

딸기 조직배양 시 BA (benzyladenine) 처리에 따른 변이 발생 및 변이 연속성 검정

김혜진 · 최미자 · 이종남 · 서종택 · 김기덕 · 김윤희 · 홍수영 · 김수정 · 손황배 · 남정환

Occurrence and identification of genetic variation and variation continuity in strawberry tissue culture caused by benzyladenine treatment

Hye Jin Kim · Mi Ja Choi · Jong Nam Lee · Jong Taek Suh · Ki Deog Kim · Yul Ho Kim · Su Young Hong · Su Jeong Kim · Hwang Bae Sohn · Jeong Hwan Nam

Received: 29 January 2020 / Revised: 3 March 2020 / Accepted: 13 March 2020

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract This experiment study aimed to identify the continuous genetic variation caused by benzyladenine (BA) treatment in strawberry tissue culture. The ‘Goha’ cultivar was used and treated with different concentrations of BA (0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg·L⁻¹). Morphological and genetic variation tests were performed, and genetic continuity tests were performed for three years. The morphological variation induced by BA was distinctively high (10.5 ~ 20.0%) and the genetic variation was 7.0 ~ 15.0%, 1.8 ~ 10.0%, and 5.0% in the first, second, and third year of cultivation, respectively. The rate of genetic variation decreased with increasing cultivation years. In addition, genetic variation caused by BA 1.0 mg·L⁻¹ and BA 2.0 mg·L⁻¹ occurred in the first and second years of cultivation, whereas only BA 2.0 mg·L⁻¹ caused genetic variation in the third year of cultivation. Therefore, a concentration of less than 1.0 mg·L⁻¹ BA was used for the propagation of strawberry tissue culture plants, and it was necessary to identify their variation.

Keywords Benzyladenine, *Fragaria × ananassa*, Genetic variation, Morphological variation

서 언

딸기는 장미과(Rosaceae), 딸기속(Fragaria)의 다년생 작물로, 다양한 배수성을 지니고 있으며(Darnell et al. 2003), 현재 재배되고 있는 딸기는 대부분 8배체(2n=8x=56)이다. 이러한 재배종 딸기는 일반적으로 순종(true-to-type)의 식물체를 얻기 위해 전통적인 방법인 포복경(runner)을 통해 자묘를 증식해 왔다(Biswas et al. 2008).

최근 딸기 우량묘의 생산 및 보급을 위하여 조직배양기술을 이용하고 있지만, 재배 면적에 비해 우량묘 보급률은 매우 저조한 상황이다. 딸기 재배 시 조직배양묘의 이용은 관행방법으로 증식된 묘를 이용하는 것에 비해 딸기 식물체의 과일 생산량, 주당 자묘수 및 주당 잎수 등이 더 많은 장점을 가지고 있지만(Karhu and Hakala 2002; Zebrowska et al. 2003), 형태적, 수량적 변이가 발생할 수도 있다(Graham 2005).

딸기 조직배양묘의 생산은 생장점 배양을 이용하는 것이 보통이지만, 생장점 배양을 통한 증식률이 매우 낮아(Lee et al. 2010), 이를 극복하기 위하여 여러 학자들에 의해 증식을 향상시키는 연구(Ashrafuzzaman et al. 2013; Boxus 1999; Debnath 2003; Kim et al. 2019; Marandi et al. 2011)가 진행되었다. 지금까지 딸기 조직배양묘의 대량증식에는 주로 benzyladenine (BA)를 사용해 왔으나, 유전적 형질 또는 BA 농도에 따라 발생할 수 있는 변이에 관한 연구는 매우 부족한 실정이다. 조직배양에 의한 변이는 여러가지 요인(식물호르몬 종류 및 농도, 계대배양 횟수 등)에 의해 발생하는데(Faedi et al. 2002), 주로 시토키닌의 처리에 의해 야기되며(Anderson et al. 1991; Kane et al. 1992), Kim et al. (2019)은 몇가지 시토키닌 중 BA의 처리가 유전적 변이 발생이 가장 적은 것으로 보

H. J. Kim (✉) · M. J. Choi · J. N. Lee · J. T. Suh · K. D. Kim · Y. H. Kim · S. Y. Hong · S. J. Kim · H. B. Sohn · J. H. Nam
국립식량과학원 고령지농업연구소
(Highland Agricultural Research Institute, National Institute of Crop Science, Pyeongchang 25342, Korea)
e-mail: heijin79@korea.kr

고하였다. 이러한 변이는 형태적 증상인 왜화, 엽색변이, multi-apexing, 줄기 합생(stem fasciation), 초세 변화 및 과일모양 등으로 나타나며(Boxus 1999; Graham 2005; Karp 1995; Sansavini et al. 1990), 이러한 형태적 증상은 후생적 변이(epigenetic variation)가 많아 후대에 자연적으로 사라지기도 하나(Koruza and Jeleska 1993), 유전자 삽입 및 결손에 의한 유전적 변이(Karp 1995; Sansavini et al. 1990)가 발생할 경우 후대에 지속적으로 영향을 미칠 수 있다.

