식물조직배양학회지 제25권 제5호
Korean J. Plant Tissue Culture
Vol. 25, No. 5, 305~308 (1998)

참다래(*Actinidia deliciosa*)의 엽 및 엽병배양에 의한 식물체 재분화

김영숙* · 오성도
전북대학교 원예학과

Plant Regeneration from Leaf and Petiole Culture of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*)

KIM, Young-Sook* · OH, Sung-Do
Department of Horticulture, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea. *Corresponding author.

Leaf and petiole explants of kiwifruit were cultured on MT basal medium supplimented with 2,4-D, kinetin, NAA, and BA. Higher organogenic callus formation was observed on the media with NAA + BA than on the media added with 2,4-D + kinetin. Adventitious buds were formed only on media with NAA and BA. Leaf was better explant than petiole. When callus and adventitious buds were subcultured, shoot formation responsed best on medium with 0.1 mg/L NAA + 2.0 mg/L zeatin. When shoots were cultured on medium with 0.5 mg/L IAA + 0.1 mg/L BA after soaking for 1 hr at IBA solution, rooting was more effective than non-IBA treatment. Rooted shoots developed into normal plants.

Key words: adventitious bud, kiwifruit, organogenic callus,

참다래는 전세계의 온대지역에서 재배되고 있는 덩굴성 낙엽과수로 우리나라에서는 전남, 경남 및 제주지역에서 재배되고 있다. 참다래나무는 내한성이 약하여 온도에 따라 재배지역이 제한되는 문제가 있고 병충해의 피해도 많아지고 있는 추세다. 따라서 저온에 대한 저항성이나 내병성을 가진 우량한 품종육성을 위해서 체세포잡종화, 유용유전자의 형질전환 등의 생명공학적 방법에 의한 품종개량을 시도해 볼 필요가 있다. *Actinidia*속의 조직배양에 관한 연구로 embryo rescue technique에 의한 품종개량을 시도한 바 있고(Hirsch et al., 1991), 엽육유래 원형질체로부터 미세캘러스의 형성(Xiao and Hirsch, 1996)과 식물체 재분화에 대한 연구(Zhang et al., 1995)가 보고되었으며 장기간 배양한 엽육유래의 캘러스에서 원형질체를 유리, 배양하여 식물체를 재분화시켰다(Oliveira and Pais, 1991). 그러나 참다래의 조직을 배양하여 식물체를 재분화시킨 연구는 미미한 상태이며 또한 품종 및 계통에 따라서 재분화를 위한 배지조건이 다르기 때문에 품종에 따른 기내 재분화 체계를 확립할 필요가 있다 따라서 본실험은 우리나라에서 재배되고 있는 품종을 공시재료로하여 참다래조직의 기내 재분화에 미치는 영향을 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시재료

재료는 전남 해남 난지과수 시험장에서 가져온 1년생 실생묘의 신초에서 채취한 엽육조직과 엽병조직을 사용하였다.

재료의 멸균 및 배지조성

채취한 치상체의 표면소독을 위해 70% 에탄올에 3-4초간 침지한 후 Tween 20을 1-2방울 적하시킨 7% calcium hypochorite 수용액(W/V)에 15분간 표면살균한 다음 멸균수로 3-5회 수세하였다. 치상체로부터 캘러스 및 부정아를 유도하기 위하여 배지는 MT(Murashige and Tucker, 1969)

기본배지에 2,4-D, NAA, kinetin 및 BA를 0.1-2.0 mg/L의 농도로 단용 및 혼용처리하였고 엽병조직으로부터 유도된 캘러스와 엽육조직유래의 부정아로부터 신초형성을 위하여 예비실험에서 결과가 양호했던 MS(Murashige and Skoog, 1962)기본배지에 NAA 0.1 mg/L를 고정하고 zeatin, kinetin, BA 및 thidiazuron(TDZ)을 1.0 혹은 2.0 mg/L의 농도로 조제하여 당을 30 g/L 첨가하고 pH는 5.8로 조정한 후 한천은 8 g/L 첨가하였다.

