

# 딸기 (*Fragaria ananassa* Duch.) 잎 절편체 배양으로부터 부정아 형성을 통한 식물체 재생

조덕이\* · 소웅영<sup>1</sup> · 정원일<sup>2</sup>

우석대학교 이공대학 생물학과, <sup>1</sup>전북대학교 자연과학대학 생물과학부, <sup>2</sup>한국과학기술대학교 생물과학부

## Effect of Medium Component on Plant Regeneration via Adventitious Bud Formation from Leaf Explant Cultures of Strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.)

CHO, Duck-Yee\* · SOH, Woong-Young<sup>1</sup> · CHUNG, Won-Il<sup>2</sup>

Department of Biology, WooSuk University, Chonbuk, 565-701, Korea

<sup>1</sup>Department of Biological Sciences, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

<sup>2</sup>Department of Biological Science, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon, 305-701, Korea

**ABSTRACT** This study was investigated to establish a regeneration system of plant via adventitious bud formation from leaf explant cultures of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch). Effects of plant growth regulators (2,4-D, BAP), agar, sucrose and myo-inositol on adventitious bud formation were investigated. When the leaf explants were cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/L 2,4-D and 3 mg/L BAP, the adventitious bud formation was most promoted. The adventitious bud formation was not induced from leaf explants cultured on MS medium containing 2,4-D alone. Adventitious bud formation was enhanced to almost 3 times on medium with low level of agar concentration (0.4%) in comparison with those on the medium with high level of agar (1%), but almost of shoot was vitrified on the medium. Therefore, the normal adventitious bud formation from leaf explants was most effective on the medium containing 0.05 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP, 0.8% agar, 30 g/L sucrose and 100 mg/L myo-inositol. Thus, the mass propagation of healthy strawberry could be established using leaf explants.

**Key words:** Adventitious bud, growth regulator, inositol, strawberry

### 서 론

딸기는 장미과 초본식물로서 온대지방에서 중요한 상업성 과실작물로 알려져 있으며 포복경에 의한 영양번식으로 번식되어 왔다. 한편 조직배양에 의한 대량생산체계의 확립으로 (Boxus 1974; Rugini and Orlando 1992) 경정배양을 통한 대량번식법이 산업적으로 이용되고 있다 (Zimmerman 1981).

캘러스배양 (Nishi and Oosawa 1973), 약배양 (Svensson and Johansson 1994), 미숙배배양 (Wang et al. 1984), 엽신배양 (Rugini and Orlando 1992), 엽병배양 (Jones et al. 1988), 탁엽 (Rugini and Orlando 1992), 포복경 (Liu and Sanford 1988) 및 성숙한 종자의 자엽배양 (Miller and Chandler 1990) 등을 통하여 식물체 재생이 시도되어 왔으나 분열조직이 아닌 조직으로부터 식물체를 재생하는 방법은 재분화 효율이 매우 낮다. 재래식 육종방법의 한계 때문에 유전자 전환체 생산의 필요성이 대두되고 있으므로 조직배양을 이용한 능률적인 식물체 재생체계의 확립은 딸기의 생산성 제고에 기여하게 될 것이다.

\*Corresponding author. Tel 063-290-1513 Fax 063-291-6571  
E-mail dycho555@core.woosuk.ac.kr

기관분화에는 옥신과 사이토키닌의 조합비율이 중요하며 (Skoog and Miller 1957; Cho and Soh 1981; Cho 1985), 동일 품종일지라도 배양절편체의 절취부위에 따라서 전형성능의 발현에 차이가 있다. 또한 배지 구성성분인 한천, 자당 및 미오이노시톨의 농도가 식물체 재생에 크게 영향을 미치고 있다. 한천은 일반적으로 gelling agent로서 식물조직배양에 사용되고 있으며 조직배양 배지 내에 다른 영양분과 함께 중요한 역할을 하는 한천은 절편체의 발달과 분화에 저해제로도 작용할 수 있다 (Kohlenbach and Wernickel 1983; Shillito et al. 1983). 이러한 물리적, 화학적인 배양환경에 따라서 건전한 식물체재생에 미치는 영향이 크다. 식물체재생이 이루어진다 하여도 투명화 현상이 일어나면 순화에 악영향이 미치게 되므로 건전한 식물체 형성이 묘생산에 중요한 과정으로 사료된다.

