

## 캘러스 유기와 식물체 재분화를 이용한 무의 기내 대량증식

김유경 · 모숙연 · 최수빈 · 박한용

### *In vitro* micropropagation of radish (*Raphanus sativus* L.) using callus induction and plant regeneration

You Kyoung Kim · Sug Youn Mo · Su Bin Choi · Han Yong Park

Received: 28 May 2023 / Revised: 22 June 2023 / Accepted: 22 June 2023 / Published: 6 September 2023  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Radish (*Raphanus sativus* L.), a root vegetable grown worldwide, is consumed in several ways. In the cross between parental lines to produce F1 seeds of radish, the problem of low purity may arise because of pollen contamination. Therefore, we aimed to establish conditions for callus induction and regeneration so that *in vitro* cultured plants could be used for the propagation of stock seeds. The most effective hormone combination containing various concentrations of 2,4-D, TDZ, and kinetin was selected for callus induction using radish hypocotyl, and the induced calli were transferred to two types of hormone media to investigate the optimal conditions for shoot regeneration of the callus. The combination of 1 mg/L 2,4-D + 0.05 mg/L kin was the most effective for callus induction of RA2 and RA10, 1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L kin + 0.025 mg/L TDZ of RA4, and 1 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L kin of RA30. Shoot regeneration of the RA4 callus occurred in both shoot regeneration media, but the frequency was much higher in the 5H+1B medium (1 mg/L NAA + 0.1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IPA + 0.02 mg/L GA3 + 2 mg/L zeatin + 1 mg/L BA). For the *in vitro* micropropagation of radish, the conditions selected in this study can assist in the propagation and maintenance of stock seeds to produce F1 seeds.

**Keywords** Radish (*Raphanus sativus* L.), callus induction, plant regeneration

Y. K. Kim · S. Y. Mo · S. B. Choi · H. Y. Park (✉)  
세종대학교 바이오산업자원공학과  
(Department of Bioresource Engineering, Sejong University,  
Seoul 05006, Korea)  
e-mail: hypark@sejong.ac.kr

### 서론

무(*Raphanus sativus* L.)는 배추과(*Brassicaceae*)에 속하는 뿌리채소로, 절임, 건조, 생으로 섭취하는 등의 방법으로 소비되고 있는 경제적으로 중요한 작물 중 하나이다. 무 종자는 국내 채소종자 생산량의 47%를 차지하며 국내에서 가장 많이 생산되고 있고 국내 채소종자 매출의 12%를 차지하고 있으며 수출 종자 매출의 13%를 차지할 만큼 경제적 가치가 매우 큰 원예작물이다(Korean Seed Association, 2022a, b).

현재 우리나라에서 시중에 판매되고 있는 무는 대부분이 F1 품종으로, F1 품종을 생산하기 위해서는 양친 계통인 원종을 유지하는 것이 매우 중요하다. 하지만 무는 자가불화합성(Self-incompatibility, SI)을 나타내기 때문에 자가수정이 어렵고, 이를 타파하기 위해 직접 뇌수분을 하거나 CO<sub>2</sub>를 처리하는 등의 노력이 필요하다(Case et al. 1998; Nakanishi et al. 1969; Nakanishi and Hinata 1973). 뿐만 아니라, 뇌수분을 하는 과정에서 다른 종류의 꽃가루의 혼입으로 인해 발생할 수 있는 유전적 오염은 계통의 순도를 크게 떨어뜨릴 수 있다는 문제점이 있다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해 조직배양 기술을 이용해 무를 대량증식할 수 있다.

조직배양 기술은 식물 세포의 전형성능(totipotency)을 이용한 것으로, 이는 식물 세포가 분열, 분화하여 세포 전체 식물 또는 완전한 식물체를 형성할 수 있는 능력이다(LaRue 1936). 식물 세포의 전형성능을 이용하면 통제할 수 있는 무균 환경에서 계절에 상관없이 식물의 세포와 조직을 성장 또는 증식시킬 수 있으며, 고품질의 무병주를 빠른 시간 안에 대량생산할 수 있다는 장점이 있다(Chandra et al. 2010). 또한 최근 많이 이용되고 있는 유전자 교정 기술을 통한 형질전환체를 얻기 위해서는 조직배양 기술이 반드시 동반되어야 하기 때문에, 그 중요성이 더욱 강조되고 있다(Lin and Zhang

2005). 조직배양 기술을 통한 대량증식 방법은 크게 캘러스 (callus) 유기 및 재분화와 식물 조직을 이용한 direct shoot 유기(생장점, shoot-tip 등) 방법이 있다. 이 과정에서 사용되는 식물 조직의 종류(배축, 자엽, 잎, 마디 등)와 호르몬의 종류와 농도는 조직의 재분화 능력에 크게 영향을 미친다(Daud et al. 2015; Khehra and Mathias 1992; Narasimhulu and Chopra 1988). 캘러스 배양 또는 shoot-tip 배양으로 재분화된 shoot, 즉 기내배양을 통해 얻은 소식물체를 자연 환경으로 바로 옮기면 온도, 습도 등에 적응하지 못해 생존율이 떨어지기 때문에, 자연 환경에 적응할 수 있게 만들어주는 순화 과정이 필요하다(Chandra et al. 2010).