치상 및 배양

엽조직은 6 x 6 mm, 엽병조직은 4-5 mm 길이로 조제하여 배지를 25 mL씩 분주한 petridish에 10개씩 치상하여 3반복으로 하여 25±1°C에서 암배양하였다. 유도된 캘러스는 분화배지에서 1600 Lux의 조도로 16시간씩 명배양하였으며 배양 60일 후 기관분화양상을 조사하였다. 분화된 신초의 발근효율을 높이기 위하여 IAA와 BA를 0.1-1.0 mg/L의 농도로 혼용한 배지를 사용하여 IBA 1.0 mg/L의 용액에 유도된 신초를 1시간 침지한 후 배양한 것과 발근양상을 비교조사하였다.

결과 및 고찰

캘러스와 부정아 형성에 미치는 생장조절제의 영향

참다래조직의 기내배양시 치상체로부터 캘러스유도 및 부정아형성을 조사하기 위하여 엽병과 엽육절편체를 MT기본배지에 2,4-D, kinetin, NAA 및 BA를 0.1-2.0 mg/L의 농도로 단용 및 혼용처리한 배지에 치상하여 조사한 결과(Table 1), 엽육조직은 배양 10일경부터 엽맥부분이 팽대해지면서 절단면에서 캘러스가 형성되기 시작하였는데 2,4-D와 kinetin을 0.1에서 0.5 mg/L의 저농도로 조합한 배지에서는 비교적 부드럽고 부서지기 쉬운 액상의 캘러스가 많이 형성되었으며 이러한 캘러스는 정상적인 기관분화를 하지 않는 것으로(Haydu and Vasil, 1981) 시일이 경과할수록 갈변하였다. 또한 2,4-D와 kinetin을 0.5-2.0 mg/L의 농도로 조합처리한 것은 반응이 더딘 편으로 캘러스의 형성율도 낮았으며 대부분 갈변하는 양상이었다. NAA와 BA를 2,4-D와 kinetin을 조합한 것과 같은 농도로 처리하여 비교한 결과 2,4-D와 kinetin을 조합하였을 때보다 캘러스 형성율이 낮았으며 캘러스가 비교적 표면이 단단한 모습의 기관분화성 캘러스이었고 치상체로부터 부정아가 직접 형성되었는데 비교적 고농도인 0.1 mg/L NAA와 2.0 mg/L BA를 처리한 배지에서 가장 많은 부정아가 형성되었다.

반면 엽병조직을 엽육조직 배양시 사용한 것과 동일한 배지에 배양하였을 때 치상체가 팽대하면서 캘러스가 형성되기 시작하였고 캘러스형성율은 전체적으로 양호한 편이었으며 NAA와 BA를 혼용처리하였을 때 기관분화성 캘러스가 형성되었으나 치상체로부터 부정아는 형성되지 않았고 엽육조직과는 반응이 다른 모습으로 치상체로부터 뿌리가 발생하는 양상을 보였다.

기관분화성과 비기관분화성 캘러스사이의 중요한 차이는 BA수준과 관계가 깊으며(Centeno et al., 1996) 기내배양을 통한 캘러스의 유도는 식물의 종, 또는 식물체내에서도 배양에 이용되는 조직의 부위 및 배양조건과 방법에 따라 그 양상이 크게 다른 것으로 알려지고 있다(Binh and Heszky, 1990: Data et al., 1990). 본 실험에서는 2,4-D와 kinetin을 조합처리한 것보다 NAA와 BA를 조합처리한 것에서 비교적 기관분화능이 있는 캘러스와 부정아가 발생되는 빈도가 더 높았으며 엽병조직보다는 엽육조직을 배양하였을 때 그 반응이 양호하였다

Table 1. Effects of growth regulators on callus induction and adventitious bud formation from petiole and leaf explants of *Actinidia deliciosa* after 90days of culture.[a]

Growth regulators (mg/L)				Leaf explant		Petiole explant	
2,4-D	NAA	Kinetin	BA	A	B	C	D
0.1				95.7	0	46.7	0
0.2		0.1		100	0	57.1	0
0.2		0.5		100	0	69.2	15.4
0.5				100	0	92.3	0
0.5		0.5		91.3	0	53.3	0
0.5		1.0		20.8	0	35.7	14.3
1.0		0.5		25.0	0	40.0	0
1.0		2.0		32.0	0	38.5	0
	0.1			17.4	0	16.7	16.7
	0.2		0.1	13.6	0	30.8	0
	0.2		0.5	28.6	53.6	30.8	15.4
	0.5			19.0	0	21.4	28.0
	0.5		0.5	10.0	0	26.7	6.7
	0.5		1.0	23.1	28.6	33.3	6.7
	1.0		0.5	38.1	19.1	38.5	15.4
	1.0		2.0	44.0	75.0	21.4	0

