

잎 절편 배양을 이용한 배 ‘신고’ (*Pyrus pyrifolia* cv. Niitaka)의 신초 재분화

김세희 · 신일섭 · 조강희 · 김대현 · 김현란 · 김기옥 · 이향분 · 도경란 · 천재안 · 황해성

Shoot regeneration via culture of leaf explants in pear (*Pyrus pyrifolia* cv. Niitaka)

Se Hee Kim · Il Sheob Shin · Kang Hee Cho · Dae Hyun Kim · Hyun Ran Kim · Ki Ok Kim
Hyang Bun Lee · Kyung Ran Do · Jae An Chun · Hae Seong Hwang

Received: 13 November 2013 / Accepted: 27 November 2013
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Genetic manipulation of pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) breeding is still difficult due to lack of reliable regeneration system. The aim of this research is to establish shoot regeneration system from leaf explants for pear (*P. pyrifolia* cv. Niitaka) using various concentrations of plant growth regulators and carbon source supplemented to medium. The highest regeneration rate of about 20% was found on a medium containing 4.4 g/L of Murashige and Skoog (MS) without vitamins, Linsmaier and Skoog (LS) vitamins were added separately. Leaf explants of pear were cultured on MS medium containing 7 g/L of Daishin agar supplemented with various concentrations of NAA (0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mg/L) in combination with BA(3, 5, 10 mg/L) for shoot regeneration. In medium with 5 mg/L of BA and 0.01 mg/L of NAA, adventitious shoot regeneration rate was higher than others treated. The optimal results were observed using MS medium supplemented with 30 g/L sorbitol as carbon source on regeneration system. Sorbitol is considered better carbon source than sucrose for shoot regeneration of pear (*P. pyrifolia* cv. Niitaka). In order to increase of shoot regeneration in pear (*P. pyrifolia* cv. Niitaka), plant agar and Daishin agar used as gelling agents, Daishin agar is more efficient in shoot regeneration.

서론

배나무는 장미과(*Rosaceae*), 배나무아과(*Pomoideae*), 배나무속(*Pyrus*)에 속하며 배나무속의 발상지는 중국 서부와 서남부의 산지로 알려져 있으며 일부는 동쪽으로 동아시아를 경유하여 한국과 일본으로 전파되었고, 또 다른 일부는 서쪽으로 전파되면서 두 갈래로 나뉘어 한 쪽은 중앙아시아와 내륙아시아로, 다른 한 쪽은 코카서스, 소아시아, 지중해 연안, 서부 유라시아로 전파되었다(Rubtsov 1944). 이러한 배나무속 식물들은 지리적 고립이나 적응 및 중간 교잡등과 같은 종분화 과정을 거치면서 진화되어 종의 다양성을 이루었고, 현재 생식용으로 재배되고 있는 배나무속 식물로는 남방형 동양배(*P. pyrifolia* Nakai)와 북방형 동양배(*P. ussuriensis* Maxim.) 그리고 서양배(*P. communis* L.)로 크게 나뉘어진다(Chalice and Westwood 1973). 우리나라에 자생하는 배나무속 식물은 우리나라 고유의 종이면서 2심실인 콩배(*P. fauriei* Schneid.)와 현재 우리나라 재배종의 대부분을 차지하고 있는 5심실의 돌배(*P. pyrifolia* Nakai) 그리고 우리나라 재래종과 중국배의 근간을 이루고 있는 산돌배(*P. ussuriensis* Maxim.) 등이 기본종을 이루고 있다. 배 품종의 개발은 재배적인 기술로 극복할 수 없는 단점을 보완하고 품질을 향상시켜 상품성을 증대하고 생력재배를 가능하게 할 수 있어 생산비를 줄일 수 있다. 지금까지의 전통적인 배 육종방법은 개화 결실에 이르기까지 걸리는 시간과 과실 특성의 평가와 선발에 따른 육종기간이 오래 소요될 뿐만 아니라 유전자의 직접 도입이 불가능하고 다양한 형질이 집적되어 있는 목표형질을 얻는데 시간과 노동력이 요구된다. 배의 품종개발을 위해서 대안으로 제시되고 있는 방법은 외래의 유용 유전자를 직접 도입하는 형질전환 방법이다. 그러나 형

S. H. Kim (✉) · I. S. Shin · K. H. Cho · D. H. Kim · H. R. Kim
K. O. Kim · H. B. Lee · K. R. Do · J. A. Chun · H. S. Hwang
농촌진흥청 국립원예특작과학원 과수과
(Fruit Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 440-706, Korea)
e-mail: ezsehee@korea.kr

