

패랭이꽃속 *Dianthus gratianopol*의 현탁배양세포로부터 Shoot 증식과 식물체 재분화

김준철*
강원대학교 생명과학부

Shoot Proliferation and Plant Regeneration from Suspension-Cultured Cells of *Dianthus gratianopol*

Joon-Chul Kim*

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

ABSTRACT Conditions for efficient organogenesis and plant regeneration from *Dianthus gratianopol* suspension cultured cells were established. Shoot-forming calli of glossy surface, pale green and knobby type were selected from leaf explant-derived calli and were suspension-subcultured every week in CP liquid medium with 1.0 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L BAP. Combinations of 1.0 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L BAP, and 1.5 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L BAP were effective for the induction of regenerative callus from the suspension cultured cell clusters. Multiple shoot primordia were initiated from the green spots of these regenerative callus and formed shoots on MS medium with 1.0 mg/L TDZ and 0.5 mg/L PAA. Shoot regeneration frequency (calli regenerating at least one shoot) was about 87%. For plant regeneration, proliferated shoots were excised and transferred to MS medium with 0.1 mg/L NAA for root initiation after 9 weeks of culture. The regenerants were potted in soil and formed the flowering buds and petals. Also, adventitious shoots were formed from the excised green shoot primordia of regenerative callus and these shoots proliferated successfully and regenerated to whole plants.

Key words: Organogenesis, *Dianthus gratianopol*, shoot-forming calli, glossy surface, adventitious shoots, flowering buds

서 론

패랭이꽃속 (*Dianthus*)은 꽃이 아름답고 관상가치가 높아 화훼, 관상용으로 재배되고 있고 carnation, indian carpet, Chinese pink, 히노마루 패랭이꽃, 갯패랭이꽃, 술패랭이꽃 등을 포함하고 있다. 이들은 바위틈이나 절개지, 길가 등 건조하고 척박한 땅 그 어느 곳을 가리지 않고 잘 자라지만 차량소통이 조금만 많은 오염된 곳에선 자라지 못해 서식처와 개체수가 감소하고 있다. 또한 패랭이꽃속은 진통, 진정제와 요 분비를 촉진하는 효과도 있다 (Kim and Lee 1996). 이와 같이 색깔이 곱고 생김새가 독특하기 때문에 패랭이꽃 속은 관상가치가 높은 야생화로 종류가 많고 종간에 교잡되는 것이 많아 유럽, 미국 및 일본에서는

이를 이용한 신품종의 육성이 진행되고 있다 (Spamaaij et al. 1990). 이들은 주로 실생(實生), 아삽(芽插) 및 분주(分株) 등을 통해 번식되고 있으나 이러한 방법은 영양번식에 의한 생산이기 때문에 패랭이꽃속의 개발에는 큰 제한요인으로 작용하고 있다 (Nakano et al. 1996; Nimura et al. 2003; Yadav et al. 2003).

조직배양 과정에서 재분화능력이 있는 캘러스로부터 형성된 개체에는 변이가 많이 발생하기 때문에 유용한 변이종의 출현빈도를 높일 수 있어 이러한 방법을 통해 패랭이꽃속의 품종에 대한 개발이 진행되고 있다 (Crouch and van Staden, 1993; Thakur et al. 2002; Nontaswatsri and Fukai 2005). 기내배양을 통한 조직배양 연구는 종의 형질을 개선하여 품종의 개발을 극대화하고 짧은 시간과 좁은 공간에서 많은 양을 번식시켜 무병식물체의 양산 및 생식질을 장기 보존하는데 이용되고 있다 (Mohammed and Vidaver 1990). 그 경우를 살펴보면 꽃잎 (Frey and Janick1991), 꽃

*Corresponding author Tel 82-33-250-8526 Fax 82-33-251-3990
E-mail: jckim@kangwon.ac.kr

밥 (Villalobos 1996), 줄기조직 (Radojevic et al. 1990; Frey and Janick 1991), 액아의 배양을 통한 adventitious shoot의 획득 (Miller et al. 1991; De Oliveira et al. 1997; Casanova et al. 2004) 및 잎절편체 (Jethwani and Kothari 1996)의 조직배양이 보고된 바 있다.