따라서 본 연구는 딸기 조직배양에서 대량증식을 위해 주로 사용하는 BA를 농도 별로 처리하여, BA의 농도 별 처리에 따른 형태적 변이 및 유전적 변이의 발생에 대해 비교하고, 유전적 변이 연속성을 검정하고자 실시하였다.

재료 및 방법

공시 품종 및 BA 처리

본 연구는 사계성(ever-bearing) 딸기 ‘고하’를 공시품종으로 사용하였다. ‘고하’의 포복경의 선단으로부터 생장점을 적출하여 배지(1/3MS 무기염, 30 g·L⁻¹ sucrose, 8 g·L⁻¹ plant agar, pH5.6~5.8)에 치상하여 6주간 배양하여 기내 유식물체를 얻었다. 기내 유식물체의 뿌리와 잎을 제거한 후 BA가 첨가된 배지에 치상하여 6주간 배양 후, 기본 배지(MS 무기염 (Murashige and Skoog 1962), 30 g·L⁻¹ sucrose, 8 g·L⁻¹ plant agar, pH5.6~5.8)에 4주 간격으로 3회 계대배양하여 하나의 온전한 조직배양묘(whole plant)를 생산하였다.

본 실험에서 사용한 BA의 농도는 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg·L⁻¹로 4수준으로 처리하였으며, 각 처리 별로 indole-3-butyric acid (IBA)를 0.1 mg·L⁻¹의 농도로 혼합 처리하였다. BA 처리 배지는 MS 무기염에 30 g·L⁻¹의 sucrose를 넣어 완전히 녹인 후 BA를 농도 별로 첨가하였으며, 배지 pH를 5.6~5.8로 조정한 후 8 g·L⁻¹의 plant agar를 넣어 만들었다. 본 실험에 사용한 모든 배지는 121°C, 1.5기압의 고압멸균기에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

온실 순화 및 변이 검정

BA의 농도 별 처리 후 증식된 유식물체는 온실에서 딸기 전용상토 ‘푸르미’(서울바이오(주))를 충진한 흑색비닐포트(3치, 접은 윗 지름 13 cm × 높이 6.8 cm × 펼친 윗 직경 9 cm)에 순화하였다. 순화 후 일주일동안 50% 차광막으로 차광하고, 상대습도를 80%이상으로 유지한 후 서서히 제거하고, 6주간 육묘 후 본포에 정식하였다. 본포에 정식 후 딸기전용양액인 PBG액(Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente, Netherlands)(Sonneveld and Straver 1994)을 전기전도도(EC, electrical conductivity) 0.8 dS·m⁻¹로 맞추어 1일 4~5회 관수하며 재배하였다.

BA 처리묘는 전 재배기간동안 형태적, 유전적 변이 검정을 실시하였으며, 형태적 변이 검정은 화방 출뢰성(불연속 출뢰 또는 불출뢰), 비정상 과일 출현, 초세 등을 기준으로 선발하였고, 선발된 변이체를 simple sequence repeat (SSR) 마커를 이용하여 유전적 변이 검정을 실시하였다.

유전적 변이 검정을 위한 genomic DNA는 형태적 변이체의 어린 잎을 채취하여 NucleoSpin®Plant II Kit (Macherey-Nagel, Germany)를 사용하여 추출하였다. 추출한 DNA는 분광 광도계(DS-11+ Spectrophotometer, DeNovix, USA)로 DNA 양을 측정하여 10 ng·μL⁻¹로 정량한 후 분석에 이용하였다. 유전적 변이 검정에 이용한 SSR 마커는 Table 1과 같으며, 4개의 마커 정보를 수집하여 정방향에 5-FAM (Bioneer, Korea)으로 형광 표지한 프라이머를 제작하여 사용하였다.

PCR 반응물은 20 ng의 genomic DNA, 10 μL의 2X TOPsimple™ PreMix-nTaq (Enzymomics, Korea), 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 1 μL (10 pM·μL⁻¹)씩 넣고 증류수를 첨가하여 전체 부피를 20 μL로 조절하였다. PCR (Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems, USA) 증폭 조건은 95°C에서 15분 동안 변성시킨 후, 95°C에서 30초, 65°C에서 30초(반복 당 1°C씩 감소), 72°C에서 30초간 25회 반복한 후, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초간 30회 반복한 후 72°C에서 5분간 처리하였다.