따라서 본 실험은 잎절편체를 이용하여 딸기의 건전하고 투명화현상이 일어나지 않는 식물체의 대량생산 체계 확립 및 건전하고, 효율적인 식물체재생체계의 확립을 위한 최적 배지조성을 구명하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

전북 완주군 삼례에서 구입한 딸기 (*Fragaria ananassa* Duch. cv. Hokowase)의 잎을 70% 에탄올에서 1분간, tween 40이 한두 방울 첨가된 1% 차아염소산나트륨에 10분간 침적시켜 표면살균한 후, 멸균수로 5회 수세하여 배양재료로 사용하였다.

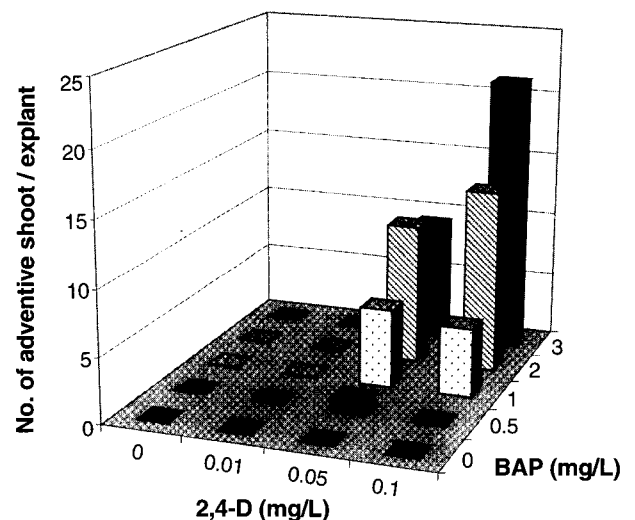
### 부정아 형성

캘러스 유도를 위하여 여러가지 농도의 2,4-D (0, 0.01, 0.05, 0.1 mg/L)와 BAP (0, 0.5, 1, 2, 3 mg/L)를 조합 첨가한 MS (Murashige and Skoog 1962)배지에 한천 (0.4, 0.8, 1%), 자당 (1, 3, 6, 9%) 및 미오이노시톨 (100, 300, 600, 900 mg/L)을 조합하여 배지를 조성하였다. 배지는 한천 첨가 전에 pH를 5.8로 조정하여 121°C, 1.2기압에서 15분간 고압멸균 후, 100 mL 삼각플라스크에 40 mL씩 분주하여 표면살균시킨 잎절편 (3×3 mm)을 4개씩 치상하였다. 배양은 25±1°C로 조절되는 배양실에서, 광도 46 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>의 16시간 광주기에서 7주간 배양하여 부정아 유도를 시도하였으며 5회 반복배양하여 통계처리하였다.

## 결과 및 고찰

### 캘러스 유도 및 부정아 형성

딸기의 잎절편 (3×3 mm)을 2,4-D와 BAP가 조합처리된 MS배지에 치상하여 7주일간 배양하면 배양 4주 후부터 노랑고 딱딱한 캘러스가 형성되었고 5주 후 녹색의 반점이 형성되었으며 이러한 녹색의 반점으로부터 부정아가 형성되었다. 배양 7주 후 0.05 mg/L 2,4-D와 1 mg/L BAP가 첨가된 배지에서 절편체당 6개의 부정아가 형성되었으며 0.05 mg/L 2,4-D와 2 및 3 mg/L BAP가 첨가된 배지에서 10.8 및 9.3개의 부정아가 형성되었다. 또한 0.1 mg/L 2,4-D와 3 mg/L BAP 첨가배지에서는 21.3개로 가장 많은 부정아가 형성되었으므로 (Figure 1). 배지 내에 고농도의 사이토키닌 첨가는 부정아 유도에 촉진적이라는 연구결과와 유사하였다 (Eun et al. 1982). 그러나 고농도의 BAP 처리는 부정아수는 많았으나 투명화 현상이 일어났으며 이와 같은 결과는 독일 가문비나무 (von Arnold and Eriksson 1984), 멜론 (Leshem et al. 1988), 사과 (Bornman and Vogelmann 1984), 안개초 (Densco 1987)에서의 경우와 같은 경향이였다. 딸기의 잎절편체로부터 건전한 묘 생산에 필요한 농도는 0.05 mg/L 2,4-D와 1 mg/L BAP가 첨가된 배지로서 형성된 부정아의 수는 0.1 mg/L 2,4-D + 3 mg/L BAP 첨가배지에서보다 적었으나 전반적으로 투명화 발생이 적고 건전한 부정아가 형성되었다. 이러한 투명화 현상은 성장조절물질의 불균등한 농도에 기인한다고 사료된다 (Leshem and Sachs 1985; William and