육종소재가 매우 한정되어 있는 패랭이꽃속에서 *Dianthus gratianopol*은 다년생식물로 줄기가 약하고 꽃의 화기가 짧은 단점이 있으나 꽃색이 화려하여 이용가능성이 매우 높지만 *D. gratianopol*에 대한 조직배양을 이용한 미세증식에 관한 연구가 Chang 등(2002)의 보고를 제외하고는 거의 없어 *D. gratianopol*의 기내배양의 특성을 파악하는 것이 절실히 요구되고 있다. 본 연구에서는 패랭이꽃속을 기내배양하여 대량증식하기 위한 전단계로서, *D. gratianopol*의 잎절편체를 이용해 기내 (*in vitro*)에서 shoot-forming 캘러스를 유기하고 대량증식된 현탁배양세포로부터 재분화능력이 있는 캘러스를 다량 유도하여 shoot를 증식하고 안정된 식물체 재분화 조건을 확립하고자 하였다. 또한 shoot 정단원기조직으로부터 유도된 부정아 (adventitious shoot)를 이용하여 캘러스단계를 거치지 않는 식물체 재분화를 이루어 안정된 식물체 육성과 기내 배양체의 특성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

Dianthus gratianopol subsp. *rosafeder*은 강원도 농업기술원으로부터 분양 받아 온실에서 계속 생육하였으며 5 - 10 mm의 잎조직 및 어린 줄기조직을 식물 재료로 사용하였다. 식물재료를 무균상 내에서 0.4% NaOCl 용액에 25분간 표면소독한 후 멸균된 증류수로 3회 세척하였다. 잎절편체 및 줄기절편체는 각각 0.5-1 cm² 크기로 잘라 MS배지에 배양하였으며, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), *a*-naphthalenetic acid (NAA), 6-benzylaminopurine (BAP), thidiazuron (TDZ), phenylacetic acid (PAA)를 식물생장조절물질로 사용하였다.

캘러스의 유도 및 Shoot-forming (SF) 캘러스의 선별

잎절편체와 줄기절편체를 0.1-2.0 mg/L 2,4-D와 0.1-1.0 mg/L BAP가 첨가된 MS배지에 접종하여 식물생장조절물질 별로 캘러스를 유도하였다. 모든 처리구는 27°C 암조건과 광조건 (21.5 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^2\text{s}^{-1}$)에서 배양하였으며 해부현미경으로 캘러스의 발생 상태 및 외부형태를 주기적으로 관찰하였다. 유도된 캘러스로부터 표면에 광택이 있고 조직이 치밀하게 배열되고 연한 녹색의 SF 캘러스를 선별하였다.

SF 캘러스의 현탁배양

유도된 SF 캘러스를 잘게 자른 후 생체량 0.5-1.0 g 캘러스를 250 mL Erlenmeyer flask에 50 mL의 CP (CLC/Ipomoea basal medium, Duchefa C0228) 액체배지에 1.0 mg/L 2,4-D 와 0.5 mg/L BAP를 첨가하여 27°C, 암소에서 100 rpm으로 현탁배양하였다. 처음에는 1개월은 3-4일 간격으로 이 후로는 일주일 간격으로 계대배양하였으며 커다란 세포괴를 제거하기 위해 860 μm (pore size) 스테인레스 체로 배양세포를 여과시켰다.

현탁배양세포괴로부터 재분화능력이 있는 캘러스 유도 및 식물체 재분화

현탁배양된 세포괴를 0.1-2.0 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L BAP가 첨가된 MS 고체배지에 접종하여 2,4-D 농도에 따른 재분화능력이 있는 캘러스 (shoot 원기를 재분화할 수 있는 캘러스)의 유도율을 조사하였다. 식물생장조절제에 따른 식물체 재분화율을 조사하기 위해 재분화능력이 있는 캘러스를 0.5, 1.0, 1.5 mg/L TDZ과 0.5, 1.0, 2.0 mg/L PAA가 조합된 MS배지에 접종하여 shoot의 재분화율을 조사하였다. 재분화능력이 있는 캘러스의 정단형성 원기조직을 절단하여 재분화배지에서 부정아 (adventitious shoot)를 얻어냈고 증식된 shoot로부터 호르몬이 첨가되지 않은 MS배지에서 뿌리를 유도하여 식물체로 재분화시켰다.

실험설계와 통계 분석

모든 실험은 3반복으로 3처리로 이루어졌고 통계분석은 SAS program (Version 6.12, SAS Institute Inc. USA)을 이용한 Duncan's multiple range test로 분석되었다.