본 연구에서는 무의 기내 대량증식 조건을 구명하기 위해 다양한 호르몬의 종류와 농도에 따른 캘러스 유기 및 재분화 조건을 확립하는 것을 목표로 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 종자 소독

캘러스 유기와 재분화를 위한 재료로 북지계인 RA2, RA4, RA30, RA10 (F2)이 사용되었다. 종자가 담긴 conical tube에 세제 한 방울을 넣고 흔들어 거품을 낸 뒤, 거품이 없어질 때까지 수돗물로 세척하였다. 수돗물을 버린 후 75% ethanol을 넣고 20초 동안 흔들어 표면살균한 뒤, 클린벤치 내에서 시판중인 락스(NaOCl)를 멸균수에 희석한 0.2% NaOCl로 15분 전처리하였다. 그 후, 후처리로 1% NaOCl을 10분 진공처리하였고, 멸균수로 5회 수세한 후 30분간 침지시켰다. 소독한 종자는 식물생장조절제를 첨가하지 않은 agar 0.75% 반고체 설탕배지(pH 5.8, test tube)에 1립씩 파종하여  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 2,500 lux, 명암주기가 16/8 hr인 배양실에서 발아시켰다.

### 캘러스 유기

식물생장조절제의 종류와 농도에 따른 무 캘러스 형성률을 조사하기 위해, MS (Murashige and Skoog 1962) 배지(3% sucrose, 0.35% agar, 0.175% gelrite,  $90 \times 15$  mm petri dish)에 2,4-D (0, 0.5, 1 mg/L), kinetin (0, 0.05, 0.1, 0.2 mg/L), TDZ (0, 0.025, 0.05, 0.1 mg/L)을 혼합 처리한 호르몬 배지를 사용하였다. 발아 후 4일된 유식물체의 하배축을 2-4 mm로 잘라 절편체로 사용하였고, 절편체를 각 배지에 치상한 후 3주간 배양하였다. 배양 조건은  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 2,500 lux, 명암주기 16/8 hr로 하였고, 배양 3주 후 캘러스 형성률 및 특성(색, 양, 질) 등을 조사하였다. 캘러스의 양(크기별)은 1(가장 작은 것)~5(가장 큰 것)로 가시적으로 평가하였고, 캘러스의 질은 예비 실험 결과를 바탕으로 재분화 가능성이 낮은 캘러스(색이 하얗고 불투명하며 세포가 터진 듯한 모양)를 +로, 재분화 가

능성이 높은 캘러스(색이 초록색에 가깝고 투명하며 작은 세포들이 모여있는 것과 비슷한 모양)를 ++++로 평가하였다 (Fig. 1).

### Shoot 재분화

유도된 캘러스의 shoot 재분화를 위해, 하배축 절단면에서 형성된 callus를 잘라 shoot 재분화 배지에 치상하였다. Shoot 재분화 배지는 Hegazi와 Matsubara(1992)의 원형질체 재분화 배지를 참고하여 MS 배지(3% sucrose, 0.35% agar, 0.175% gelrite,  $90 \times 15$  mm petri dish)에 5H+1B (1 mg/L NAA + 0.1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IPA + 0.02 mg/L GA<sub>3</sub> + 2 mg/L zeatin + 1 mg/L BA) 또는 5H+0.1T (1 mg/L NAA + 0.1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IPA + 0.02 mg/L GA<sub>3</sub> + 2 mg/L zeatin + 0.1 mg/L TDZ)을 첨가한 배지를 사용하였고, 1개의 petri dish에 7개의 calli를 치상하였다.  $25^\circ\text{C}$ 에서 4주간 배양한 후, 재분화 정도(shoot, root 재분화)를 조사하였다. 배양 조건은  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 2,500 lux, 명암주기 16/8 hr로 하였고, 4주간 배양 후 재분화 정도(shoot, root 재분화)를 조사하였다.

### 발근 및 순화

Shoot 재분화 배지에서 발생한 shoot는 개별로 분리하여 1 mg/L IBA가 첨가된 발근배지(MS, 3% sucrose, 0.8% agar, 400 ml 유리배양병)로 계대배양하였다. 뿌리가 형성된 소식물체는 5,000 lux를 30일 동안 처리한 후, 배양병에서 꺼내 뿌리에 묻은 배지를 제거하고 미온수로 뿌리를 씻어주었다. 그 후, 소식물체를 엔도산(살균제) 500배액에 담갔다 뺀 후 엔도산 250배액을 섞은 멸균 원예상토에 심어주었으며 습도 유지를 위해 투명한 비닐 봉투를 씌워주었다. 이식된 소식물체는  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 5,000 lux, 명암주기 16/8 hr의 배양실에서 2주간 배양 후 봉투를 제거하였고, 봉투 제거 일주일 후 온실로 이동하여 재배되었다.

### 데이터 분석

수집된 데이터를 이용한 통계 분석은 SPSS 프로그램의 Duncan test를 이용하여 수행하였고, 통계적 유의성 검정을 위한 유의수준은 0.05로 하였다.