**Figure 1.** Effects of 2,4-D and BAP on adventitious shoot formation from leaf explant of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch). The leaf explants were cultured on MS agar medium supplemented with various concentrations of 2,4-D (0, 0.01, 0.05, 0.1) and BAP (0, 0.5, 1, 2, 3) for 7 weeks of light culture. Numerical values were collected after 7 weeks of culture from 5 replicates each in experiments.

Taji 1987).

한편 2,4-D와 BAP 단독배지에서는 어떤 농도에서든지 부정아가 형성되지 아니하였다 (Figure. 1). 이와 같은 현상은 포복경을 사용하여 부정아를 유도할 때 0.5~2 mg/L IAA와 10 mg/L BAP를 혼용한 배지조건에서 다수의 부정아가 형성되었다는 (Liu and Sanford 1988) 보고와 유사하였으나 BAP의 농도가 높은 것은 잎절편에 비하여 요구되는 싸이토키닌의 요구가 다르기 때문으로 사료된다. 딸기의 탁엽 (Rugini and Orlando 1992)과 엽병을 이용하여 캘러스 형성 후 기관 분화가 일어나는 것은 주로 이 부위에 싸이토키닌이 많이 축적되어 있으므로 일어난 것으로 추정된다.

부정아 형성에 미치는 한천의 영향

부정아 형성에 미치는 한천농도의 영향을 구명하기 위하여 0.05 mg/L 2,4-D와 1 mg/L BAP가 조합된 MS배지에 한천의 농도 (0.4%, 0.8%, 1%)를 달리한 배지에서 식물체를 재생하였다. 0.4% 한천에서 절편체당 9.1개, 0.8% 및 1%의 한천에서 형성된 부정아수는 6개 및 5.8개로 나타나 부정아 발생률은 0.4% 한천배지에서 가장 높았으며 성숙도 빨랐다 (Figure 2, 3). 이와 같이 한천의 농도가 낮은 배지에서 부정아 형성이 촉진되었으나 투명화 현상이 발생하였다. 저농도의 한천 사용은 투명화현상의 원인이 된다는 연구보고와 일치하

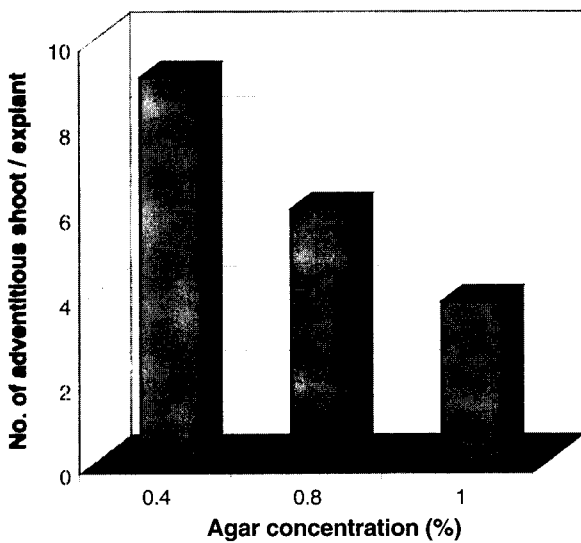


Figure 2. Effects of agar concentrations on adventitious shoot formation from leaf explants of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch). The leaf explants were cultured on MS medium containing 0.05 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP, 30 g/L sucrose and 100 mg/L myo-inositol for 7 weeks of light culture.