결과 및 고찰

패랭이꽃속 식물의 절편체에서 캘러스 유도는 품종이나 계통뿐 만 아니라 배지의 조성, 배양조건과 방법에 따라서 양상이 크게 상이한 것으로 알려져 있다 (Frey and Janick 1991; Jethwani and Kothari 1996; Chang et al. 2002). *D. gratianopol*의 캘러스 유도에 효과적인 식물생장조절물질의 종류와 농도를 파악하고자 잎과 줄기 절편체를 2,4-D와 BAP가 첨가된 MS배지에 치상하여 캘러스 유도율을 조사하였다 (Table 1). 배양 2주 후부터 잎절편체의 절단면에서 캘러스가 형성되기 시작하여 표면 전체로 확산하는 것을 관찰할 수 있었으며 잎절편체의 모든 조합에서는 캘러스가 유도되었으나 줄기 절편체에서는 캘러스가 대부분 유도되지 않고 갈변화 또는 고사현상이 두드러지게 나타났다. *D.*

Table 1. Effect of plant growth regulators on callus induction from the explants of leaf and stem in *D. gratianopol*

Plant Growth Regulators (mg/L)		Callus Induction* (%)	
2,4-D	BAP	Leaf Explants	Stem Explants
0.1	0.1	11d ^z	0d ^z
0.5	0.1	34c	0d
1.0	0.1	48c	4c
1.0	0.5	82a	11a
1.5	0.5	78a	0d
1.5	1.0	46c	0d
2.0	0.0	38c	0d
2.0	0.5	64b	7b
2.0	1.0	46c	6b

^z Mean separation by Duncan's multiple range test at P≤0.05
 *Percent of callus-forming explants per 54 explants.

*gratianopol*의 잎절편체를 1.0 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L BAP의 조합배지에 치상하였을 때 캘러스가 가장 효과적으로 유도되었고 또한 광조건 (21.5 μE · m⁻² · s⁻¹)이 암조건보다 캘러스 유도에 유리하게 작용하는 것을 알 수 있었다 (데이터 제시 안함).

1.0 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L BAP 조합배지에서 유도된 잎절편체 유래 캘러스를 광조건에서 계대배양하였을 때 초기 형태를 계속 유지하는 큰 덩어리로 성장하였다. 이들 캘러스의 윗부분은 노쇠하여 분열력이 약해 캘러스로부터 shoot 원기를 발달시킬 수 있는 부위의 캘러스의 선별은 중요하다 (Jethwani and Kothari 1996; Kim et al. 1998). *D. gratianopol*의 잎절편체 유래 캘러스는 부위별 형태적 특징에 의해 shoot-forming (SF) 캘러스와 non-shoot-forming (NSF) 캘러스로 구분할 수 있었다. SF 캘러스는 표면에 광택이 있고 조직이 치밀하게 배열되었으며 전체적으로 구형의 돌기구조로 연한 녹색을 띠었다 (Figure 1A). 반면에 NSF 캘러스는 전반적으로 함수량이 많고 구성세포 간에 부착력이 적어 쉽게 부서지는 특징을 보였다.

대량증식을 위해서는 현탁배양을 통해 다량의 균일한 세포괴를 얻고 이들을 재분화가 가능한 캘러스로 유도하는 것은 안정된 식물체 재분화 조건을 확립하고 매우 중요하다 (Thakur et al. 2002; Nontaswatsri and Fukai 2005). 현탁배양을 위해 육안으로 선별된 배양 초기의 SF캘러스들은 단세포로 분리되지 않고 대부분 여러 개의 세포가 군집으로 뭉쳐 있기 때문에 이들을 처음 1개월간은 3~4일 간격으로 2회 이상 계대배양을 통해 선별된 캘러스를 1.0 mg/L 2,4-D 와 0.5 mg/L BAP가 첨가된 CP (CLC/Ipomoea basal medium, Duchefa C0228) 액체배지에서 다량으로 현탁배양했을 때 계대배양 2개월 후 조직이 치밀한 세포괴를 관찰할 수 있었다 (Figure 1B). *D. gratianopol*의 잎절편체 유래 캘러스에서 CP 배지를 사용한 보고는 없지만, 애기장대의 현탁배양세포에서 CP 배지는 MS 배지에 비해 초기에 관찰