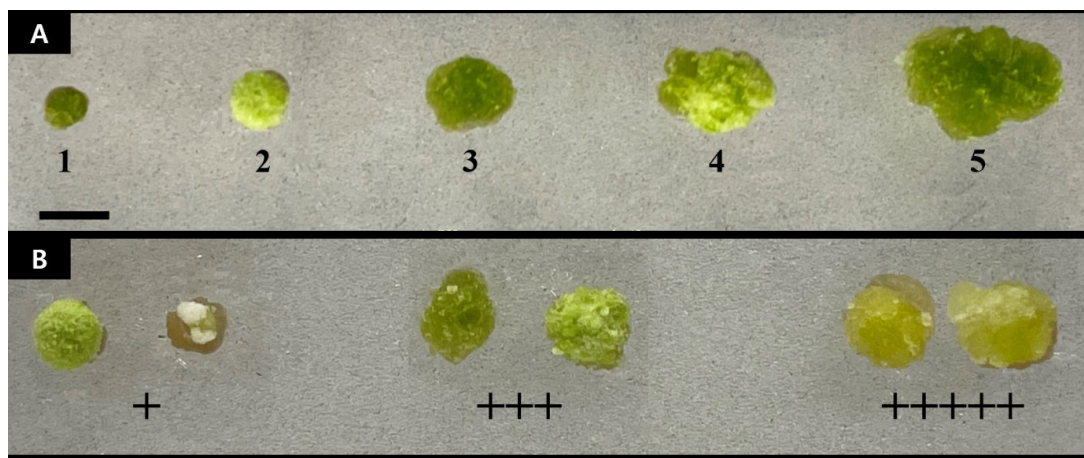
## 결과 및 고찰

### 호르몬 종류와 농도에 따른 캘러스 유기

RA2 계통에서는 2,4-D를 첨가하지 않은 처리구에 비해 2,4-D를 첨가한 처리구에서 캘러스의 형성률이 유의하게 증

**Table 1** Analysis of variation for effect of growth regulators on callus induction from *R. sativus* L.

Line	Factors	Df	MS	F-value	P-value
RA2	D	2	2,181.250	18.586	**
	K	3	845.139	7.201	**
	T	3	415.509	3.540	*
	D * K	6	678.472	5.781	**
	D * T	6	412.731	3.517	**
	K * T	9	215.509	1.836	ns
	D * K * T	18	191.435	1.631	ns
RA4	D	2	94.653	2.698	ns
	K	3	50.505	1.439	ns
	T	3	31.332	0.893	ns
	D * K	6	24.922	0.710	ns
	D * T	6	30.731	0.876	ns
	K * T	9	62.828	1.791	ns
	D * K * T	18	50.962	1.452	ns
RA10	D	2	1,684.028	6.929	**
	K	3	113.889	0.469	ns
	T	3	1,230.556	5.063	**
	D * K	6	578.472	2.380	*
	D * T	6	428.472	1.763	ns
	K * T	9	541.667	2.229	*
	D * K * T	18	430.324	1.770	*
RA30	D	2	459.028	25.423	**
	K	3	39.583	2.192	ns
	T	3	122.917	6.808	**
	D * K	6	114.583	6.346	**
	D * T	6	56.250	3.115	**
	K * T	9	76.620	4.244	**
	D * K * T	18	104.398	5.782	**



**Fig 1** Criteria for assessing degree of quantity and quality of callus. (A) Degree of quantity was evaluated from 1 to 5. Bar = 5 mm; (B) Quality was evaluated from + to +++++

가하였다(Table 1). 2,4-D의 농도가 증가할수록 캘러스의 형성률이 유의하게 증가하였고 캘러스의 양이 증가하였으며, 품질이 좋은(연두색) 캘러스가 더 많이 형성되었다(Table 2). 또한 2,4-D의 농도가 증가할수록 뿌리 재분화가 유의하게

감소하였는데, 이는 저농도의 auxin이 뿌리 형성을 유도한 반면 고농도의 auxin이 캘러스의 형성을 유도하였다는 보고와 일치한다(Afshari et al. 2011). Cytokinin이 첨가되지 않은 처리구에서 캘러스 유기가 효과적이었지만, TDZ을 0.1

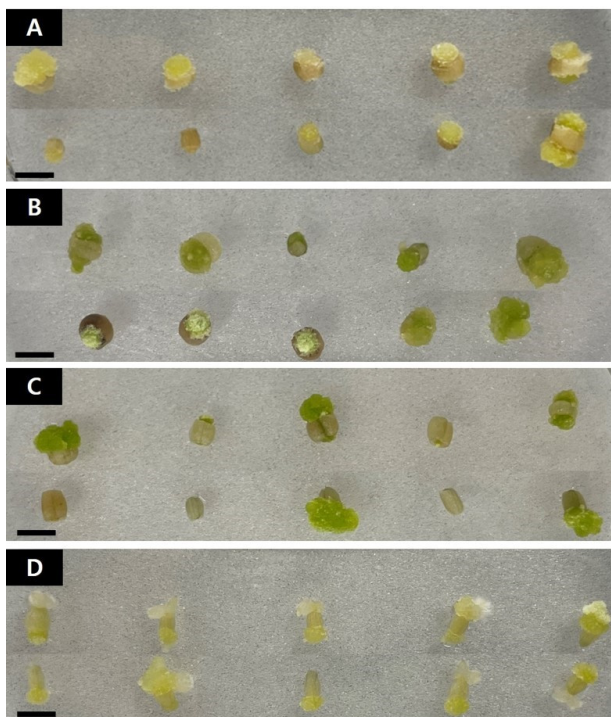
**Table 2** Effect of different hormone concentration and combination on callus induction from hypocotyl of *R. sativus* L. RA2