[a]MT basal medium was used
A, C: percentage of callus formation of explants
B: percentage of adventitious bud formation of explants
D: percentage of root formation of explants

Table 2. Effect of cytokinin on shoot formation from callus and adventitious bud of *Actinidia deliciosa* after 60 days of subculture[a]

Growth regulators (mg/L)				% of shoot formation	
Zeatin	Kinetin	BA	TDZ	Adventitions bud	Callus
1.0				43.8	14.3
2.0				64.7	23.1
	1.0			6.7	7.1
	2.0			6.7	0
		1.0		5.9	0
		2.0		6.3	0
			1.0	11.8	6.7
			2.0	20.0	16.7

[a]MS medium containing 0.1 mg/L NAA was used

신초의 분화에 미치는 시토키닌의 효과

엽육조직유래의 부정아와 엽병조직유래의 캘러스로부터 신초의 분화에 미치는 시토키닌의 효과를 조사하기 위하여 MS 배지에 NAA를 0.1 mg/L으로 고정하고 zeatin, kinetin 및 TDZ을 1.0과 2.0 mg/L의 농도로 조합한 분화배지에 캘러스와 부정아를 계대배양하여 60일 후에 조사한 결과 (Table 2), 배양 20일 후부터 신초가 분화되기 시작하였다 (Figure 1A). 특히 zeatin 2.0 mg/L를 첨가한 배지에서 많은 신초가 형성되어서 zeatin이 다른 시토키닌류보다 가장 효과적이었고 신초의 모습도 zeatin처리구에서 대부분 정상적인 형태를 보인 반면 TDZ을 처리한 배지에서 분화된 신초는 투명현상이 나타난 비정상의 신초가 형성되었고 뿌리가 많이 발생되는 양상이었다.

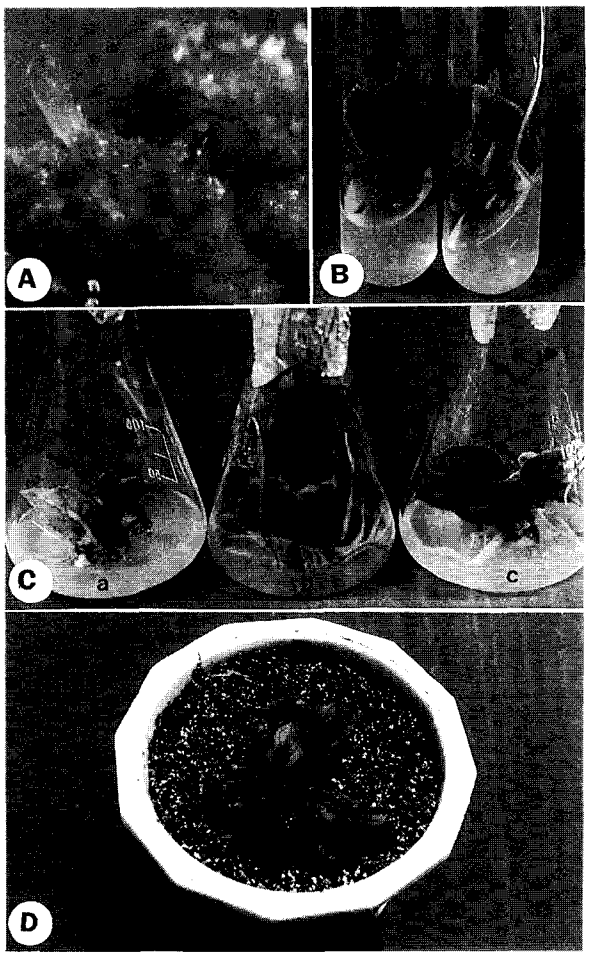

Figure 1. Plant regeneration from tissue culture of *Actinidia deliciosa* A: Shoot primordia formed on MT medium supplemented with 0.1 mg/L NAA and 2.0 mg/L zeatin: B: Root formation on MS medium with 0.5 mg/L IAA and 0.1 mg/L BA, left : Non-IBA treatment right : Culture after soaking in 1.0 mg/L IBA solution for 1hr: C: Comparison of rooted plantlet on MS medium with 0.1 mg/L BA (culture after IBA treatment) a: 0.1 mg/L IAA, b: 0.5 mg/L IAA, c: 1.0 mg/L IAA:D: Plant transplanted to potting soil