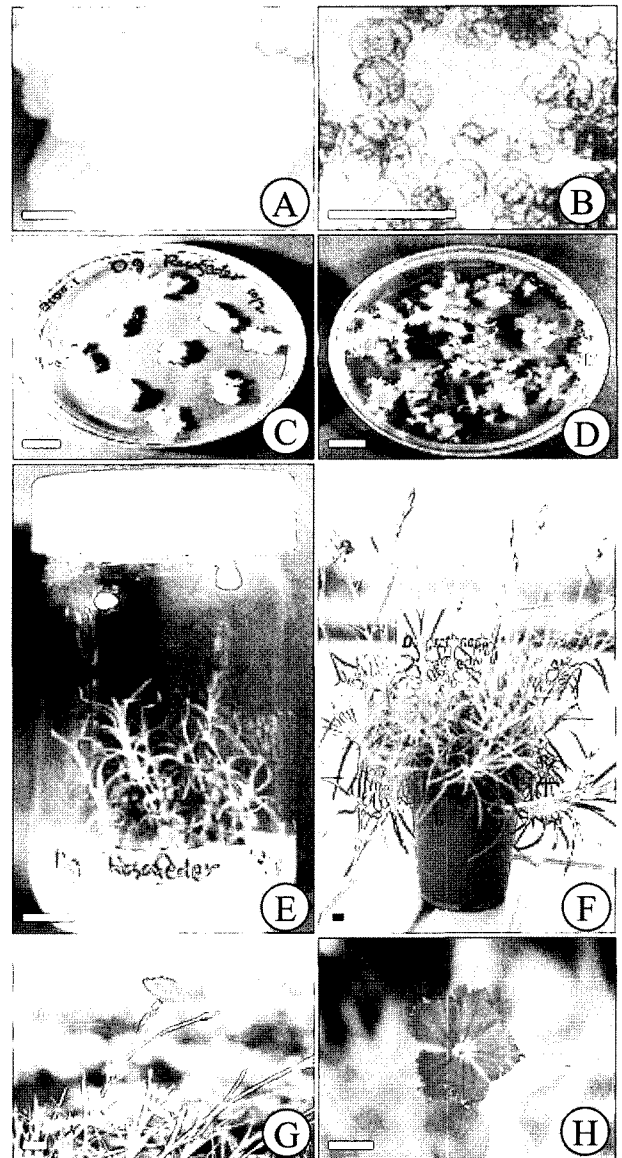


Figure 1. *In vitro* various developmental stages, plant regeneration and regenerants from *D. gratianopol* leaf explants. A, Shoot-forming callus; B, Suspension cultured cell clusters; C, Regenerative calli with young shoot primordia; D, Multiple shoot primordia with 1.0 mg/L TDZ and 0.5 mg/L PAA; E, Plantlet with roots on MS medium with 0.1 mg/L NAA; F, Regenerated plants potted in soil; G, Flowering buds; H, Petals. Bars in A and B = 100 μm, Bars in C, D, E, F, G and H = 10 mm.

되는 세포질이 텅빈 세포들의 제거에 효과적이고 NH₄⁺ 농도가 20 mM에서 10 mM로 감소되어 재분화 능력의 유지기간을 연장할 수 있는 것으로 보고하였다 (Kim et al. 1998). *D. gratianopol*의 현탁배양세포에서도 CP 배지는 MS 배지에 비해 초기에 관찰되는 세포질이 텅빈 세포들이 적게 관찰되었으며 배양물을 흔들어준 후 정지시키면 조직이 치밀한 세포괴들은 먼저 침전했기 때문에 이 방법을 이용하여 세포질이 텅빈 형태의 신장된 세포괴를 제거할 수 있었다. 계대배양 4개월 후 조직이 치밀한 세포괴가 배양물의 대부분을 차지하였고 이들 현탁배양세포괴를 2,4-D와 BAP가 조합

