

Original Article

Cryopreservation of *Chrysanthemum morifolium* cv. 'White ND' Shoot Tips using Encapsulation-Dehydration-Vitrification Method

Su Min Jeon and Chang Kil Kim*

Department of Horticulture, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

캡슐화-탈수화-유리화에 의한 국화 품종 '화이트 엔디' 신초의 초저온 동결보존

전수민 · 김창길*

¹ 경북대학교 농업생명과학대학 원예학과

Received: May 31 2014 / Revised: June 18 2014 / Accepted: June 24 2014

Abstract This study investigated the effects of cryopreserving *Chrysanthemum morifolium* cv. 'White ND' shoot tips for eliminating viroids. As a result, smaller shoot tips (2-3 LP, 1 mm) showed a better survival and regrowth than larger shoot tips (4-5 LP, 1.5 mm). The most effective vitrification solution for survival and regrowth was PVS3, which induced a high survival rate after 60 minutes of incubation. For a high efficiency, the best pre-treatment condition for vitrification was incubation in 88 mM sucrose for 24 h, 0.3M sucrose for 16 h, 0.5 M sucrose for 6 h, and 0.7 M sucrose for 3 h, in a descending order. The ploidy levels were the same in the mother plants and following cryopreservation, which confirmed the absence of any gene mutation.

Keywords: chrysanthemum, cryotherapy, PVS2, PVS3, vitrification

서론

국화(*Chrysanthemum morifolium*)는 우리나라뿐만 아니라 세계에서 절화, 분화 등으로 각광받고 있는 화훼작물로 경제성이 높은 화훼류 중에 하나이다. 많은 국화 품종에서 국화 왜화바이러스(Chrysanthemum stunt viroid, CSVd) 감염인해 수량 감소와 절화품질이 떨어지는 등 심각한 문제가 발생되고 있으며 국화에선 9가지 바이러스와 2가지 바이로이드에 감염성이 있다고 보고되고 있다(Verma et al., 2003). 국화 왜화 바이로이드는 *Pospiviroid* 속 *Pospiviroidae* 과에 속하며(Bouwen and Zaayen, 2003), 전세계적으로 국화가 재배되는 지역에서 식물체의 왜화를 발생 시킨다(OEPP/EPPO, 1997) (Tomassoli et al., 2004). 바이러스 중에서 가장 작은 크기의 바이로이드는 약제 방제가 어렵고, 이를 제거하기 위해 생장점 배양(Jeon et al., 2012), 저온처리(Savitri et al., 2013), 고온처리(Wang et al., 2008), 화학약품(Savitri et al., 2013) 처리 등 다양한 연구가 수행되어왔지만 바이로이드 제거까지는 많은 시간과 노력이 요구되며 그에 비해 바이로이드 제거 효율도 그리 높지 않았다.

최근 초저온 동결처리 방법은 고구마(Wang et al., 2008a, 2008b; Feng et al., 2011), 감자(Dhital et al., 2009), 마(Shin et al., 2013) 등 다양한 작물에서 장기보존의 한 수단으로 연구되어 왔다. 뿐만 아니라 이들 작물에서 기존 방법에 의해 제거가 어려웠던 몇몇 종류의 바이러스 제거가 가능하다고 하였다. 따라서 본 연구는 국화 왜화바이로이드를 보다 효과적으로 제거하기 위하여 초저온 동결처리를 통해 바이로이드를 제거하고 자 본 연구를 수행하였다. 먼저, 식물체 마다 초저온 동결처리에 적합한 조건이 상이므로 바이로이드를 제거하기 위해 국화 품종 '화이트 엔디' 초저온 동결처리 시 적합한

*Corresponding author: Chang Kil Kim
Tel: 82-53-950-5728; Fax: 82-53-950-5722
E-mail: cckim@knu.ac.kr/Abstract

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2014 Institute of Agricultural Science and Technology, Kyungpook National University

조건을 알아보고자 성장점의 크기, 전처리에 사용되는 sucrose의 농도 및 처리 시간, 유리화 용액의 종류 및 처리 시간 등에 관한 실험을 수행하였던 바 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료