PCR이 완료된 후 5 μL의 증폭산물을 1.5% (w/v) agarose gel에서 전기영동하여 증폭 여부를 확인한 후 PCR 증폭 산물 0.5 μL (50 ng·μL⁻¹), GeneScan 500 LIZ dye Size Standard (Applied

Table 1 The primer sequence, repeat motif, and annealing temperature of the four SSR markers used to analyze genetic variation in ‘Goha’ cultivars treated with BA

Marker ^a	Forward primer	Reverse primer	Repeat motif	Tm (°C)
FxaHGA02P13	F:ccaggcctgtgtctgtactact	R:cccatttccccaaatctaacaat	-	59
FxaAGA21F11	F:caattcacaatggctgatgacgat	R:gcaactcagacatatatttggaggag	-	59
EMFv104	F:tggaaacattctacatagccaaa	R:cagacgagtcctctatgtgc	(AG) ₁₇	53
EMFvi136	F:gagcctgctacgcttttctatg	R:cctctgattcgatgatttgc	(TC) Direct	54

^aSSR markers have been cited in Govan et al. (2008) and Honjo et al. (2011)

Table 2 The number of new shoots of strawberry plants treated with BA using tissue culture

BA treatment ² (mg·L ⁻¹)	No. of new shoots (ea/plant)	No. of planting (ea)	No. of morphological variants (ea)	Morphological variation rate (%)
Control ³	1.0±0.0 ^x	20	0	0c ^w
BA 0.5	24.2±0.5	24	4	16.7ab
BA 1.0	29.5±0.5	57	6	10.5b
BA 2.0	27.3±0.6	20	4	20.0a

²BA treated with 0.1 mg·L⁻¹ of IBA

³Not treated with BA and IBA

^xmean±standard deviation

^wMean separation within columns by Duncan's multiple range test (p<0.05)

biosystems, USA) 0.5 µL와 Hi-Di Formamide (Applied biosystems, USA) 9 µL를 혼합하여 95°C에서 3분간 변성시킨 후 4°C에서 1분간 안정화 시켰다. 변성시킨 PCR 산물은 자동염기서열 분석기(DNA Analyzer 3730xl, Applied Biosystems, USA)를 활용하여 전기영동한 다음 Gene Mapper 프로그램(Applied Biosystems, USA)을 사용하여 마커 별로 분석하여 유전적 변이 검정을 실시하였다.

변이 연속성 검정

변이 연속성 검정은 총 3년에 걸쳐 실시하였으며, 재배 1년 차에 BA 처리묘에서 형태적, 유전적 변이체를 선발한 후, 선발된 개체를 관행육묘법을 통해 자모를 증식하여 삼목육묘한 후, 당해년도 11월 중순에 저장고에서 휴면타파 후 차년도 4월에 정식하며 후대에 변이가 연속되어 나타나는지에 대해 유전적 변이 검정을 실시하였다. 모든 형태적, 유전적 변이 검정은 위에 기술한 바와 동일하게 진행하였다.

결과 및 고찰

딸기 조직배양 시 BA의 농도 별 처리에 따른 신초 증식을 비교한 결과는 Table 2와 같다. BA를 첨가하지 않은 대조는 신초의 발생이 전혀 없는 것에 비해, BA 0.5 mg·L⁻¹ 처리구는 주당 24.2개, BA 1.0 mg·L⁻¹ 처리구는 주당 29.5개, 그리고 BA 2.0 mg·L⁻¹ 처리구는 주당 27.3개의 신초가 발생하여, 무처리에 비해 매우 높은 신초 증식률을 보였다. BA는 여러 작물에서 조직배양 시 기내 증식을 향상시키기 위해 주로 사용되는 식물호르몬으로, 지금까지 딸기 조직배양에 관한 연구에서 많이 사용되어(Ahmad 2013; Kim et al. 2019; Marcotirigiano et al. 1984; Żebrowska et al. 2003), 딸기 조직배양묘 증식에 긍정적인 영향을 미치는 호르몬으로 알려졌다. 또한, 본 실험에서도 BA를 처리함으로써 24.2~29.5배로 향상되는 것을 확인하였다.

본 실험에서 BA 무처리묘 20주, BA 0.5 mg·L⁻¹ 처리묘 24주, BA 1.0 mg·L⁻¹ 처리묘 57주, BA 2.0 mg·L⁻¹ 처리묘 20주를

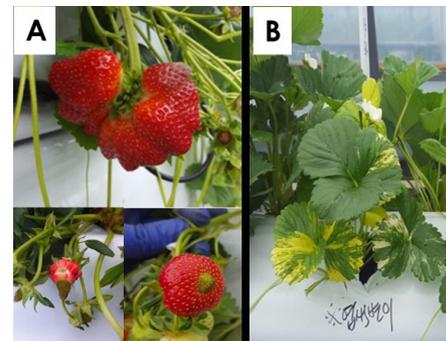


Fig. 1 Morphological variants of strawberry 'Goha' cultivars treated with BA. (A) Abnormal fruits. (B) Plant variation with variegated leaves

정식하여(Table 2), BA 처리 농도 별로 변이 검정을 실시하였다.