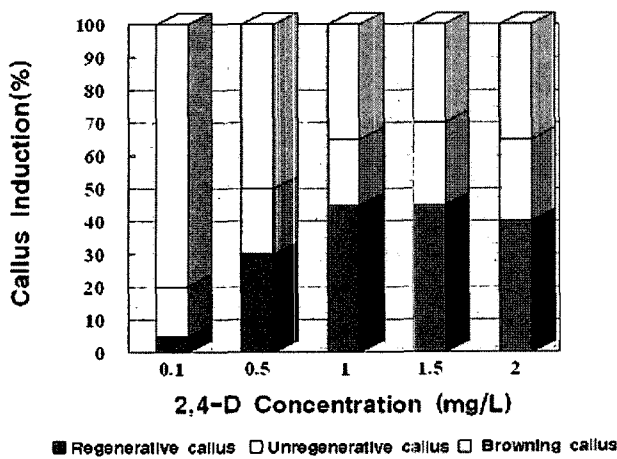


Figure 2. Effect of 2,4-D concentration with 0.5 mg/L BAP on the induction of regenerative, unregenerative and browning callus from shoot-forming suspension cell clusters derived from *D. gratianopol* leaf explants.

된 MS 고체배지에 치상하여 0.5 mg/L BAP와 2,4-D 농도에 따른 현탁배양 세포괴로부터 캘러스의 형성률을 조사하였다 (Figure 2). 1.0 또는 1.5 mg/L의 2,4-D가 첨가된 처리구에서는 치상된 세포괴는 국부적으로 세포분열을 유도하여 액체배지에서 보였던 세포질이 충만한 모습을 지속한 반면 0.1 또는 0.5 mg/L의 2,4-D가 첨가된 처리구에서는 1~3주 까지 세포분열이 유도되었으나 그 이상의 분열은 진행되지 않고 쉽게 부서지고 갈변, 고사하는 것을 관찰할 수 있었다. 현탁배양세포괴의 초기 형태의 유지와 증식에 양호한 0.5 mg/L BAP와 1.0 mg/L의 2,4-D가 조합 처리된 MS 고체배지에서 배양했을 때 표면이 돌기모양인 캘러스가 형성되었으며 이들을 재분화능력 (regenerative)이 있는 캘러스로 구분하고 shoot 형성을 유도하기 위해 사용하였다 (Figure 1C). 이에 반해 쉽게 부서지고 (non-regenerative), 갈변 (browning) 되는 캘러스는 shoot 원기를 생성하지 않고 고사하였다. 따라서 0.5 mg/L BAP와 1.0 mg/L의 2,4-D의 조합 농도는 MS 고체배지와 CP액체배지에 배양하는 동안 초기의 광택이 있고 조직이 치밀한 연한 녹색 캘러스의 유지와 재분화 능력이 있는 캘러스를 얻는데 효과적임을 알 수 있었다.

현탁배양 세포괴로부터 얻어진 재분화능력이 있는 캘러스로부터 multiple shoot의 재분화를 통해 소식물체의 대량 증식을 시도하고자 이들 캘러스를 PAA와 TDZ 조합구에 옮겨 치상한지 4주후 다량의 shoot 원기를 형성하고 multiple shoot로 분화하였다 (Figure 1D). 이들 캘러스는 0.5 mg/L PAA와 0.1 mg/L TDZ이 포함된 MS 재분화배지에서 shoot 형성률이 평균 87% (캘러스 당 한 개 이상의 shoot 형성)로 가장 높았고 (Table 2) 녹화가 진행되어 녹점 (green spot)을 형성하고 배양 7주후부터는 다량의 shoot를 증식하였다. 배양 9주후 multiple shoot는 완전한 잎과 줄기의 형태를 갖춘 소식물체로 성장하였다 (Figure 1E & 1F). 식물체의 재분

Table 2. Effects of TDZ and PAA combinations on shoot regeneration from the regenerative calli derived from *D. gratianopol* leaf explants

Plant growth regulators (mg/L)		Shoot regeneration*(%)
TDZ	PAA	
0.0	0.5	18d ^z
0.5	0.5	49c
1.0	0.5	87a
1.5	0.5	67b
1.0	1.0	61b
1.5	1.0	55c
1.0	2.0	59bc
1.5	2.0	53c