경북 구미 화훼시험장에서 육성된 국화(*Chrysanthemum morifolium* cv. 'White ND')의 기내 유식물의 정아를 재료로 사용하였다. 신초의 정단 부분(상위 1.5 cm)을 88 mM sucrose, pH 5.8로 조정 후 agar 8 g/L 첨가된 기본 MS (Murashige and Skoog, 1962)배지에서 4주간 배양한 뒤 정아를 적출하여 초저온 동결처리에 사용하였으며, Lee et al.,(2011)의 방법을 응용하여 실험을 수행하였다.

Encapsulation

정아는 엽원기를 2~3매 포함시킨 크기(1 mm)와 엽원기를 4~5매 포함시킨 크기(1.5 mm) 두 가지로 나누어 실험하였다. 모체에서 정아를 적출하여 Ca²⁺-free MS 배지에 2%(w/v) Na-alginate, 88 mM sucrose 첨가된 bead solution에 침지시켜 bead solution과 정아를 함께 피펫팅하여 MS, 0.1 M CaCl₂, 88 mM sucrose 첨가된 encapsulation solution에 떨어뜨려 25분간 bead(크기 5 mm)를 안정화시켰다.

Dehydration

안정화된 bead는 MS, 88 mM sucrose, 0.5 mg/L casamino acid가 첨가된 solution에서 24시간 진탕배양 후 sucrose 농도를 0.3 M, 0.5 M, 0.7 M로 농도의 dehydration solution에 각각 16, 6, 3시간 진탕배양을 하였다.

Loading 및 Vitrification

Pre-incubation이 끝난 후 MS, 1.6 M sucrose, 2 M glycerol이 첨가된 loading buffer에 3시간 loading 한 다음 vitrification 처리시 MS 배지에 30%(w/v) glycerol, 15%(w/v) ethylene glycol, 15%(w/v) dimethyl sulphoxide(DMSO), 0.4 M sucrose가 첨가된 plant vitrification solution 2(PVS2)와 MS 배지에 50%(w/v) glycerol, 50%(w/v) sucrose가 첨가된 plant vitrification solution 3(PVS3)에 각각 30, 60, 90, 120분 처리하였다.

Cryopreservation 및 해동

Vitrification이 끝난 bead는 2 ml cryo-tube에 넣어 액체 질소에 1시간 동안 침지한 다음 38°C 항온수조에서 3분간 해동시킨다. 해동된 bead는 NH⁴⁺-free MS 배지에 1.2 M sucrose가 첨가된 washing buffer에서 20분간 침지 후 멸균된 여과지에 올려 물기를 제거하였다.

Post-culture 및 식물체 재생

물기가 제거된 bead는 NH⁴⁺-free MS 배지에 88 mM sucrose, agar 8 g/L, pH 5.8로 조정된 post-culture I 배지에 3일간 암배양 후 MS 배지에 88 mM sucrose, naphthalene acetic acid (NAA) 0.2 mg/L, kinetin 1.0 mg/L, agar 8 g/L, pH 5.8로 조정된 post-culture II 배지로 옮겨 명배양 하였고, 배양 4주 후 생존율 및 신초 재생율 등을 조사하였다.

Flow-cytometer

초저온 처리 후 재생된 식물체와 모본의 배수체 차이를 검정하기 위해 0.5 cm 크기의 잎을 nuclear extraction buffer 500 µl를 첨가하여 조직을 잘게 잘라준 다음 1분간 실온에서 처리 후 Röhren tube(3.5 ml)에 staining buffer 2 ml 넣고 CellTrics® disposable filter(Partec Co.)를 튜브에 장착 후 잎 조각과 buffer를 필터에 부어 준 다음 측정기계에(CyFlow-ploidy Analyser, Partec Co.) 튜브를 끼워 DNA양을 측정한다.