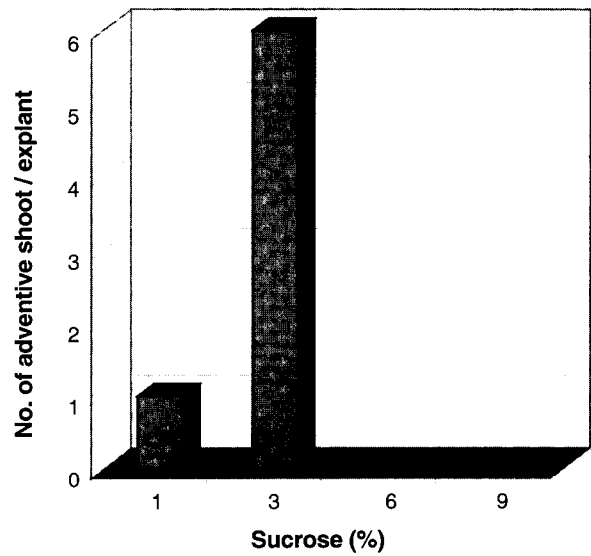


Figure 4. Effects of sucrose on adventitious shoot formation from leaf explants of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch). The leaf explants were cultured on MS medium containing 0.8% agar, 0.05 mg/L 2,4-D and 1 mg/L BAP for 7 weeks of light culture.

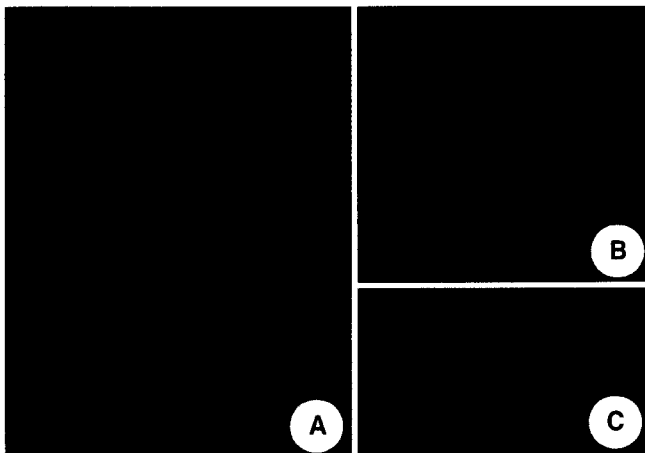


Figure 3. Effects of agar concentration on adventitious bud formation from leaf explant of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch). The leaf explants were cultured on MS medium supplemented with various concentrations of agar for 7 weeks of light culture. A: 0.4%, B: 0.8%, C: 1.0% of agar.

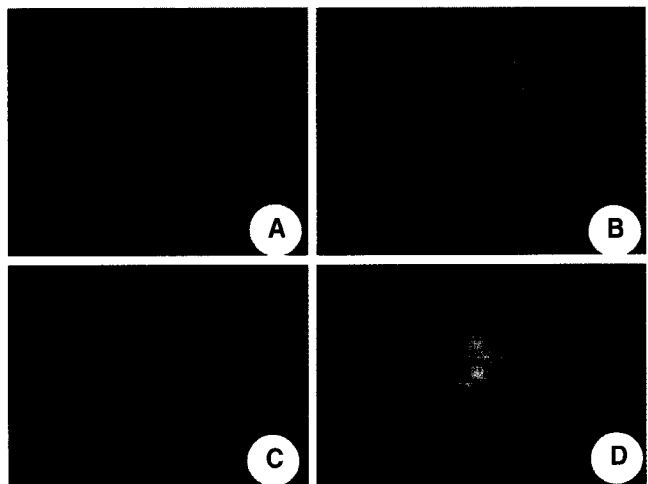


Figure 5. Effects of sucrose concentration on adventitious bud formation from leaf explant of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch). The leaf explants were cultured on MS medium supplemented with various concentrations of sucrose for 7 weeks of light culture. A: 1%, B: 3%, C: 6%, D: 9% of sucrose.