	2,4-D (mg/L)		0				0.5			1.0			
	TDZ (mg/L)		Kinetin (mg/L)				Kinetin (mg/L)			Kinetin (mg/L)			
			0	0.05	0.1	0.2	0	0.05	0.1	0.2	0	0.05	0.1
Formation (%)	0	93.3abc <sup>z</sup>	93.3abc	93.3abc	93.3abc	90.0abc	86.7abc	90.0abc	90.0abc	100a	100a	100a	100a
	0.025	76.7bc	36.7d	90.0abc	83.3abc	100a	93.3abc	100a	100a	93.3abc	93.3abc	80.0abc	86.7abc
	0.05	73.3c	53.3d	83.3abc	90.0abc	93.3abc	100a	100a	96.7ab	96.7ab	80.0abc	90.0abc	96.7ab
	0.1	86.7abc	96.7ab	96.7ab	93.3abc	100a	100a	93.3abc	100a	100a	100a	90.0abc	96.7ab
Degree of quantity	0	1.27	1.36	1.27	1.82	1.19	1.05	1.00	1.05	1.58	1.88	2.33	1.71
	0.025	1.24	1.00	1.33	1.42	1.33	1.41	1.29	1.75	1.14	1.32	1.28	1.30
	0.05	1.25	1.20	1.26	1.05	1.36	1.25	1.79	1.70	1.65	1.39	1.38	1.74
	0.1	1.10	1.09	1.30	1.09	1.58	1.67	1.50	1.21	1.63	1.29	1.24	1.52
Quality	0	+++	+++	+	++	+++	+	+	++	+++	++++	++++	+++
	0.025	++	+	++	++	+++	+++	+++	++++	++	+++	+++	++
	0.05	+	+	++	++	++	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+++
	0.1	++	++	++	++	++	++++	+++	++	+++	++	++	+++

Data are from 3 replicates of 10 explants each.

<sup>z</sup>Means followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test at 5% level.

Degree of quantity: 1 (small)~5 (big); Quality: + (bad)~++++ (good)



**Fig 2** High-quality calli formed on the edges of hypocotyl of *R. sativus* L. bars = 5 mm. (A) calli of RA2 on MS medium + 1.0 mg/L 2,4-D + 0.05 mg/L kin; (B) calli of RA4 on MS medium + 1.0 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L kin + 0.025 mg/L TDZ medium; (C) calli of RA10 on MS medium + 1.0 mg/L 2,4-D + 0.05 mg/L TDZ; (D) calli of RA30 on MS medium + 1.0 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L kin

mg/L로 첨가했을 때 또는 kinetin 농도가 증가했을 때에도 캘러스 유기가 효과적이었다. 캘러스의 형성률이 100%였던 14개 조합 중 캘러스의 양은 1.0 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L Kin 배지에서 2.3으로 가장 많았지만 품질이 좋은 캘러스 뿐만 아

니라 하얗게 부푼 캘러스도 함께 형성되었는데, 이러한 형태의 캘러스는 건강해보이지 않고 마치 세포가 터진 듯한 모양을 나타내며 새로운 세포나 기관을 만들어내지 못할 것으로 추정되었다. 따라서 캘러스의 양이 두 번째로 많고(1.9) 연두색의 캘러스만이 형성된 1.0 mg/L 2,4-D + 0.05 mg/L Kin 조합이 캘러스 유기에 가장 좋은 배지로 나타나 캘러스 증식을 위한 계대배양 배지로 사용하였다(Fig. 2A).

RA4 계통은 호르몬의 종류와 농도에 대한 형성률에서 통계적 유의차가 나타나지 않았지만(Table 1), 2,4-D 농도가 증가할수록 뿌리 재분화가 유의하게 감소하였다. 40개 조합에서 모두 캘러스가 형성되어 평균 캘러스 형성률이 가장 높았지만(Table 3), 48개 호르몬 조합 배지에서 전체적으로 조직이 갈변되는 현상이 나타났고 심한 경우에는 절단면에서 형성된 캘러스까지 갈변되며 고사하기도 하였다. 캘러스 형성률이 100%이고, 캘러스의 양이 많은 10개 조합(1.5 이상)에 포함되며 품질이 좋은(+++ 이상) 7개 조합 중에서도 1.0 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L Kin + 0.025 mg/L TDZ 조합의 배지에서 캘러스의 양이 가장 많고(2.0), 품질이 좋은(연두색) 캘러스가 형성되어 RA4의 캘러스 유기를 위해 가장 효과적인 것으로 나타났으며 이 조합의 배지를 계대배양 배지로 선정하였다(Fig. 2B).

RA10 계통은 2,4-D와 kinetin의 농도가 증가할수록 캘러스 형성률이 유의하게 증가했고, 1 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L TDZ, 0.1 mg/L Kin 농도에서 뿌리 재분화가 유의하게 증가하였다. TDZ의 농도에 따른 형성률에서는 유의차가 없었지만, TDZ와 2,4-D 또는 kinetin을 함께 처리했을 때에는 캘러스 형성률이 유의하게 증가했다(Table 1). 2,4-D가 첨가되지 않은 배지에서는 조직이 약간씩 갈변되면서 캘러스가 아주 작게 형성되었지만, 농도가 증가할수록 형성되는 캘러스의 양이 많아

**Table 3** Effect of different hormone concentration and combination on callus induction from hypocotyl of *R. sativus* L. RA4

2,4-D (mg/L)		0				0.5				1.0			
Formation (%)	TDZ (mg/L)	Kinetin (mg/L)				Kinetin (mg/L)				Kinetin (mg/L)			
		0	0.05	0.1	0.2	0	0.05	0.1	0.2	0	0.05	0.1	0.2
Formation (%)	0	96.7	100	100	93.3	100	100	96.7	100	100	100	100	100
	0.025	100	73.3	100	100	100	96.7	96.7	100	100	100	100	100
	0.05	96.7	100	96.7	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0.1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Degree of quantity	0	1.09	1.21	1.29	1.35	1.13	1.42	1.09	1.21	1.33	1.50	1.58	1.63
	0.025	1.38	1.00	1.33	1.42	1.67	1.48	1.22	1.25	1.54	1.42	1.38	2.04
	0.05	1.28	1.13	1.17	1.04	1.33	1.58	1.67	1.58	1.42	1.46	1.50	1.38
	0.1	1.00	1.29	1.17	1.21	1.75	1.38	1.46	1.38	1.42	1.63	1.54	1.75
Quality	0	++	++	++	+++	++	++	+	+++	++	+++	+++	++
	0.025	++	+	++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
	0.05	+	+	++	++	++	+++	+++	++	++	+++	++	++
	0.1	+	++	++	++	++	+	++	++	++	+++	+++	++