결과 및 고찰

초저온 동결처리 시 국화 'White ND'의 성장점 크기에 따른 생존율 및 재생율은 엽원기가 2~3매 포함된 1 mm 성장점이 엽원기 4~5매 포함된 1.5 mm 성장점보다 생존율과 신초 재생율을 모두 높았다(Table 1). 이러한 결과는 마늘에서 성장점 크기가 작을수록 생존율과 재생율이 높았다는 연구결과(Baek et al., 2003)와 동일하였다. 반면, 고구마에서 성장점의 크기와 생존율과의 사이에 연관성이 없다는 연구결과(Wang et al., 2008a; 2008b)와 신초 재생율 역시 성장점 크기가 클수록 높아진다고 보고한 결과(Wang et al., 2008b)와 상이하였다. 이는 초저온 동결 처리시 작물별 유전성에 따라 생존율 및 재생율에 미치는 영향이 조금씩 상이한 것이라 판단된다.

액체 질소에 처리하기 전단계인 vitrification 단계에서 사용

Table 1. Survival and regrowth percentage in *Chrysanthemum morifolium* shoot tips of different sizes subjected to cryopreservation

Shoot tip size	Total No. of cultures	Survival (ea)	Regrowth (ea)	Survival rate (%)	Regrowth rate (%)
1.0 mm with LP ¹⁾ 2-3	25	13a ²⁾	8a	52%	32%
1.5 mm with LP 4-5	25	9b	2b	36%	8%

¹⁾LP-leaf primordia.

²⁾Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, $P < 0.05$.

Table 2. Effect of PVS2, PVS3, and treatment duration on survival rate and shoot regrowth in cryopreservation of *Chrysanthemum morifolium* cv. 'White ND'

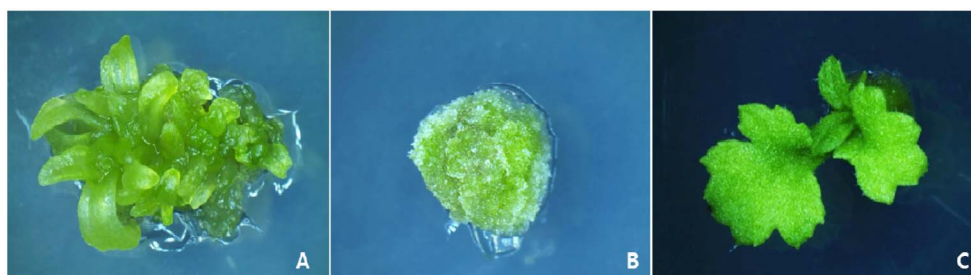
Treatment	Time (min.)	Survival (%)	Shoot regrowth (%)	Normal plants (%)	Abnormal plants (%)
Control ¹⁾	90	80.0a ²⁾ ± 0.0	48.0a ± 11.0	38.9	61.1
PVS2	30	88.0a ± 17.9	32.0ab ± 22.8	20.9	79.1
	60	28.0c ± 30.3	0.0	0	0
	90	12.0c ± 11.0	0.0	0	0
	120	8.0c ± 11.0	0.0	0	0
PVS3	30	80.0a ± 24.5	48.0a ± 22.8	38.3	61.7
	60	84.0a ± 8.9	32.0ab ± 22.8	79.2	20.8
	90	52.0b ± 11.0	16.0bc ± 16.7	100	0
	120	32.0bc ± 22.8	4.0c ± 8.9	0	100
Treatment (A)		*	*	*	
Time (B)		**	*	*	
A×B		**	*	*	

Values are mean of twenty-five replicate determinations (n=25) ± standard deviation.

Abbreviation: PVS2-plant vitrification solution 2; PVS3-plant vitrification solution 3.

¹⁾no cryotherapy.

²⁾Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, $P \leq 0.05$.

**Figure 1.** Abnormal and normal plants after cryopresavaiton of *Chrysanthemum morifolium* cv. 'White ND'. A:abnormal plant after using plant vitrification solution 2 (PVS2), B: non-shooting plant after using PVS2, and C: healthy normal plant from plant vitrification solution 3 (PVS3).