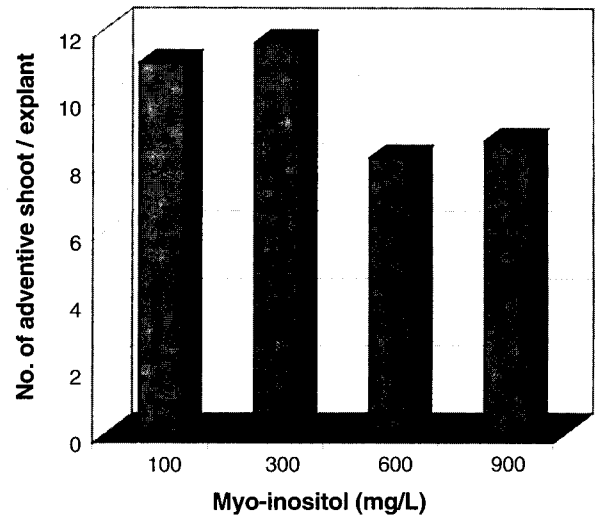
였으며 (Debergh 1983; Leshem 1983; von Arnold and Eriksson 1984), 이러한 낮은 한천농도의 배지에서는 수분이 과다하여 식물체가 양분흡수를 용이하게 하기 때문에 부정아 형성이 향상된다 (Debergh et al. 1981). 투명화 현상은 건전한 유식물 생산을 저해하기 때문에 부정아 유도의 초기에는 0.4% 한천을 사용하고 부정아 형성후에는 0.8% 한천배지로 이식시켜 주면 많은 부정아가 건전하게 생육할 것으로 사료된다. 0.8% 및 1%의 비교적 고농도 한천을 사용하면 배양용기내의 습도가 낮아져서 투명화 현상이 억제되지만 (Ziv et al. 1983) 부정아 형성을 촉진시키는 싸이토키닌 및 영양물질의 흡수를 억제하여 결과적으로 부정아 형성률이 낮아지게 된다 (Debergh 1983). 이러한 것은 독일 가문비나무 배양에서 (von Arnold and Eriksson 1984) 한천농도를 증가시키면 BAP 흡수가 방해되어 투명화율을 감소시킨다는 보고와도 일치하였다. 한천은 일반적으로 식물조직배양에서 gelling agent로 많이 사용되고 있으며 한천은 배지 내 수분 포텐셜의 고질성분으로 역할을 하여 한천농도를 높이면 번식률이 급격하게 감소한다는 연구결과가 *Cynara scolymus* (globe artichoke)의 대량번식에서도 보고되었다 (Debergh et al. 1981). 또한 조직배양계의 수분포텐셜이 분화에 결정적인 요인으로 작용한다 (Brown et al. 1979)는 보고도 있다.

#### 부정아 형성에 미치는 자당 및 미오이노시톨의 영향

부정아 형성에 대한 자당의 영향을 구명하기 위하여 일절편체를 다양한 농도의 자당이 첨가된 배지에서 배양하였다. 10 g/L 및 30 g/L 자당이 첨가된 배지에서는 각각 1개와 6개의 부정아가 형성되었으며 자당이 전혀 첨가되지 않은 배지에서는 전혀 부정아가 형성되지 않았다. 따라서 30 g/L의 자당을 첨가하는 것이 부정아 형성에 가장 효과적이었으며 90 g/L의 자당 첨가배지에서는 일절편체가 탈색 및 괴사되었다 (Figure 4, 5). 이러한 현상은 고농도의 자당에 의해서 일어나는 삼투현상과 관련이 있는 것으로 생각된다. 자당은 만니톨보다 우수한 삼투조절제로 사용된다.

또한 부정아 형성에 대한 미오이노시톨의 영향을 구명하기 위하여 여러 가지 농도의 미오이노시톨을 MS배지에 첨가하여 일절편체를 배양하였다. 100 mg/L 미오이노시톨 첨가배지에서 11개, 300 mg/L 미오이노시톨 첨가배지에서 11.6개의 부정아가 형성되어 딸기 일절편으로부터 부정아 형성에는 비타민 복합체인 미오이노시톨은 큰 영향을 미치지 않았다 (Figure 6, 7). 이러한 현상은 보리, 감자에서도 유사하였다 (Ichimura et al. 1995; Salmenkallio et al. 1995).