형태적 변이 검정 결과 (Table 2), 형태적 변이체는 무처리에서 0개체로 0%, BA 0.5 mg·L⁻¹ 처리에서 4개체로 16.7%, BA 1.0 mg·L⁻¹ 처리에서 6개체로 10.5%, BA 2.0 mg·L⁻¹ 처리에서 4개체로 20.0%가 발생하였다. 대부분의 형태적 변이체는 과일 모양이 Figure 1A와 같이 닭벼슬 모양 또는 과탁만 비대하는 등의 모양을 가진 과일이 지속적으로 생산되는 특징을 보였다. 또한 Figure 1B와 같이 딸기 묘의 잎 색이 얼룩무늬인 엽색변이체가 발생하였으며, 엽색변이체의 경우 영양생장이 매우 불량하고, 대조에 비해 초세가 매우 약한 것이 특징이었다.

지금까지 딸기 조직배양 연구는 주로 증식률 향상에 초점을 맞추어 진행되었으며(Ashrafuzzaman et al. 2013; Boxus 1999; Marandi et al. 2011), 조직배양 시 발생할 수 있는 변이에 관한 연구는 매우 미비한 실정이다. 딸기 조직배양 변이 검정 방법은 표현형적, 세포학적, 생화학적 방법 및 유전적 방법 등 여러가지가 있는데(Kaeppler et al. 2000), 가장 기본적이고 필수적인 방법이 원종 식물과의 형태적 특성을 비교, 구분하는 방법인 표현형적(형태적) 방법이다. 본 연구에서 엽색 변이와 비정상 과일의 출현 등의 형태적 변이가 나타났는데, 이것은 딸기 조직배양 시 주로 나타나는 형태적 변이(Cameron and Hancock 1986; Irkaeva and Matveena 1997; Sansavini et al. 1990; Swartz et al. 1981)와 유사한 특징을 가지고 있다.

선발된 형태적 변이체를 Table 1의 SSR 마커를 이용하여 유전적 변이 검정을 실시하였다. 총 14개의 형태적 변이체 중 재배 1년 차에는 7개체의 유전적 변이체를 확인하였고, 재배 2년 차에는 3개체, 재배 3년차에는 1개체의 유전적 변이체를 확인하였다. BA 농도 별 유전적 변이율의 변화는 (Table 3), BA 0.5 mg·L⁻¹ 처리묘는 재배 1년차에 유전적 변이체는 발생하지 않아 유전적 변이율이 0.0%였다. BA 1.0 mg·L⁻¹ 처리묘는 재배 1년차에 유전적 변이율이 7.0%, 재배 2년차에 1.8%, 재배 3년차에 0.0%로 재배연수가 길어짐에 따라 점

차 유전적 변이율이 줄어들었다. BA 2.0 mg·L⁻¹ 처리묘는 재배 1년차에 유전적 변이율이 15.0%, 재배 2년차에 10.0%, 재배 3년차에 5.0%로 재배 연수가 길어짐에 따라 유전적 변이율이 줄어들었다(Fig. 2). BA 0.0~2.0 mg·L⁻¹까지 모든 처리구에서 재배 연수가 길어짐에 따라 유전적 변이율이 낮아지는 경향을 보였으며, BA 저농도(0.0 mg·L⁻¹ 과 0.5 mg·L⁻¹) 처리에서는 유전적 변이체가 발생하지 않은 반면에, 상대적으로 고농도인 BA 1.0 mg·L⁻¹과 2.0 mg·L⁻¹ 처리묘는 유전적 변이율이 매우 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구

Table 3 The number of genetic variants and the rate of genetic variation in strawberry plants treated with BA via tissue culture

BA treatment ^z (mg·L ⁻¹)	No. of genetic variants (ea)			Genetic variation rate (%)		
	1 st year	2 nd year	3 rd year	1 st year	2 nd year	3 rd year
Control ^y	0	-	-	0c ^x	-	-
BA 0.5	0	-	-	0c	-	-
BA 1.0	4	1	0	7.0b	1.8b	0b
BA 2.0	3	2	1	15.0a	10.0a	5.0a

^zBA treated with 0.1 mg·L⁻¹ of IBA

^yNot treated BA and IBA

^xMean separation within columns by Duncan's multiple range test (p<0.05)