Data are from 3 replicates of 10 explants each.  
Degree of quantity: 1 (small)~5 (big); Quality: + (bad)~+++++ (good)

**Table 4** Effect of different hormone concentration and combination on callus induction from hypocotyl of *R. sativus* L. RA10

2,4-D (mg/L)		0				0.5				1.0			
Formation (%)	TDZ (mg/L)	Kinetin (mg/L)				Kinetin (mg/L)				Kinetin (mg/L)			
		0	0.05	0.1	0.2	0	0.05	0.1	0.2	0	0.05	0.1	0.2
Formation (%)	0	70.0abcde <sup>z</sup>	90.0abcd	90.0abcd	83.3abcd	70.0abcde	60.0de	90.0abcd	60.0de	83.3abcd	86.7abcd	90.0abcd	100a
	0.025	86.7abcd	46.7e	80.0abcd	100a	73.3abcde	83.3abcd	83.3abcd	100a	70.0abcde	80.0abcd	83.3abcd	93.3abc
	0.05	80.0abcd	46.7e	76.7abcde	96.7ab	63.3cde	76.7abcde	83.3abcd	100a	93.3abc	83.3abcd	100a	80.0abcd
	0.1	80.0abcd	63.3cde	70.0abcde	80.0abcd	93.3abc	100a	66.7bcde	86.7abcd	93.3abc	96.7ab	93.3abc	96.7ab
Degree of quantity	0	1.40	1.14	1.19	1.05	1.13	1.00	1.00	1.33	1.00	1.57	1.81	1.67
	0.025	1.10	1.00	1.39	1.21	1.00	1.00	1.11	1.04	1.00	1.00	1.00	1.14
	0.05	1.28	1.00	1.12	1.17	1.15	1.06	1.37	1.29	1.50	1.16	1.71	1.28
	0.1	1.00	1.23	1.07	1.17	1.09	1.67	1.07	1.00	1.23	1.43	1.18	1.43
Quality	0	+	++	+	++	+	+	++	+	+	++	+++	+++
	0.025	+	+	++	++	+	++	+	++	+	+	++	++
	0.05	++	+	++	++	+	++	++	+++	++++	++	+++	++
	0.1	++	++	+	++	++	+++	+	+	++	+++	++	++

Data are from 3 replicates of 10 explants each.  
<sup>z</sup>Means followed by the same letter are not significantly different according to Duncan’s Multiple Range Test at 5% level.  
Degree of quantity: 1 (small)~5(big); Quality: + (bad)~+++++ (good)

졌고 품질이 좋은(연두색) 캘러스의 비율이 증가하였다 (Table 4). 캘러스 형성률이 가장 높지는 않았지만(93.3%), 품질이 가장 좋은(++++) 캘러스가 형성된 1.0 mg/L 2,4-D+0.05 mg/L Kin 조합의 배지가 RA10의 캘러스 유기를 위해 가장 효과적인 것으로 나타나 이를 캘러스 증식을 위한 계대배양 배지로 선정하였다(Fig. 2C).

RA30 계통의 경우 2,4-D 농도가 증가할수록 캘러스 형성률이 유의하게 증가했고(Table 1), 0.5 mg/L 2,4-D 첨가시 뿌

리 재분화율이 유의하게 증가하였다. Kinetin이 첨가되지 않았을 때 캘러스 유기가 효과적이었지만, 0.1 mg/L 이상의 kinetin이 첨가되었을 때에도 캘러스 유기에 효과적이었다. TDZ 농도에 따른 형성률에서는 유의차가 없었지만, TDZ와 2,4-D 또는 kinetin을 함께 처리했을 때에는 캘러스 형성률이 유의하게 증가했다. 2,4-D의 농도가 증가할수록 품질이 좋은(연두색) 캘러스들이 더 많이 형성되었다(Table 5). 품질이 가장 좋은(++++) 캘러스가 형성된 2개의 조합(1.0 mg/L

**Table 5** Effect of different hormone concentration and combination on callus induction from hypocotyl of *R. sativus* L. RA30

2,4-D (mg/L)		0				0.5				1.0			
TDZ (mg/L)		Kinetin (mg/L)				Kinetin (mg/L)				Kinetin (mg/L)			
		0	0.05	0.1	0.2	0	0.05	0.1	0.2	0	0.05	0.1	0.2
Formation (%)	0	96.7a <sup>z</sup>	86.7b	86.7b	86.7b	100a	100a	96.7a	96.7a	100a	100a	100a	100a
	0.025	100a	66.7c	100a	96.7a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a	100a
	0.05	93.3ab	100a	96.7a	100a	100a	86.7b	96.7a	100a	100a	96.7a	100a	100a
	0.1	93.3ab	96.7a	100a	100a	100a	100a	96.7a	93.3ab	100a	100a	100a	100a
Degree of quantity	0	1.30	1.25	1.05	1.19	1.17	1.46	1.09	1.43	1.67	1.75	1.79	1.54
	0.025	1.42	1.00	1.50	1.43	1.21	1.38	1.33	1.54	1.25	1.67	1.96	1.54
	0.05	1.32	1.38	1.61	1.46	1.29	1.10	1.57	1.58	1.38	1.26	1.79	1.54
	0.1	1.41	1.17	1.88	1.29	1.54	1.58	1.17	1.32	1.46	1.67	1.21	1.71
Quality	0	++	++	++	++	+	++	++	++	+	++	+++	++++
	0.025	+++	+	+++	++	++	++	++	+++	++++	+++	++	+++
	0.05	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	++
	0.1	+	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	++	+++

Data are from 3 replicates of 10 explants each.