느릅나무 형성층에 20~200 mg/L 사용하면 기관분화에 효과적이었으며 (Economou and Read 1986). 인삼 원형질체 배양을 통한 체세포배 발생에서는 삼투제와 탄소원으로 매우 효과적인 것으로 밝혀졌다. 이와같이 미오이노시톨 (600 mg/L)은 삼투조절제로 분열과 영양계 형성에 중요한 역할을



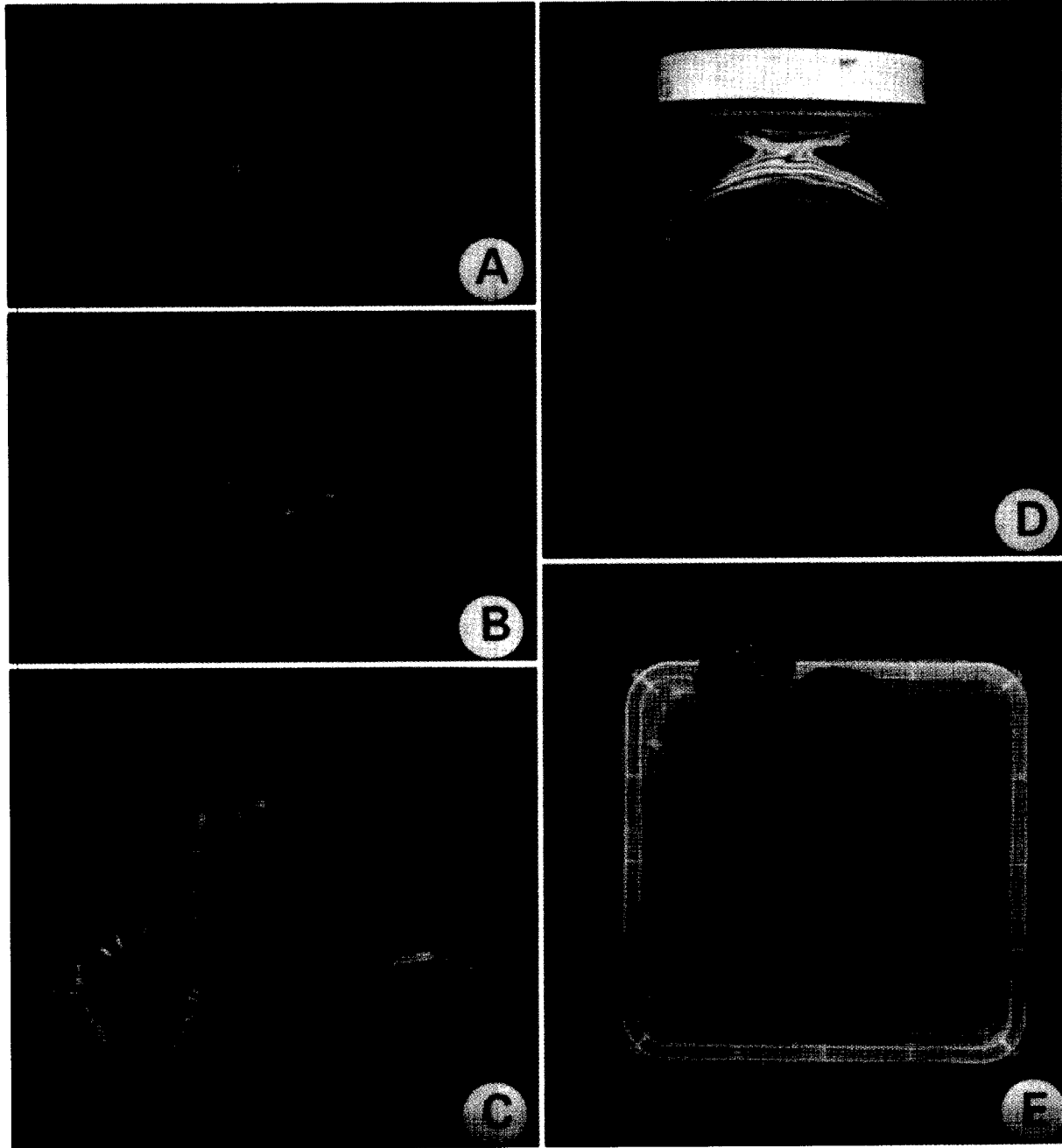
**Figure 6.** Effects of myo-inositol on adventitious shoot formation from leaf explants of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch). The leaf explants were cultured on MS agar (0.8%) medium containing 0.05 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP and 30 g/L sucrose for 7 weeks of light culture.