Gleddie(1989)는 Arabidopsis의 자엽과 배축을 기내배양하여 형태형성에 미치는 요인 중 중요한 변수는 시토키닌의 선택에 달려 있으며 그 중 zeatin과 TDZ의 영향을 비교한 결과 TDZ은 신초유도에 탁월한 시토키닌이지만 가끔 형태적으로 비정상이었고 zeatin이 양호한 반응을 보였다고 하였는데 이러한 결과는 본 실험과 일치하는 경향이었다

신초의 발근유도

엽육조직과 엽병조직으로부터 분화된 신초의 발근을 위하여 MS배지에 BA를 0.1 mg/L로 고정한 후 IAA를 0.1-1.0 mg/L의 농도로 조합처리한 발근배지에 계대배양하여 발근양상을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

식물생장조절제를 처리하지 않은 대조구에서는 계대배양 20일 후 부터 발근이 시작되어 42.9%의 발근율로 비교적 양호한 반응을 보였고 BA 0.1 mg/L과 IAA를 0.5 mg/L를 혼용처리한 경우에는 더 나은 발근양상을 보여 배양 30일 후에는 비교적 뿌리의 생장이 왕성한 건전한 식물체를 얻을 수가 있었다.

한편 IBA 용액의 침지처리가 발근에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 1.0 mg/L IBA용액에 유도된 신초를 1시간 침지한 후 발근배지에 계대배양하여 IBA를 처리하지 않은 것과 비교한 결과(Figure 1B), IBA용액에 침지처리한 것의 발근이 더 양호하였으며 IAA의 농도별로 발근양상을 조사한 결과(Figure 1C), 0.1 mg/L BA와 0.5 mg/L IAA를 조합처리한 것이 뿌리의 발달이 가장 양호하였으며 발근된 식물체들은 대부분 건전한 생육을 보였다.

Oliveira와 Pais(1991)도 키위의 원형질체 배양으로부터 식물체를 분화시킬 때 IBA용액의 침지처리가 효과적이라고 하여 본 실험과 유사한 결과를 보고하였으며 Zhang 등(1995)은 키위의 원형질체 배양시 분화된 신초를 생장조절제가 없는 배지에 옮기기 전 IBA용액에 침지하여 발근을 유도하였다. 또한 줄기가 분화된 토마토 식물체의 경우에는 0.5 mg/L NAA와 0.2 mg/L TDZ이 조합된 배지에서만 가능

Table 3. Effect of growth regulators on root formation from shoosts of *Actinidia deliciosa* after 30 days of subculture

Treatment	Growth regulators (mg/L)		% of root formation
	IAA	BA	
control	-	-	42.9
	0.1	0.1	14.3
	0.5	0.1	50.0
	1.0	0.1	25.0
IBA treatment[a]	0.1	0.1	25.0
	0.5	0.1	55.6
	1.0	0.1	37.5

[a]Culture after soaking at 1.0 mg/L IBA solution for 1hr

하여 오옥신과 시토키닌의 비율이 같을 때 발근이 된다고 하였고(Lim et al., 1994), Anthurium의 잎절편배양에서 캘러스로부터 분화된 신초는 식물생장조절제가 없는 배지에서도 쉽게 발근이 되었는데(Thomas, 1986) 이러한 결과들은 식물에 따라 내생호르몬의 수준이 다르고 발근에 미치는 생장조절제의 농도 및 종류가 다르기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 참다래의 경우 유도된 신초의 발근에는 생장조절제를 첨가하지 않아도 발근이 되지만 IBA용액에 침지처리한 후 0.1 mg/L BA와 0.5 mg/L IAA를 조합처리하는 것이 더 효과적일 것으로 생각되었다. 재분화된 식물체는 버미큘라이트와 모래를 1:1로 배합한 상토에서 건전하게 순화되었다(Figure 1D).