화에 사용되는 식물생장조절물질에는 cytokinin계의 BAP와 auxin계의 NAA가 효과적인 것으로 알려졌으나 TDZ이 multiple shoot 형성을 촉진하여 광범위한 식물 종의 캘러스로부터 shoot 원기 증식에 이용되었고 체세포배발생에서도 auxin계를 대용하여 더욱 높은 빈도로 유도할 수 있다고 하였다 (Malik and Saxena 1992; Murty et al. 1995; Casanova et al. 2004; Nontaswatsri and Fukai 2005). 또한 PAA는 *D. chinensis*의 잎절편체 유래 캘러스로부터 기관 발생을 유도하여 shoot 원기 증식에 이용되었다 (Jethwani and Kothari 1996). *D. gratianopol*의 캘러스로부터 shoot형성에 TDZ을 이용한 보고는 없지만 Table 2에서와 같이 TDZ이 패랭이꽃속 *D. gratianopol*에 효과적이고 1.0 mg/L TDZ과 0.5 mg/L PAA가 조합된 MS 재분화배지에서 87%의 높은 shoot 형성률을 보여 *D. gratianopol* 경우는 TDZ과 PAA가 매우 효과적임을 알 수 있었다. 초기 절편체에서 유래된 SF 캘러스는 TDZ과 PAA가 포함된 재분화배지에서 shoot가 형성될 수 있지만, 대량증식을 위해서는 현탁배양을 통해 다량의 균일한 세포괴를 얻는 것이 매우 중요하였으며 이들을 재분화가 가능한 캘러스로 유도하여 다량의 소식물체를 얻는 것이 바람직한 접근방법으로 판단되었다. 또한 잎과 줄기절편체를 PAA와 TDZ이 포함된 MS재분화배지에 치상했을때 shoot 원기가 관찰되진 않지만 적합한 배양조건을 찾아 캘러스의 형성 없이 절편체로부터 직접 shoot로 분화하게 할 수 있다면 유전적으로 안정된 소식물체를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

6-8개의 어린잎을 가진 기내 소식물체는 0.1 mg/L의 NAA가 첨가된 배지에서 4주간 배양하여 뿌리를 유도하였다 (Figure 1E). 뿌리가 유도된 재분화 식물체는 1주간의 순화과정을 통해 vermiculite와 perlite가 1:1로 혼합된 화분에 이식하여 토양에 활착시켰으며 화피와 꽃을 형성하였으며 야생형 *D. gratianopol*의 꽃과 비교했을 때 크기가 줄어드는 약간의 변이를 보였으나 전체적으로 큰 형태적 차이를 관찰할 수 없었다 (Figure 1F, 1G, 1H).

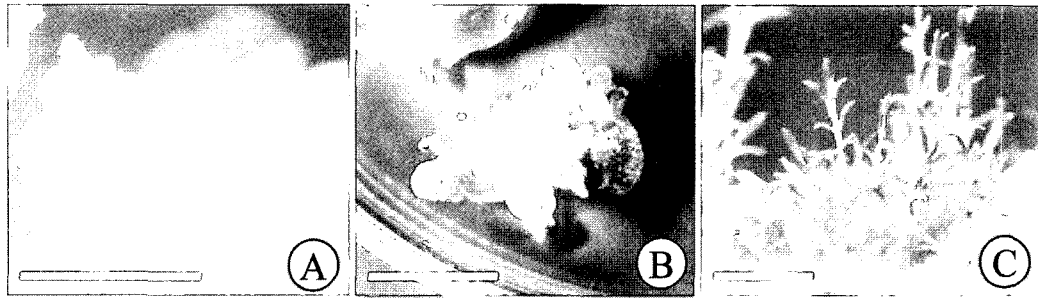


Figure 3. Adventitious shoot formation from the excised multiple shoot primordia of *D. gratianopol* on MS medium with 1.0 mg/L TDZ and 0.5 mg/L PAA. A, Multiple shoot primordia; B, Adventitious shoots from the excised primordia; C, Proliferated shoots. All bars = 10 mm.

