐 아니라 절편체당 신초 수도 많아졌다. 형성된 신초로부터 뿌리 발생을 위하여 glycine의 농도를 달리한 (0~2.0 mg/L) MS 기본배지에서 4주간 배양하였을 때, 0.5 mg/L glycine을 첨가한 배지에서 고빈도 (85%)의 뿌리발생을 관찰 할 수 있었다. 재생된 식물체는 모래 : 토양 : 버뮤클라이트 (1:1:1, vol.) 혼합토양에서 순화시켜, 토양에 이식하였을 때 95%의 식물체 생존율을 나타내었다.

### 사사

본 연구는 2004년 중소기업 기술혁신사업의 지원에 의해 수행되었습니다.

### 인용문헌

Bobrowski, V.L., P.C. Mello-Farias and J.A. Peters. 1996. Micropropagation of blackberries (*Rubus* sp.) cultivars. Rev. Bras. de AGROCIENCIA 2:17-20.

Broome, O.C. and R.H. Zommerman. 1978. *In vitro* propagation of blackberry. Hort. Sci. 13:151-153.

Caboni, E., P. Lauri and S. D'Angeli. 2000. *In vitro*

plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. Plant Cell Rep. 19:755-760.

Caldwell, J.D. 1984. Blackberry propagation. Hort. Sci. 19:193-195.

Cantoni, L., G. Berardi and P. Rosati. 1993. Organogenesis and somatic embryogenesis from immature embryos of blackberry. Acta Hort. (ISHS) 352:37-42.

Fernandez, G.E. and J.R. Clark. 1991. *In vitro* propagation of the erect thornless "Navaho" blackberry. Hort. Sci. 26:1219.

Meng, R., T.H. Chen, and C.E. Finn. 2004. Improving *in vitro* plant regeneration from leaf and petiole explants of 'Marion' blackberry. Hort. Sci. 29:316-320.

Murashige, T. and F.A. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15:473-497.

Schenk, R.U. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50: 199-204.

Skivin, R.M., M.C. Chu and E. Gomez. 1981. *In vitro* propagation of thornless trailing blackberries. Hort. Sci. 16:310-312.

(접수일 2005. 3. 20)

(수락일 2005. 4. 20)