되는 PVS2, PVS3의 처리시간에 따른 생존율 및 신초 재생을 살펴보면(Table 2) PVS2 처리시간 별 생존율은 30분 처리에서 88%로 가장 높았고, 이는 고구마에서 PVS2에 1시간 처리 시 가장 높은 생존율(70%)을 보였다는 결과(Hirai et al., 2003)와 차이를 보였다. PVS2 60분 이상 처리에서는 신초가 재생 되지 않았으며(Figure 1B) PVS2에 사용되는 DMSO, Ethylene glycol 등 독성이 강한 물질에 장시간 노출되어 식물체 생존율에 영향을 미치는 것으로 보여지며, 재생된 신초의 대부분이 비정상 식물체로 재생되었고(Figure 1A), 초저온 동결처리 시 침투성 동결 보호제의 독성이 식물체 재생에 큰 문제가 된다고 보고된 내용(Fahy et al., 1984; Fahy et al., 1990; Fahy et al., 2004)과 상응하는 결과를 도출하였다. PVS3 처리에서 30분, 60분 처리 시 80%, 84%로 각각 높은 생존율을 나타내었고, 처리 시간에 반비례하여 처리시간이 길어 질수록 생존율이 낮아져 120분 처리시 32%의 비교적 낮은 생존율을 보였다. 신초 재생율 역시 PVS2와 PVS3 처리시 처리시간이 짧은 30분에서 각각 32%, 48%로 신초 재생율이 가장 높게 나왔고 처리 시간이 길어 질수록 신초 재생율이 낮아

으며, 재생된 신초의 정상 신초율과 비정상 신초율을 조사한 결과 PVS2 보다 PVS3 처리에서 정상 신초 발생율이 높았고, 국화(Kim et al., 2009)와 야생풀 꽃인 성진갯모리움(Barraco et al., 2011)에서 PVS2와 PVS3의 농도별 실험시 PVS3가 첨가된 solution에서 국화의 신초 생존율 및 재생율이 높았다는 결과와 동일하였다. 또한 국화 PVS3 90분 처리시 재생된 신초의 100%가 정상 신초(Figure 1C)로 재생되었으며 반면, PVS3 120분 처리시 재생된 신초는 모두 비정상 신초로 재생되었다. 신초 재생율과 정상 신초율을 비교하였을 때 PVS3 60분 처리 했을 때 생존율(79.2%)도 높은 것으로 나왔으며, Lee et al.(2011)이 보고한 국화에서 PVS3 90분 처리가 최적의 생존율을 나타낸다는 연구 결과와는 차이가 있었다. 신초의 초저온 동결 처리시 생존율 및 재생율의 각 처리별 효과를 살펴보면 vitrification solution 종류에 따른 효과는 유의하였으며, 처리 시간에 의한 효과는 고도로 유의함을 나타내었고 vitrification solution 종류와 처리 시간에 대한 효과 역시 고도로 유의함을 나타내었다.

또한, 보다 높은 정아의 생존율을 위해 vitrification solution

Table 3. Effect of PVS2, PVS3, and pre-treatment steps on survival rate and shoot regrowth in cryopreservation of *Chrysanthemum morifolium* cv. 'White ND'

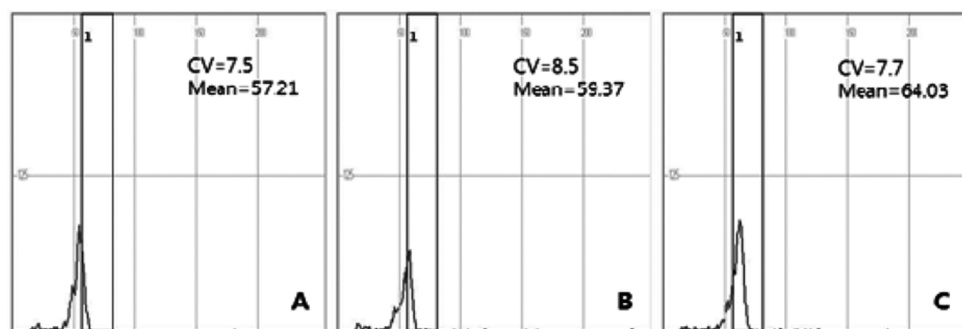
Cryo.	Treatment		Total No. of explants	No. of surviving explants	Survival rate (%)	No. of shoots	Shoot regrowth rate (%)
	Vit.	Dehy.					
LN	PVS2	step I ¹⁾	30	0	0	0	0
		step II ²⁾	26	5	19.2	1	3.8
	PVS3	step I	29	0	0	0	0
		step II	30	19	63.3	11	57.9
Control ³⁾	PVS2	step I	10	6	60	3	50
		step II	10	8	80	7	77.8
	PVS3	step I	10	5	50	2	40
		step II	10	10	100	7	70
Cryo. (A)				**		ns	
Vit. (B)				**		ns	
A×B				**		ns	
Dehy. (C)				**		ns	
A×C				*		ns	
B×C				**		ns	
A×B×C				*		ns	