하는 것으로 나타났다 (Arya et al. 1991). 토마토 원형질체 배양에서는 미오이노시톨을 사용하면 생존율이 높고 분열도 빠르다는 보고가 있으며 5 g/L 이상 사용시 독소현상이 일어나지만 그 이하 농도로 사용하면 원형질체 배양에 필수적이라고 보고하고 있다 (Bellini et al. 1990). 원형질막의 구성성분인 phosphatidylinositol의 전구물질인 미오이노시톨은 고농도의 경우 spruce 원형질체 배양과 감자 원형질체 배양시 적합하다 (Masson et al. 1987). 따라서 식물종과 배양종류에 의하여 미오이노시톨의 적정농도가 다르게 나타나기 때문에 식물종 및 배양종류에 따라 그 적정 농도의 구명이 필요하다고 생각된다.

이상과 같이 딸기의 일절편체 배양으로부터 부정아 형성을 통한 식물체 재생체계를 확립하기 위하여 실험한 결과 0.05 mg/L 2,4-D와 1 mg/L BAP, 30 g/L 자당 및 100 mg/L 미오이노시톨이 첨가된 MS 배지에서 7주간 배양하면 다수의 부정아가 형성되었으며, 0.4%의 한천이 첨가된 배지에서 부정아 원기를 형성한 후 0.8% 한천배지로 이식하면 생육이 빠르고, 건전한 묘가 생산되었다.

## 적 요

딸기의 기내대량번식 체계를 확립하기 위하여 딸기 일절편체로부터 부정아 형성에 미치는 2,4-D, BAP, 한천, 자당 및 미오이노시톨의 영향에 관하여 실험하였다. 부정아 형성은 MS 배지에 0.1 mg/L 2,4-D와 3 mg/L BAP, 0.4% 한천 첨가배지에서 가장 촉진적이었으며, 2,4-D 단독배지에서는 부정아 형성이 유도되지 아니하였다. 0.4% 한천을 첨가한 배지에서



**Figure 7.** Plant regeneration via adventitious bud formation from leaf explant culture of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch). The explants were cultured on MS medium supplemented with 0.05 mg/L 2,4-D with 1 mg/L BAP, 30 g/L sucrose, 0.8 % agar and 100 mg/L myoinositol for 7 weeks of light culture.

부정아 형성은 1% 한천 첨가배지에 비하여 약 3배가 촉진되었으나 투명화 현상이 심하였다. 따라서 딸기 잎 절편을 0.05 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BAP, 0.8% 한천, 30 g/L 자당 및 100 mg/L의 미오이노시톨에서 배양하였을 때 건전한 유식물체가 형성되었다.

사사 - 본 연구는 우석대학교 교내 학술연구비에 의하여 수행된 연구결과임.

#### 인용문헌

- Arya S, Liu JR, Eriksson T (1991) Plant regeneration from protoplasts of *Panax ginseng* (C. A. Meyer) through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 10:277-281
- Bellini C, Chupeau MC, Gervais M, Vastra G, Chupeau Y (1990) Importance of myo-inositol, calcium, and ammonium for the viability and division of tomato (*Lycopersicon esculentum*) protoplasts. *Plant Cell Tiss Org Cult* 23:27-37
- Bornman CH, Vogelmann TC (1984) Effect of rigidity of gel medium