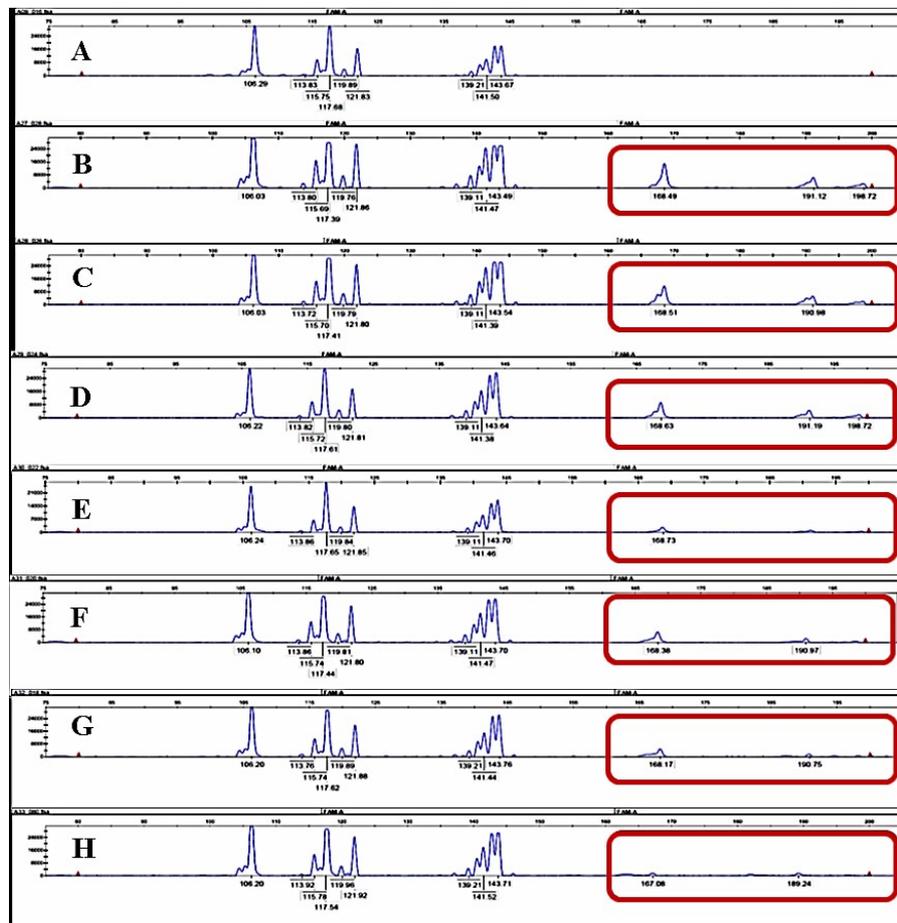


Fig. 2 Peak of alleles of genetic variants with FxaAGA21F11 in ‘Goha’ tissue culture treated with BA in the first year of cultivation. (A) Control, (B-E) BA 1.0 mg·L⁻¹, and (F-H) BA 2.0 mg·L⁻¹