Abbreviation: LN-liquid nitrogen; PVS2-plant vitrification solution 2; PVS3-plant vitrification solution 3; Cryo.-cryotherapy; Vit.-vitrification; Dehy.-dehydration.

¹⁾Step I, 3- step- dehydration by sucrose 88 mM (24 hours) 0.3 M (16 hours) 0.7 M (3 hours).

²⁾Step II, 4- step- dehydration by sucrose 88 mM (24 hours) 0.3 M (16 hours) 0.5 M (6 hours) 0.7 M (3 hours).

³⁾no cryotherapy.

**Figure 2.** Development of normal plant following cryo-treatment of *Chrysanthemum morifolium* cv. 'White ND' shoot tip using plant vitrification solution 3 (PVS3). Regrowth of cryopreserved shoot tip after 2 weeks (left), 4 weeks (middle) and 6 weeks (right).**Figure 3.** Comparison of ploidy levels in cryopreserved and mother plants of *Chrysanthemum morifolium* cv. 'White ND'. A: mother plant (no-cryopreserved), B: cryopreserved plant using plant vitrification solution 2 (PVS2), and C: cryopreserved plant using plant vitrification solution 3 (PVS3).

에 처리하기 전단계인 dehydration 단계의 효과를 알아보고자 단계별 실험으로 step I은 sucrose 88 mM에서 24시간 진탕배양 한 다음 sucrose 0.3 M에서 16시간 진탕배양 후 loading 단계 등 일련의 순서로 실험을 진행 진행하였고, step II는 sucrose 88 mM에서 24시간 진탕배양 후 sucrose 0.3 M에서 16시간, sucrose 0.5 M에서 6시간, sucrose 0.7 M에서 3시간 차례로 진탕배양 후 loading 단계 등 일련의 순서로 실험을 진행하였다. 그 결과 vitrification solution 종류나 액체질소처리 여부에 상관없이 sucrose 농도를 점진적으로 증가시켜 처리한 step II에서의 생존율과 신초 재생율이 상대적으로 높았고, 액체 질소 처리한 PVS2 처리에선 19.2% 생존율과 3.8% 신초 재생율을, PVS3 처리에선 63% 생존율과 36.7% 신초 재생율을 나타내었다(Table 3). 이는 국화의 초저온 처리시 sucrose 농도가 점진적으로 높아짐에 따라 식물체 생존율이 높아진다는 보고(Lee et al., 2011)와 같은 결과로 추후의 국화 초저온 동결 처리의 dehydration 단계에 적극적으로 이용 가능하리라 여겨진다. 재생된 신초 중 정상 식물체로 성장한(Figure 2) 식물체의 잎을 flow-cytometer를 통한 배수체 검정 결과(Figure 3) 모본과 비교하였을 때 염색체 수에 차이가 없는 것으로 보아 유전적 변이는 일어나지 않았으며 초저온 동결처리 후 재생된 식물체는 모본과 유전적으로 동일하다고 판단되었다.