<sup>z</sup>Means followed by the same letter are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test at 5% level.

Degree of quantity: 1(small) ~ 5(big); Quality: +(bad) ~ ++++(good)

2,4-D+0.2 mg/L Kin, 1.0 mg/L 2,4-D+0.025 mg/L TDZ)에서는 형성률이 모두 100%였지만, 캘러스의 양은 1.0 mg/L 2,4-D+0.2 mg/L Kin 조합에서 1.54로 더 많았기 때문에 이 조합이 RA30의 캘러스 유기에 효과적인 것으로 나타나 캘러스 증식을 위한 계대배양 배지로 선정하였다(Fig. 2D).

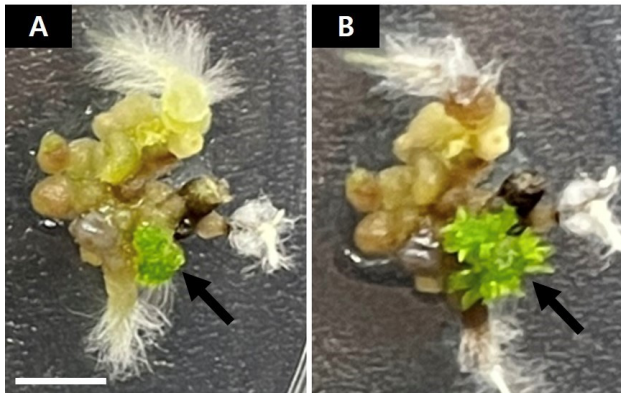
위의 네 계통을 이용한 캘러스 유기 결과, 무 계통별로 호르몬 종류와 농도에 따른 반응성의 차이(형성률, 양, 질, 뿌리 재분화율)가 다른 것을 알 수 있었다. 이는 조직의 캘러스 형성 능력과 재분화 능력이 genotype의 영향을 크게 받는다는 보고와 일치한다(Hassanpouraghdam 2009; Matsubara and Hegazi 1990). 각 계통별로 가장 효과적인 캘러스 유기 배지로 계대배양하여 증식한 결과, 예상과 달리 새로운 캘러스가 형성되지 않았고 품질이 좋았던 캘러스마저 부풀고 하얗게 변하거나 갈변되는 등의 현상이 나타나며 증식이 잘 되지 않았다. 캘러스의 갈변은 생장 저하와 재분화 능력 감소를 의미하기 때문에, 캘러스 증식에서 캘러스 유기 배지의 사용은 적합하지 않은 것으로 생각된다(He et al. 2009). 또한 *Bacopa monnieri*의 경우 호르몬 뿐만 아니라 질산암모늄, 질산칼륨, 당과 같은 다른 영양분들이 캘러스 갈변을 방지하는 데에 도움이 된다고 보고되어 무기질 물질의 변화를 주는 것도 고려해볼 것으로 생각된다(Meenashree et al. 2017). 이러한 결과를 통해 무의 경우 캘러스 유기를 위한 호르몬 조합과 캘러스 증식을 위한 호르몬 조합이 달라야 한다는 것을 알 수 있었다. Sugarcane의 경우에도 캘러스 유기와 증식에 있어서, 몇몇 품종은 캘러스 증식을 위해 2,4-D 농도의 변화가 필요하다고 보고되었다(Basnayake et al. 2011).

#### 호르몬 종류와 농도에 따른 shoot 재분화

캘러스 유기 결과 네 계통의 캘러스가 형성되었지만, 형태적으로 RA4의 캘러스가 가장 좋은 것으로 판단되었고 예비 실험 결과 RA4 캘러스의 재분화 비율이 다른 계통에 비해 월등히 높았다. 따라서 캘러스의 shoot 재분화 실험에서는 RA4 계통의 캘러스를 이용하였다. 캘러스의 재분화를 위해, 캘러스 유기 결과가 좋았던 1.0 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L Kin + 0.025 mg/L TDZ 조합 배지와 예비 실험에서 선정된 1 mg/L 2,4-D 배지에서 RA4의 캘러스를 유기하였다. 배양 3주 후, 절단면에서 형성된 캘러스 중 like embryogenic callus (LEC)를 잘라 두 종류의 재분화배지(5H+1B, 1 mg/L NAA + 0.1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IPA + 0.02 mg/L GA3 + 2 mg/L zeatin + 1 mg/L BA; 또는 5H+0.1T, 1 mg/L NAA + 0.1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IPA + 0.02 mg/L GA3 + 2 mg/L zeatin + 0.1 mg/L TDZ)에 치상함으로써 호르몬의 종류가 shoot 재분화에 미치는 영향을 조사하였다.