- on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* *Picea abies*. *Physiol Plant* **61**:505-512
- Boxus P** (1974) The production of strawberry plants by *in vitro* micropropagation. *J Hort Sci* **49**:209-210
- Brown DCW, Leung DWM, Thorpe TA** (1979) Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. *Physiol Plant* **46**:36-41
- Cho DY** (1985) Distribution and quantitative determination of IAA by HPLC concerning adventitious root formation in *Azukia* epicotyl cuttings. *Kor J Plant Tiss Cult* **12**:79-87
- Cho DY, Soh WY** (1981) Adventitious root formation from the hypocotyl of *Phaseolus vulgaris*. *Kor J Plant Tissue Culture* **12**:79-87
- Debergh PC** (1983) Effects of agar brand of concentration on the tissue culture medium. *Physiol Plant* **59**:270-276
- Debergh PC, Harbaoui Y, Lemeur R** (1981) Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol Plant* **53**:181-187
- Densco I** (1987) Factors influencing vitrification on carnation and conifers. *Acta Hort* **212**:167-176
- Economou AS, Read PE** (1986) Microcutting production from sequential reculturing of hardydeciduous *Azalea* shoot tips. *Hortscience* **21**:137-139
- Eun JS, Lee BK, Lee MS** (1982) Studies on the rapid clonal propagation by means of meristem and callus cultures in strawberry. *J Kor Soc Hort Sci* **23**:261-276
- Ichimura K, Uchiumi T, Tsuji K, Oda M, Nagaoka M** (1995) Shoot regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in tissue culture using several kinds of supporting materials. *Plant Sci* **108**:93-100
- Jones OP, Waller BJ, Beech MG** (1988) The production of strawberry plants from callus cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* **12**:235-241
- Kohlenbach HW, Wernicke W** (1983) Investigation on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. *Z Pflanzenphysiol* **86**:463-472
- Leshem B** (1983) Growth of carnation meristems *in vitro*: anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation. *Ann Bot* **52**:412-415
- Leshem B, Sachs T** (1985) Vitrified *Dianthus teratomata* *in vitro* due to growth factor imbalance. *Ann Bot* **56**:613-618
- Leshem B, Shalev DP, Izhar S** (1988) Cytokinin as an inducer of vitrification in melon. *Ann Bot* **61**:255-260
- Liu ZR, Sanford JC** (1988) Plant regeneration by organogenesis from strawberry leaf and runner tissue. *HortSci* **23**:1057-1059
- Masson J, Lecerf M, Rousselle P, Perennec P, Pelletier G** (1987) Plant regeneration from protoplasts of diploid potato derived from crosses of *Solanum tuberosum* with wild solanum species. *PlantSci* **53**:167-176
- Miller AR, Chandler CK** (1990) Plant regeneration from excised cotyledons of mature strawberry achenes. *HortSci* **25**:569-571
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Nishi S, Oosawa K** (1973) Mass production method of virus free strawberry plants through meristem callus. *JPN Agr Res Quart* **7**:189-194
- Rugini E, Orlando R** (1992) High efficiency shoot regeneration from calluses of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) stipules of *in vitro* shoot cultures. *J Hort Sci* **67**:577-582
- Salmenkallio MM, Kurten V, Kauppinen V** (1995) Culture condition for efficient induction of green plants from isolated microspores of barley. *Plant Cell Tiss Org Cult* **43**:79-81
- Shillito RD, Paszkowski J, Potrykus I** (1983) Agarose planting and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. *Plant Cell Rep* **2**:244-247
- Skoog F, Miller C** (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol* **11**:118-130
- Svensson M, Johansson LB** (1994) Anther culture of *Fragaria × ananassa* : Environmental factors and medium components affecting microspore divisions and callus production. *J Hort Sci* **69**:417-426
- von Arnold S, Eriksson T** (1984) Effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* (L) Karst. *Plant Cell Tiss Org Cult* **3**:257-264
- Wang DY, Wergin WP, Zimmerman RH** (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of strawberry. *HortSci* **19**:71-72
- William RR, Tajim AM** (1987) Effect of temperature, darkness and gelling agent on long-term storage of *in vitro* shoot cultures of Austrian woody plant species. *Plant Cell Tiss Org Cult* **11**:51-156
- Ziv M, Meir G, Halevy AH** (1983) Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult* **2**:55-60
- Zimmerman RH** (1981) Micropropagation of fruit plants. *Acta Hort* **120**:217-222