요 약

본 실험은 국화의 바이로이드 제거에 이용되는 초저온처리 시 국화 품종 ‘White ND’을 적합한 처리조건을 확립하기 위해 초저온처리의 단계별 요인을 실험하였다. 그 결과 성장점의 크기는 1 mm(엽원기 2~3매 포함)에서 높은 생존율과 신초 재생율을 나타내었고, vitrification 처리시 PVS3가 효과적이었으며, 처리 시간은 60분 처리 하였을 때 높은 생존율 및 정상 신초 재생율을 보였다. 또한 vitrification을 위한 전처리 조건은 sucrose 농도를 88 mM 24시간, sucrose 0.3 M 16시간, sucrose 0.5 M 6시간, sucrose 0.7 M 3시간으로 처리하는 것이 초저온 처리 후 생존율 및 신초 재생율을 높이는데 효과적이었으며, 재생된 정상 식물체는 모본과 비교하여 ploidy level이 동일한 것으로 보아 식물체의 유전적 변이가 일어나지 않았다.

주요 추가어: 국화, 초저온처리, PVS2, PVS3, 유리화

References

- Bouwen I, van Zaayen A (2003) Chrysanthemum stunt viroid. In: *Viroids* (A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles, Js. Semancik, ed.), CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp. 218-223.
- Feng CH, Yin ZF, Ma YL, Zhang ZB, Chen L, Wang B, Li BQ, Huang YS, Wang QC (2011) Cryopreservation of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) and its pathogen eradication by cryotherapy. *Biotechnol Adv* 29: 84-93.
- Hirai D, Sakai A (2003) Simplified cryopreservation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Kam.] by optimizing condition for osmoprotection. *Plant Cell Rep* 21: 961-966.
- Fahy GM, MacFarlane DF, Angell CA, Meryman HT (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiol* 21: 407-426.
- Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Douglas MS, Meryman HT (1990) Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search molecular mechanisms. *Cryobiol* 27: 247-268.
- Fahy GM, Wolk B, Wu J, Paynter S (2004) Improved vitrification solution based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiol* 48: 22-35.
- Barraco G, Sylvestre I, Iapichino G, Engelmann F (2011) Cryopreservation of *Limonium serotinum* apical meristems from *in vitro* plantlets using droplet-vitrification. *Sci Hortic* 130: 309-313.
- Shin JH, Kang DK, Sohn JK (2013) Production of yam mosaic virus (YMV)-free *Dioscorea opposita* Plants by cryotherapy of shoot-tips. *Cryo Letters* 34: 149-157.
- Tomassoli L, Faggioli F, Zaccaria A, Caccia R, Albani M, Barba M (2004) Molecular diagnosis of *Chrysanthemum stunt viroid* for routine indexing. *Phytopathol Mediterr* 43: 285-288.
- Wang QC, Valkonen JPT (2008a) Efficient elimination of sweetpotato little leaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips. *Plant Pathol* 57: 338-347.
- Wang QC, Valkonen JPT (2008b) Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato by shoot tips culture and cryotherapy. *J Virol Methods* 154: 135-145.
- Wang QC, Cuellar WJ, Rajamäki ML, Hirata Y, Valkonen JPT (2008) Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Mol Plant Pathol* 9: 237-250.
- Dhital SP, Lim HT, Manandhar HK (2009) Elimination of potato virus (PLRV and PVY) by cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Hort Environ Biotechnol* 50: 233-239.
- Jeon SM, Savitri WD, Park KI, Chung MY, Kim CK (2012) Elimination of *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) from an viroid-infected chrysanthemum through shoot tip culture. *Flower Res J* 20: 218-222.
- Verma N, Sharma A, Ram R, Hallan V, Zaidi AA, Garg ID (2003) Detection, identification and incidence of *Chrysanthemum B carlavirus* in chrysanthemum in India. *Crop Prot* 22: 425-429.
- Savitri WD, Park KI, Jeon SM, Chung MY, Han JS, Kim CK (2013) Elimination of *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) from meristem tip culture combined with prolonged cold treatment. *Hort Environ Biotechnol* 54: 177-182.
- Lee YK, Park SU, Kim HH (2011) Cryopreservation of chrysanthemum shoot tips using the droplet-vitrification technique. *CNU J Agr Sci* 38: 227-233.