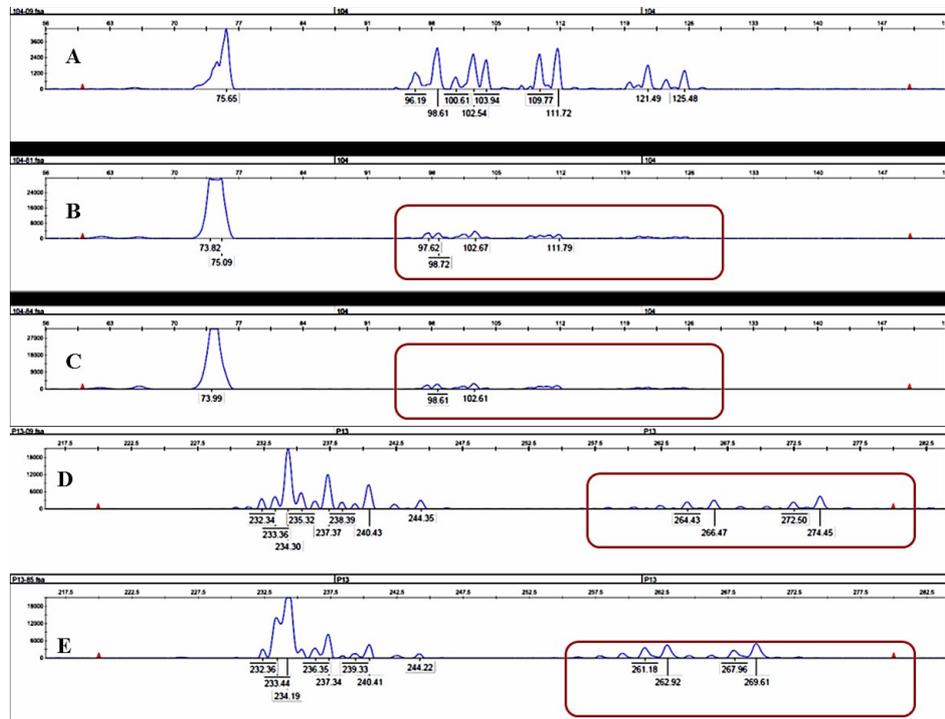


Fig. 3 A peak of alleles of genetic variants in ‘Goha’ tissue culture treated with BA in the second year of cultivation. (A) Control detected with EMFv104, (B) BA 1.0 detected with EMFv104, (C) BA 2.0 mg·L⁻¹ detected with EMFv104, (D) Control detected with FxaHGA02P13, and (E) BA 2.0 mg·L⁻¹ detected with FxaHGA02P13

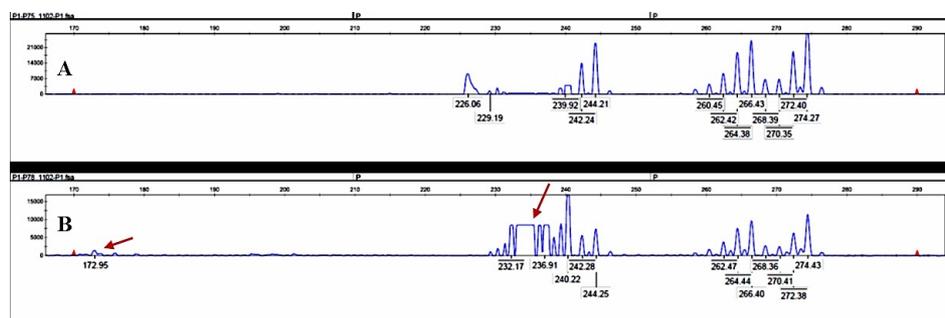


Fig. 4 A peak of alleles of genetic variants with FxaHGA02P13 in ‘Goha’ tissue culture treated with BA in the third year of cultivation. (A) Control, and (B) BA 2.0 mg·L⁻¹

에서 재배 연수가 길어질수록 유전적 변이체가 줄어드는 이유는 Koruza and Jeleska (1993)이 말한 바와 같이 대부분의 형태적 변이가 후생적 변이(epigenetic variation)로 후대에 유전되지 않기 때문인 것으로 판단된다.

재배 1년차의 유전적 변이체의 SSR 분석 결과는 Figure 3과 같다. ‘FxaAGA21F11’ 마커에서 ‘고하’ 대조는 106 bp, 115 bp, 117 bp, 119 bp, 121 bp, 139 bp, 141 bp 및 143 bp의 대립유전자를 보였으나(Fig. 2A), BA 1.0 mg·L⁻¹ 처리에서 발생한 변이체(Fig. 2B~E)와 BA 2.0 mg·L⁻¹ 처리에서 발생한 변이체(Fig. 2F~H)는 168 bp, 191 bp, 198 bp의 추가적인 대립유전자를 보였다. 재배 2년차의 유전적 변이체의 변이 검정 결과는 Figure 3과 같다. ‘EMFv104’ 마커에서 ‘고하’ 대조는 76 bp, 96 bp, 98 bp, 100 bp, 102 bp, 104 bp, 110 bp, 112 bp, 121 bp 및 125 bp의 대립유전자를 보였으나(Fig. 3A), BA 1.0 mg·L⁻¹ 처리에

서 발생한 변이체는 76 bp를 제외한 나머지 대립유전자가 명확히 나타나지 않는 특징을 보였다(Fig. 3B와 3C). ‘FxaHGA02P13’ 마커에서 ‘고하’ 대조는 232 bp, 234 bp, 235 bp, 237 bp, 240 bp, 244 bp, 264 bp, 266 bp, 272 bp 및 274 bp의 대립유전자를 보였으나(Fig. 3D), BA 2.0 mg·L⁻¹ 처리에서 발생한 변이체는 대조의 264 bp, 266 bp, 272 bp 및 274 bp의 대립유전자는 결손되었고, 216 bp, 263 bp, 268 bp 및 270 bp의 대립유전자는 삽입되었다. 재배 3년차의 유전적 변이체의 변이 검정 결과는 Figure 4와 같다. ‘FxaHGA02P13’ 마커에서 ‘고하’ 대조는 226 bp, 229 bp, 240 bp, 242 bp, 244 bp, 260 bp, 262 bp, 264 bp, 266 bp, 268 bp, 270 bp, 272 bp 및 274 bp의 대립유전자를 보였으나(Fig. 4A), BA 2.0 mg·L⁻¹ 처리에서 발생한 변이체는 226 bp와 229 bp의 대립유전자는 결손되었고, 173 bp, 232 bp, 234 bp 및 237 bp의 대립유전자는 삽입된 것을 확인하였다(Fig. 4B).