두 종류의 재분화 배지(5H+1B, 5H+0.1T)에서 모두 캘러스의 shoot 재분화가 일어났지만(Fig. 4A, B), 재분화 비율은 5H+1B 배지가 5H+0.1T 배지에 비해 약 3-4배 정도 높았기 때문에 RA4 계통의 shoot 재분화를 위해 cytokinin 중 TDZ보다는 BA의 사용이 유리한 것으로 사료된다. 이와 마찬가지로, *R. sativus* L. 떡잎 절편체의 shoot 재분화에서도 TDZ보다 BA를 사용했을 때 shoot 재분화율이 더 높은 것으로 보고되었다(Murakami et al. 1995). 재분화 배지에서 치상 12일 이후부터 shoot의 재분화가 관찰되기 시작했다. 대부분의 캘러스에서 2-3주 내에 재분화 여부가 결정되었지만, 한 달 이후에





**Fig 3** Shoot regeneration from hypocotyl-derived callus in MS medium + 5H + 1B. (A) like embryogenic callus (LEC); (B) Shoot regeneration of LEC

shoot가 발생한 경우도 있었다. Shoot가 발생하지 않는 부분의 캘러스는 대부분 증식만 되었고, shoot가 재분화 되는 부분의 캘러스는 먼저 진한 녹색으로 변한 후 shoot가 발생하였는데 이는 Park(1996)의 보고와 일치한다(Fig. 3). 한 덩어리의 calli에서 한 개 또는 여러 개의 shoot가 발생하였고, 재분화된 shoot의 대부분은 정상적으로 성장하였지만 일부는 잎이 유리화되거나 비정상적으로 발달해 정상적인 식물체로 발달하지 못했다(Fig. 4D). 잎의 유리화는 genotype, cytokinin의 종류와 농도 등의 영향을 받을 수 있다고 알려져 있으며, 유리화 현상을 감소시키기 위해서는 배양 용기 내 공기 순환, agar 농도와 광도 조절에 의해 유리화를 감소시킬 수 있으므로 같은 계통 내에서 발생하는 유리화를 앞의 조건들의 변화를 줌으로써 유리화 방지 및 정상 개체로 회복시킬 수 있을 것으로 생각된다(Kharrazi et al. 2011; Thu et al. 2020). 대부분의 calli에서 root 재분화가 일어났고 root 재분화는 shoot 재분화에 비해 비율이 훨씬 높았다. 이는 shoot 재분화 배지 내에 포함되어 있는 1 mg/L NAA, 0.1 mg/L 2,4-D, 1 mg/L IPA에 의해 root의 재분화가 유도되는 것으로 추정되며, shoot의 재분화율을 높이기 위해서는 Murakami 등(1995)과 Pua 등(1996)이 cytokinin/auxin 비율을 2/1로 사용함으로써 shoot 재분화율을 향상시킬 수 있었다고 보고한 것과 같이 auxin에 대한 cytokinin의 비율을 증가시켜야 할 것으로 생각된다.

한 덩어리의 캘러스에서 재분화된 shoot를 개별로 분리해 발근 배지에 계대배양 했을 때 또 다른 shoot가 발생하였다(Fig. 4E). 이는 재분화된 shoot에 붙어있던 캘러스의 재분화 능력으로 인해 또 다른 shoot가 발생한 것일 수도 있고, shoot가 분리되면서 생긴 상처에서 직접적으로 새로운 shoot가 발생한 것일 수도 있다고 추정된다. 재분화된 shoot 덩어리가 약 2 cm 이상으로 자랐을 때 개별적인 shoot가 구분되었고, 이 사이를 정확히 분리해서 다시 계대배양 했을 때 안정화된 재분화 식물체를 얻을 수 있었다. 재분화된 shoot를 발근배지로 계대배양한 결과, 대부분의 재분화 식물체에서 정상적



**Fig 4** Shoot regeneration from hypocotyl-derived callus of *R. sativus* L. RA4. bars = 5 mm. (A) MS medium + 5H + 1B; (B) MS medium + 5H + 0.1T; (C) Isolated regenerated shoot; (D) Abnormal growth of regenerated shoot on MS medium + 1 mg/L IBA; (E) Bunch of regenerated shoots on MS medium + 1 mg/L IBA; (F) Regenerated plantlet in soil

으로 뿌리가 발달했다. 발근 유도 과정에서 재분화 shoot 기저 부분에 붙어 있던 조직이나 캘러스가 분리되면, 뿌리를 형성하지 못하고 배지에 심어진 기저 부분이 유리화되며 비정상적인 성장을 나타내므로 기저 부분에 있는 캘러스 또는 조직이 분리되지 않고 함께 계대배양 되는 것이 중요한 것으로 사료된다. 결과적으로, 여러 개의 shoot를 개별로 분리함으로써 5H+1B로부터 발생한 재분화 식물체 40개, 5H+0.1T로부터 발생한 재분화 식물체 4개를 얻을 수 있었다.

**적 요**

무(*Raphanus sativus* L.)는 전세계적으로 재배되고 있는 뿌리 채소 중 하나로, 다양한 방법으로 소비되고 있다. 무의 F1 종자 생산을 위한 원종 계통의 교배 과정에서는 화분 혼입으로 인해 순도가 떨어지는 문제가 발생할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 무의 기내 대량증식을 위해 캘러스 재분화를 통한 대량증식 조건을 확립함으로써 기내배양 식물체를 증식시키고 원종 증식에 이용될 수 있도록 하는 것을 목표로 하였다. 무의 하배축을 이용한 캘러스 유기에서 다양한 농도의 2,4-D와 TDZ, kinetin 조합 중 가장 효과적인 조합을 선정