재분화 능력이 있는 캘러스에서 형성된 녹색 정단 원기를 절단한 후 이들 절편체로부터 직접 부정아 (adventitious shoot)의 생성 여부를 조사하였다. 이들 녹색에 형성된 shoot 원기 절편체를 0.5 mg/L BAP와 1.0 또는 1.5 mg/L의 2,4-D가 조합처리된 MS 고체배지와 1.0 mg/L TDZ과 0.5 mg/L PAA가 조합된 MS 재분화배지에 치상하여 27°C 연속광 ($21.5 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 조건에서 배양한 결과 모든 배지에서 부정아가 형성되었으나 1.0 mg/L TDZ과 0.5 mg/L PAA가 조합된 MS 재분화배지에서 특히 부정아의 형성이 매우 양호하였고 이들로부터 다량의 shoot를 효율적으로 얻을 수 있었다 (Figure 3). Auxin과 cytokinin의 사용은 배양체의 탈분화 및 분화에 있어 필수적 요소이나 조직 절편체의 특성에 따라 반응이 다른 것은 몇 가지 요인이 관여하고 있기 때문이다. 그 하나는 식물체 부위별 내생호르몬의 종류 및 함량차이에 기인하며 이런 요인이 외부로부터 주어지는 배양요인과 작용하여 절편체의 기관발생과 분화에 2차적으로 영향을 주기 때문인 것으로 생각된다 (Jethwani and Kothari 1996; Yancheva et al, 1998). 카네이션 (*D. caryophyllus*)은 기내 재분화를 통한 multiple shoot의 증식과 절편체로부터 직접 부정아와 체세포배의 발생 등이 가능한 것으로 알려졌으며 재분화 능력이 있는 캘러스의 유도과 TDZ, PEG 6000과 casein hydrolysate를 이용하여 부정아를 절편체로부터 직접 형성하여 다량의 식물체 증식을 가능케 하였다 (Kallak et al. 1997; Yancheva et al, 1998; Nontaswatsri et al. 2002). 재분화 능력이 있는 캘러스로부터 기관발생과정에서 세포는 분화 양상에 따라 PODC (pre-organogenic determined cell)와 IODC (induced organogenic determined cell)로 구분이 가능할 수 있다. PODC의 경우는 배양절편 자체가 이미 기관발생의 잠재력을 갖고 있어 적합한 배양조건만 주면 캘러스의 형성 없이 조직으로부터 직접 shoot로 분화하게 될 수 있는 세포로서 PODC를 통한 shoot의 대량증식이 유전적으로 안정된 소식물체를 얻는 가장 바람직한 접근방법이다 (De Jong et al. 1993; Yancheva et al. 1998; Nontaswatsri et al. 2002).

TDZ과 PAA가 첨가된 MS배지와 27°C 연속광 ($21.5 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)조건은 *D. gratianopol*의 기내 shoot 원기 절편체로부터 직접 부정아의 형성을 가능케 하는 적합한 조건이라고 추정할 수 있었고 캘러스를 거친 조건의 식물체의 재분화에 비해서 훨씬 더 많은 수의 shoot를 얻어낼 수 있었다 (Jethwani and Kothari 1996). 또한 이들 shoot도 0.1 mg/L NAA가 첨가된 배지에서 뿌리를 내리고 순화과정을 거쳐 토양에 이식되어 정상식물체로 성장하였다.

본 연구를 통해 *D. gratianopol*의 재분화 능력이 있는 캘러스 유도와 shoot 정단 원기의 절편체의 이용은 직접 부정아의 형성과 부정아로부터 다량의 식물체 증식을 가능케 하였다.

적 요

패랭이꽃속 *Dianthus gratianopol* 잎절편체로부터 캘러스를 유기하여 표면에 광택이 있고 치밀하게 배열되고 연한 녹색의 shoot-forming 캘러스를 선별하였다. 유기된 캘러스를 잘게 자르고 1.0 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L BAP가 포함된 CP 액체배지에서 7일 간격으로 계대배양하여 균일한 SF형태의 조직이 치밀한 세포피를 얻을 수 있었고 이들 세포피를 1.0 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L BAP, 1.5 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L BAP의 MS고체배지에서 배양했을 때 재분화능력이 있는 캘러스를 유도할 수 있었다. 이들 캘러스는 1.0 mg/L TDZ과 0.5 mg/L PAA가 포함된 MS재분화배지에 치상하였더니 녹화되기 시작하여 배양 4주후부터는 다량의 shoot 원기가 형성되고 shoot 증식이 가능하였으며 평균 87%의 shoot 형성률을 보였다. 배양 9주후 절단된 shoot는 0.1 mg/L NAA가 첨가된 배지에서 뿌리를 형성하여 화뢰와 꽃을 갖고 있는 완전한 식물체로 재분화되었다.

또한 재분화 능력이 있는 캘러스 정단 원기를 절단한 절편체는 1.0 mg/L TDZ 과 0.5 mg/L PAA가 포함된 MS재분화 배지에서 직접 부정아를 형성하였고 이들 부정아로부터 다량의 shoot 증식이 가능하여 식물체를 효과적으로 얻을 수 있었다.

 사 사

이 논문은 2003년도 강원대학교 학술연구조성비로 연구되었습니다.