질전환을 통한 외래 유전자의 도입은 대부분 기내에서 세포 배양의 과정을 거쳐 이루어지기 때문에 식물의 세포나 조직을 이용한 형질전환 연구가 성공적으로 수행되기 위해서는 조직배양체계의 확립이 선행되어야 한다. 식물 조직배양 기술은 유용물질 생산, 유용 유전자 도입을 통한 새로운 기능을 갖춘 신품종 개발 및 우량 종묘 생산 등의 목적을 위해 이용되고 있다. 조직배양 기술에 의한 식물체의 재분화 효율은 식물의 종에 따라 큰 차이를 보이고 동일한 종에서도 품종, 배양조직, 식물생장조절물질의 종류와 농도, 광조건에 의해 영향을 받으며(Garcia et al. 2011) 배양 배지에 첨가되는 물질, 지지체와 항생제에 의해서도 달라진다(Chevreau et al. 1997). 배나무의 조직배양은 배양 재료로 배배양(Tukey 1934)이 시초였으며 잎 절편(Chevreau et al. 1989), 경정분열조직(Lane 1979), 원형질체 유래 캘러스(Ochatt and Power 1988)로부터 재분화에 대한 연구가 보고되어 있다. 배의 정단분열조직을 이용한 대량증식법에 대한 초기 연구에서 배지에 첨가되는 cytokinin 종류(Cheng 1979)와 gibberellin 종류(Yotsuya 1980) 등 식물생장조절물질의 조건이 검토되었으며 증식단계에서의 지지체의 영향도 연구되었다(Singha 1984). 배 재분화에 관한 연구는 주로 잎 절편체에 관한 결과가 보고되어 있으며(Hennayake et al. 2003) 식물체 정단부에 있는 어린 잎이 아래 부분에 있는 성숙된 잎보다 재분화에 효율적이라고 보고되었다(Chevreau and Leblay 1993). 그러나 이러한 연구는 주로 서양배(*P. communis* L.)를 대상으로 한 것이며 동양배에서는 연구 결과가 부족하며 배양할 때 발근이 잘 되지 않는 어려움에 의해 아직 실용화 단계에 이르지 못하고 있다(Banno et al. 1982). 특히 남방형 동양배(*P. pyrifolia* Nakai)는 재분화가 어려운 종으로서 국내에서 신고 품종의 경정배양을 이용한 미세번식에 대한 결과가(Lee et al. 1998) 있었고, 잎 절편을 이용한 재분화 결과(Lee et al. 2002)도 보고되었지만 이 방법은 성공한 실험실에서만 국한됨으로서 보편화된 방법은 아니다. 본 연구실에서 선행연구 결과, 황금배 품종에서 재분화 조건이 확립되었지만 우리나라 배 재배면적의 80% 이상을 차지하고 있는 주요 품종인 신고에서 실용적인 재분화 조건을 확립하는 방법이 시급하다. 따라서 본 연구에서는 배 신고 품종의 잎 절편체의 재분화에 영향을 미치는 여러 요인들 중 식물생장조절물질로써 1-Naphthaleneacetic acid (NAA), benzylaminopurine (BA), Indole-3-butyric acid (IBA), thidiazuron (TDZ)의 농도에 따른 결과를 조사하였고, 비타민의 종류와 탄소원으로써 sucrose와 sorbitol의 적정 농도 그리고 지지체로써 plant agar와 Daishin agar의 효과를 규명하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구에 사용한 식물재료는 농촌진흥청 국립원예특작과학원에서 보존 중인 배 ‘신고’를 이용하였다. 1년생 휴면지를 채취하여 4°C에서 6주간 저온 처리를 하여 휴면을 타파시킨 후 액아를 유도하고, 발생한 액아를 70% EtOH로 세척한 다음 3.0%의 sodium hypochlorite 용액에서 10 분간 살균하고 멸균수로 5-10회 반복하여 세척하였다. 멸균된 액아는 BA 1 mg/L, sucrose 30 g/L, plant agar 10 g/L를 첨가하고 pH를 5.8로 조정된 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 치상하여 기내 도입을 유도하였다. 신초 증식 배양은 25°C로 조절되는 배양실에서 2,000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ 의 광도로 16 시간 광주기, 8 시간 암주기로 처리하였다. 8 주 간격으로 1~3 cm 정도 길이의 신초들을 BA 1 mg/L, IBA 0.1 mg/L, sucrose 30 g/L, plant agar 10 g/L를 첨가하고 pH를 5.8로 조정된 MS 배지에 치상하여 계대배양하였다.