하고, 유기된 캘러스를 두 종류의 배지(5H+1B, 1 mg/L NAA + 0.1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IPA + 0.02 mg/L GA3 + 2 mg/L zeatin + 1 mg/L BA; 5H+0.1T, 1 mg/L NAA + 0.1 mg/L 2,4-D + 1 mg/L IPA + 0.02 mg/L GA3 + 2 mg/L zeatin + 0.1 mg/L TDZ)에 치상함으로써 shoot 재분화에 적합한 호르몬 조건을 탐색하였다. 무의 캘러스 배양 결과, RA2 계통과 RA10 계통은 1 mg/L 2,4-D + 0.05 mg/L kin 조합에서, RA4 계통은 1 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L kin + 0.025 mg/L TDZ 조합에서, RA30 계통은 1 mg/L 2,4-D + 0.2 mg/L kin 조합에서 캘러스의 형성이 효과적이었다. RA4 계통에서 유기된 캘러스의 shoot 재분화는 두 종류의 shoot 재분화 배지에서 모두 일어났지만, 그 빈도는 5H+1B 배지에서 훨씬 더 높았으며 재분화된 shoot를 발근배지에 계대배양하여 뿌리를 유도하고 기내 순화 과정을 거쳐 재분화된 소식물체를 얻을 수 있었다. 이 연구에서 확립한 조건들을 무의 기내 대량번식에 활용한다면, F1 종자 생산을 위한 원종 증식에 도움이 될 것으로 판단된다.

## 사 사

본 결과물은 농촌진흥청의 재원으로 국가생명연구자원선진화사업의 지원을 받아 연구되었음(PJ016045032023).

## References

- Afshari R, Angoshtari R, Kalantari S (2011) Effects of light and different plant growth regulators on induction of callus growth in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. *Plant Omics* 4(2):60-67
- Basnayake SW, Moyle R, Birch RG (2011) Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars. *Plant Cell Rep* 30(3):439-448
- Case AL, Curtis PS, Snow AA (1998) Heritable variation in stomatal responses to elevated CO<sub>2</sub> in wild radish, *Raphanus raphanistrum* (*Brassicaceae*). *Am J Bot* 85(2):253-258
- Chandra S, Bandopadhyay R, Kumar V, Chandra R (2010) Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechno lett* 32(9):1199-1205
- Daud NFA, Hasbullah NA, Azis NA, Rasad FM, Amin MAM, Lassim MM (2015, April) In vitro regeneration of *Brassica oleracea* var. capitata through stems, roots, leaves and petioles cultures. In International Conference on AEMS 7-8
- Hassanpouraghdam MB (2009) The effects of different culture media on the callus production of radish (*Raphanus sativus* L.). *Rom Biotechnol Lett* 14(4):4519-4523
- He Y, Guo X, Lu R, Niu B, Pasapula V, Hou P, Cai F, Xu Y, Chen F (2009) Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. *PCTOC* 98:11-17
- Hegazi HH, Matsubara S (1992) Callus formation and plant regeneration from protoplast derived from cotyledons and hypocotyls of radish (*Raphanus sativus* L.) and other cruciferous plants. *J Japan Soc Horti Sci* 61(1):63-68
- Kharrazi M, Nemati H, Tehranifar A, Bagheri A, Sharifi A (2011) In vitro culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification. *J Biol Environ Sci* 5(13):1-6
- Khehra GS, Mathias RJ (1992) The interaction of genotype, explant and media on the regeneration of shoots from complex explants of *Brassica napus* L. *J Exp Bot* 43(11):1413-1418
- Korean Seed Association (2022a) Domestic production of vegetable seeds
- Korean Seed Association (2022b) Sales of vegetable seeds by crop
- LaRue CD (1936) Tissue cultures of spermatophytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1936 Apr 22(4):201-9
- Lin YJ, Zhang Q (2005) Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice. *Plant Cell Rep* 23(8):540-547
- Matsubara S, Hegazi HH (1990) Plant regeneration from hypocotyl callus of radish. *HortScience* 25(10):1286-1288
- Meenashree B, Kathiravan G, Srinivasan K, Rajangam B (2017) Effect of plant hormones and media composition on browning and growth of *Bacopa monnieri* callus cultures. *Res J Pharm Technol* 10(2):497-500
- Murakami T, Ono Y, Takahata Y (1995) Phytohormonal and genotypic factors affecting shoot regeneration from cotyledonary explant of radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant Tissue Cult Lett* 12(3):321-323
- Nakanishi T, Esashi Y, Hinata K (1969) Control of self-incompatibility by CO<sub>2</sub> gas in *Brassica*. *Plant Cell Physiol* 10(4):925-927
- Nakanishi T, Hinata K (1973) An effective time for CO<sub>2</sub> gas treatment in overcoming self-incompatibility in *Brassica*. *Plant Cell Physiol* 14(5):873-879
- Narasimhulu SB, Chopra VL (1988) Species specific shoot regeneration response of cotyledonary explants of Brassicas. *Plant Cell Rep* 7(2):104-106
- Park MC, Son SI, KIM JC (1996) Plant regeneration from hypocotyl-derived callus of radish (*Raphanus sativus*). *Korean J Plant Tissue Cult* 23(4):243-247
- Pua EC, Sim GE, Chi GL, Kong LF (1996) Synergistic effect of ethylene inhibitors and putrescine on shoot regeneration from hypocotyl explants of Chinese radish (*Raphanus sativus* L. var. longipinnatus Bailey) in vitro. *Plant Cell Rep* 15(9):685-690
- Thu HTM, Naing AH, Jeong HY, Kim CK (2020) Regeneration of genetically stable plants from *in vitro* vitrified leaves of different carnation cultivars. *Plants* 9(8):950