 인용문헌

- Casanova E, Valde's AE, Ferna'ndez B, Moysset L, Trillas MJ (2004) Levels and immunolocalization of endogenous cytokinins in thidiazuron-induced shoot organization in carnation. *J Plant Physiol* 161: 95-104
- Chang MY, Hong SW, Kim JC (2002) Plant regeneration from leaf explant-derived callus of *Dianthus gratianopol.* *J Basic Sci (KNU)* 13: 63-74
- Crouch NR, van Staden J (1993) In vitro culture of *Dianthus zeyheri* subsp. natalensis, a South African carnation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 35: 81-85
- de Oliveira AKD, Cañal MJ, Centeno ML, Feito I, Fernández B (1997) Endogenous plant growth regulators in carnation tissue cultures under different conditions of ventilation. *Plant Growth Reg* 22: 169-174
- Frey L, Janick J (1991) Organogenesis in carnation. *J Am Soc Hortic Sci* 116: 1108-1112
- Jethwani V, Kothari SL (1996) Phenylacetic acid induced organogenesis in cultured leaf segments of *Dianthus chinensis*. *Plant Cell Rep* 15: 869-872
- Kallak H, Reidla M, Hilpus I, Virumae K (1997) Effect of genotype, explant source and growth regulators on organogenesis in carnation callus. *Plant Cell Tiss Org Cult* 51: 127-135
- Kim JC, Lee EA (1996) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Dianthus superbus*. *Plant Cell Rep* 16: 18-21
- Kim MD, Kim JC, Jin CD, Lim CJ, Han TJ (1998) Plant regeneration from suspension-cultured cell clusters of *Arabidopsis thaliana*. *Kor J Plant Tiss Cult* 25: 195-200
- Malik KA, Saxena PK (1992) Thidiazuron induces high frequency shoot regeneration in intact seedlings of pea (*Pisum sativum*), Chickpea (*Cicer arietinum*) and lentil (*Lens Culinaris*). *Aust J Plant Physiol* 19: 85-90
- Miller RM, Kaul V, Hutchinson JF, Richards D (1991) Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus*.) from axillary bud explants. *Ann Bot* 67: 35-42
- Mohammed GH, Vidaver WE (1990) The influence of acclimatization treatment and plantlet morphology on early greenhouse performance of tissue cultured Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 19: 235-242
- Murty BNS, Murch S, Saxena PK (1992) Thidiazuron induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): Endogenous growth regulators levels and significance of cotyledons. *Physiol Plant* 94: 268-276
- Nakano M, Hoshino Y, Mii M (1996) Intergeneric somatic hybrid plantlets between *Dianthus barbatus* and *Gypsophila paniculata* obtained by electrofusion. *Theo Appl Genet* 92: 170-172
- Nimura M, Kato J, Mii M, Morioka M (2003) Unilateral compatibility and genotypic difference in crossability in interspecific hybridization between *Dianthus caryophyllus* L and *Dianthus japonicus* Thunb. *Theo Appl Genet* 106: 1164-1170
- Nontaswatsri C, Fukai S, Touma T, Goi M (2002) Comparison of adventitious shoot formation from node and leaf explants of various carnation (*Dianthus caryophyllus* L) cultivars. *J Hort Sci Biotech* 77: 520-525
- Nontaswatsri C, Fukai S (2005) Regenerative callus of *Dianthus* 'Telstar Scarlet' showing mixoploidy produce diploid plants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 83: 351-355
- Radojevic L, Nevena D, Petrovic J (1990) In vitro culture techniques for carnation breeding. *Acta Hortic* 280: 163-167
- Sparnaaij LD, Koehorst-van Putten HJJ (1990) Selection for early flowering in progenies of interspecific crosses of ten species in the genus *Dianthus*. *Euphytica* 50: 211-220
- Thakur M, Sharma D, Sharma S (2002) In vitro selection and regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) plants resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi. *Plant Cell Rep* 20: 825-828
- Villalobos V (1996) Floral differentiation in carnation (*Dianthus caryophyllus* L) from anthers cultivated in vitro. *Phyton Argentina*. 56: 71-75.
- Yadav MK, Gaur AK, Garg GK (2003) Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 72: 153-155
- Yantcheva A, Vlahova M, Atanassov A (1998) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L) *Plant Cell Rep* 18: 148-153

(접수일자 2005년 11월 9일, 수리일자 2005년 12월 9일)