적 요

키위의 엽육조직과 엽병조직을 치상하여 캘러스 및 부정아형성에 미치는 생장조절제의 효과를 조사한 결과 기관분화성 캘러스형성은 2,4-D와 kinetin을 조합한 배지에서보다 NAA와 BA를 조합한 배지에서 양호하였고, 부정아 형성은 NAA와 BA를 조합한 배지에서만 형성되었으며 엽병조직보다 엽육조직을 배양하였을 때 반응이 양호하였다. 유도된 캘러스와 부정아로부터 신초의 형성은 MS기본배지에 0.1 mg/L NAA와 2.0 mg/L zeatin을 첨가한 배지에 계대배양하였을 때가 가장 효과적이었다. 신초의 발근은 1.0 mg/L IBA용액에 1시간 신초를 침지한 후 0.5 mg/L IAA와 0.1 mg/L BA를 첨가한 배지에 배양하면 IBA용액에 침지처리하지 않은 것보다 더 효과적이었으며 정상식물체로 발달하였다.

인 용 문 헌

Binh OQ, Heszky LE (1990) Restoration of the regeneration potential of long term cell culture in rice(*Oryza sativa*) by salt pretreatment. Plant Physiol **136**:336-340

Centeno ML, Rodrigney A, Feito I, Fermandey B (1996) Relationship between endogenous auxin and cytokinin level and morphogenic response in *Actinidia deliciosa* tissue cultures. Plant Cell Reports **16**:58-62

Data SK, Data K, Potrycas I (1990) Embryogenesis and regeneration from microspores of both indica and japonica rice(*Oryza sativa*). Plant Sci **67**:83-88

Haydu Z, Vasil Ik (1981) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf tissue and anthers of *Pennisetum purpureum* Schum. Theor Appl Genet **59**:269-273

Jin ZD, Shi R J (1991) High efficienty plant regeneration from cotyledons of watermelon(*Citrallus valgaris* Schrad). Plant Cell Reports **9**:559-562

Gleddie S (1989) Plant regeneration from cell suspension cultures of *Arabidopsis thaliana* Heynh. Plant Cell Reports **8**:1-5

Hirsch AM, Fottune D, Xiao XG, Blanchet P (1991) Somaclonal variations related to kiwifruit micropropagation, study of fruitful male plants and use of peroxidase as an earlier sex marker. Acta Hort **297**:123-131

Kortessa DT, Artemios MB (1997) Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation in Kiwifruit cultured in vitro. Plant Cell Tissue and Organ Culture **47**:127-134

Lim HT, Lee KS, Yeoung YR, Song YN, Kim JH (1994) Plant regeneration from hypocotyle explants of several species of *Lycopersicon*. Kor J Plant Tissue Culture **21**:137-143

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant **15**:437-497

Murashige T, Tucker DPH (1969) Growth factor requirements of citrus tissue culture. In HD Champman, eds, Proc 1st International Citrus Symposium, Vol 3. Reverside, University of California, USA pp 1155-1161

Oliveira MM, Pais MS (1991) Plant regeneration from protoplasts of long-term callus cultures of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayword(Kiwifruit). Plant Cell Reports **9**:643-646

Son SH, Hall RB (1995) Multiple shoot induction from ex vitro and in vitro derived stem node culture of *Populus alba* x P. *grandidentata* Michx. Kor J Plant Tissue Culture **22**:131-135

Thomas G (1986) Factors affecting plant regeneration from leaf segments of *Anthurium scherzerianum* Schott (Araceae) cultured in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **6**:115-125

Xiao XG, Hirsch AM (1996) Microcallus formation leaf mesophyll protoplasts in the genes *Actinidia* Lindl. Plant Cell Reports **15**:896-899

Zhang Yj, Mu XJ, Cai QG, Zhou YL, Qian YQ (1995) Plantlet regeneration from leaf protoplasts in seedling of *Actinidia eriantha* Benth. Acta Botanica Sinica **37**:48-52

(1997년 11월 26일 접수)