Kim et al. (2019)은 딸기 조직배양묘의 증식 시 CPPU나 TDZ에 비해 BA가 증식률이 높고, 변이 발생이 적은 호르몬이라고 보고하였다. 본 실험에서도 0.5 ~ 1.0mg·L⁻¹의 저농도 BA 처리 시 변이 발생이 없고 증식률이 향상되는 결과를 보였다 (Table 2와 Table 3). 뿐만 아니라 BA 처리 시 발생하는 형태적 변이체는 대부분이 후생적 변이임을 확인하였고, 2.0 mg·L⁻¹ 처리에서 일부 개체가 유전적 변이체임을 확인하였다 (Table 3).

지금까지의 딸기 조직배양묘 연구는 대부분 증식률 향상에 초점이 맞추어져 있었고 (Ashrafuzzaman et al. 2013; Boxus 1999; Marandi et al. 2011), 몇몇 연구에서 호르몬 처리 후 변이 검정을 실시하였다. 그 중 Naing et al. (2019)는 kinetin 0.5 mg·L⁻¹를 처리한 딸기 조직배양묘를 flow cytometry와 random amplified polymorphic DNA (RAPD) 방법으로 변이 검정을 실시하였고, Keiko et al. (2003)는 BA 0.5 mg·L⁻¹를 ‘Hokowase’ 품종에 처리했을 때 잎의 변이 발생 비율이 증가하여 BA 0.125 mg·L⁻¹를 처리함으로써 증식률은 비슷하고 변이 발생을 줄였다고 보고한 바 있다. 이를 종합해 볼 때 딸기는 호르몬의 종류 및 농도뿐만 아니라 품종의 유전자형에 따라 유전적 변이체의 발생이 상이할 수 있으므로 반드시 품종에 따른 변이 발생 및 검정을 실시해야 할 것이다.

본 연구의 결과를 활용하여 딸기 조직배양묘를 생산할 경우 적정 농도의 BA를 처리하여 증식률을 향상시키고, 생산된 조직배양묘는 반드시 변이 검정을 통해 유전적으로 변이가 없는 개체만 선별, 증식해서 보급함으로써, 딸기 보급묘 생산의 단계를 거치는 동안 하나의 유전적 변이체가 최소 수천 배 이상 증식되어 나타날 수 있는 경제적 손실을 줄일 수 있으며, 딸기 조직배양묘의 보다 안정적인 생산이 가능할 것으로 판단된다.

적 요

본 실험은 딸기 조직배양 시 BA 처리에 따른 변이 발생 및 변이 연속성을 확인하고자 실시하였다. 본 실험에 사용된 공시 품종은 ‘고하’이며, 본 실험에 사용한 BA 농도는 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 mg·L⁻¹로 처리하였다. 변이는 형태적, 유전적 검정을 실시하였으며, 변이 연속성 검정은 3년간 실시하였다. BA 처리 시 형태적 변이는 10.5 ~ 20.0%로 매우 높게 나타났으나, 유전적 변이는 재배 1년차에 7.0 ~ 15.0%, 재배 2년차에는 1.8 ~ 10.0%, 재배 3년차에는 5.0%로 재배연수가 길어짐에 따라 유전적 변이 발생률이 낮아졌다. 뿐만 아니라 재배 1년차와 2년차에는 BA 1.0 mg·L⁻¹과 BA 2.0 mg·L⁻¹에서 유전적 변이가 발생한 반면, 재배 3년차에는 BA 2.0 mg·L⁻¹에서만 유전적 변이가 발생하였다. 따라서 딸기 조직배양묘의 증식을 위해서 BA는 1.0 mg·L⁻¹미만으로 처리하고, 반드시 변이 검정 후 보급하는 것이 바람직하다고 판단되었다.

사 사

본 연구는 2017년도 농촌진흥청 연구사업 (세부과제명 : 수출 유망품종 조직배양묘 안정생산 기술개발, 과제번호 : PJ01186301) 및 농촌진흥청 국립식량과학원 전문연구원 과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

References

- Ahmad SS (2013) In vitro shoot proliferation of strawberry using stem plantlet explants derived from meristem culture. Widyariset 16:473-480 (Abstr.)
- Anderson G, Lewis-Smith AC, Chamberlain M, Smith SM (1991) Variation in organization and copy number of ribosomal RNA genes in *Petunia hybrida* somaclones. Biologia Plantarum 33:206-210
- Ashrafuzzaman M, Faisal SM, Yadav D, Khanam D, Raihan F (2013) Micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa*) through runner culture. Bangladesh J. Agril. Res. 38:467-472
- Biswas MK, Islam R, Hossain M (2008) Micropropagation and field evaluation of strawberry in Bangladesh. J. Agric. Technol. 4:167-182
- Boxus P (1999) Micropropagation of strawberry via axillary shoot proliferation. In: Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology. Part III. Plant propagation in vitro. Hall RD (ed.). Humana Press Inc., Totowa NJ 111:103-114
- Cameron JS and Hancock JF (1986) Enhanced vigor in vegetative progeny of micropropagated strawberry plants. HortScience 21:1225-1226
- Darnell R, Cantliffe D, Kirschbaum D, Chandler C (2003) The physiology of flowering in strawberry. Hort. Rev. 28:325-349
- Debnath SC (2003) Micropropagation of small fruits. In: Jain SM, Ishii K (eds.). Micropropagation of woody trees and fruits. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Germany. pp.465-506
- Faedi W, Mourgues F, Rosati C (2002) Strawberry breeding and varieties: situation and perspectives. Acta Hort. 567:51-59
- Govan GL, Simpson DW, Johnson AW, Tobutt KR, Sargent DJ (2008) A reliable multiplexed microsatellite set for genotyping *Fragaria* and its use in a survey of 60 *F. × ananassa* cultivars. Mol. Breeding 22:649-661
- Graham J (2005) *Fragaria* strawberry. In: Litz R (ed.). Biotechnology of fruit and nut crop. Biotechnology in Agriculture Series No 29, CAB International. Wallingford, UK, pp.456-474
- Honjo M, Nunome T, Kataoka S, Yano T, Yamazaki H, Hamano M, Yui S, Morishita M (2011) Strawberry cultivar identification based on hypervariable SSR markers. Breeding Sci. 61:420-425
- Irkava NM and Matveeva TV (1997) Response of strawberry (*Fragaria vesca* L.) strains to cytokinin in vitro. (Russian with English abstract) Genetika 33:495-500
- Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Mol. Biol. 43:179-188

- Kane EJ, Wilson AJ, Chourey PS (1992) Mitochondrial genome variability in *Sorghum* cell culture protoclones. *Theor. Appl. Genet.* 83:799-806
- Karhu S, Hakala K (2002) Micropropagation of strawberry on the field. *Acta Hort.* 2:182 (Abstr.)
- Karp A (1995) Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85:295-302
- Keiko O, Shigeru A, Hiroshi A (2003) Effect of cytokinin on strawberry [*Fragaria*] plantlets micropropagated by axillary buds. *Bull Nara Perfect Agric Exp Stat.* 34:15-24
- Kim HJ, Lee JN, Choi MJ, Suh JT (2019) Comparison of in vitro propagation and occurrence of morphological and genetic variation in strawberry tissue culture with various plant hormone treatments. *J Plant Biotechnol.* 46:106-113
- Koruza B and Jeleska S (1993) Influence of meristem culture and virus elimination on phenotypical modifications of grapevine (*Vitis vinifera* L., cv. Refosk). *Vitis* 32:59-60
- Lee JN, Kim HJ, Kim KD, Kwon YS, Im JS, Lim HT, Yeoung YR (2010) In vitro mass propagation and economic effects of bioreactor culture in ever-bearing strawberry 'Goha'. *Hort. Sci. Technol.* 28:845-849
- Marcotirigiano M, Swartz HJ, Gray SE, Tokaricky D, Popenoe J (1984) The effect of benzylaminopurine on the in vitro multiplication rate and subsequent field performance of tissue culture propagation strawberry plant. *Adv. Strawberry Prod.* 3:23-25
- Marandi JR, Naseri L, Mohseniazar M, Hajitagiloo R, Marhamati MR (2011) Investigation on interaction effect of benzyladenine and chitosan on in vitro proliferation of strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Selva). *Agricultural Biotechnology* 10:27-34 (Abstr.)
- Murashige T and Skoog F (1962) A Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15:473-497
- Naing AH, Kim SH, Chung MY, Park SK, Kim CK (2019) In vitro propagation method for production of morphologically and genetically stable plants of different strawberry cultivars. *Plant Methods* 15:36
- Sansavini S, Rosati P, Gaggioli D, Toshi MF (1990) Inheritance and stability of somaclonal variation in micropropagated strawberry. *Acta Hort.* 280:375-384
- Sonneveld C and Straver N (1994) Nutrient solutions for vegetables and flowers grown in water or substrates, (tenth edition). Proefstation voor Tuinbouw onder glas te Naaldwijk, The Netherlands, Series Voedingsoplossingen Glastuinbouw No.8: 45pp
- Swartz HJ, Galletta GJ, Zimmerman RH (1981). Field performance and phenotypic stability of tissue culture-propagated strawberries. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 106:667-673
- Żebrowska JI, Czernaś J, Gawroński J, Horyński JA (2003) Suitability of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) micro-plants to the field cultivation. *Food Agri. Env.* 1:190-193