식물생장조절물질이 식물체의 재분화에 미치는 영향

생장조절물질에 의한 식물체의 재분화율을 조사하기 위하여 cytokinin인 BA 3, 5, 10 mg/L, TDZ 1, 3, 5 mg/L, auxin인 NAA 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mg/L, IBA 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/L 농도로 혼용 처리하였다. 비타민의 영향을 보기 위해 비타민이 첨가되지 않은 MS 배지에 LS 비타민(Linsmaier and Skoog 1965)을 5 ml/L (thiamin HCL 0.4 mg/L, myo-inositol 100 mg/L)로 따로 첨가하였고, 대조구로는 비타민이 포함된 MS 기본 배지(thiamin HCL 0.1 mg/L, glycine 2 mg/L, nicotinic acid 0.5 mg/L, pyridoxin HCl 0.5 mg/L, myo-inositol 200 mg/L)를 사용하였다. 기내 도입된 식물체를 증식배지로 옮겨고 나서 3주 후부터 정단부의 유엽을 채취하여 엽병을 제거한 후 사각으로 잘라낸 잎 절편체를 다양한 조건의 재분화 배지에 처리구당 10개씩 6반복으로 치상하였다. 암처리에서 6주간 배양 후 16시간 광주기로 옮겨 2주간 배양하면서 각 처리당 신초의 재분화율을 조사하였다. 48종류의 처리구 중에서 재분화율이 높은 순서대로 2개의 처리구를 선발하여 100개씩 3반복으로, 선행된 실험과 동일한 방법으로 배양하여 신초의 재분화율을 비교 조사하였다.

탄소원과 지지체가 식물체 재분화에 미치는 영향

탄소원의 종류와 농도에 의한 재분화율을 조사하기 위해 MS 기본 배지에 sucrose와 sorbitol을 30 g/L로 첨가하였고, 지지체의 종류와 농도 조건을 알아보기 위해 plant agar 8

g/L와 Daishin agar 7 g/L의 처리구에 잎 절편체를 치상하여 선행된 실험과 동일한 방법으로 배양하여 신초의 재분화율을 조사하였다.

발근

신초로부터 뿌리를 유도하기 위해 1/2MS 배지에 비타민 (thiamin HCL 0.1 mg/L, glycine 2 mg/L, nicotinic acid 0.5 mg/L, pyridoxin HCl 0.5 mg/L, myo-inositol 200 mg/L)과 IBA 0.3 mg/L, sucrose 15 g/L, plant agar 8 g/L를 첨가하고 pH를 5.8로 조정된 배지에 옮겨 발근을 유도하였다.

결과 및 고찰

Auxin 처리에 따른 식물체 재분화

식물체 재분화는 성장조절물질의 조성과 절편체의 종류,

유전형 등 여러 가지 요인에 따라 많은 차이가 있지만 (Moon et al. 2000) 그 중에서도 대표적인 식물생장조절물질인 auxin과 cytokinin의 농도 비율에 따라서 기관발생 및 캘러스가 형성된다(Huetteman and Preece 1993). 배 신고 품종의 신초 재분화에 적합한 auxin의 농도를 찾기 위해서 NAA의 농도를 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mg/L (Table 1), IBA의 농도를 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/L (Table 2)로 고정하고 BA의 농도를 3, 5, 10 mg/L, TDZ의 농도를 1, 3, 5 mg/L를 각각 조합한 배지에 잎 절편체를 치상하였다. 배양 2 주 후부터 절편체의 절단면에서 소량의 캘러스가 발생하였으며 3 주 후에는 신초가 분화되기 시작하였고, 4 주가 지나면 여러 절편체에서 신초의 형성을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). NAA 농도에 따른 식물체 재분화는 0.01 mg/L의 낮은 농도에서 높은 재분화율 16.4%을 보인 반면 0.5mg/L의 높은 농도에서는 거의 신초를 형성하지 않았다(Table 1). IBA 처리구에서도 0.05 mg/L의 낮은 농도 배지에서 9%의 재분화율을 보였으며 이는 낮은 농도의 auxin에서 배 신고

Table 1 Effect of NAA in combination with BA and carbon source and gelling agents on shoot regeneration from leaf explants of pear (*Pyrus pyrifolia* cv. Niitaka)

Medium number	MS (g/L)+Vitamin (ml/L)	NAA (mg/L)	BA (mg/L)	Carbon source (g/L)	Gelling agents (g/L)	Formation of shoots (%)
1	MS 4.4 (including vitamin)	0.01	3	sucrose 30	Plant agar 8	1.8
2	MS 4.4 (including vitamin)	0.05	3	sucrose 30	Plant agar 8	1.8
3	MS 4.4 (including vitamin)	0.1	3	sucrose 30	Plant agar 8	0
4	MS 4.4 (including vitamin)	0.5	3	sucrose 30	Plant agar 8	0
5	MS 4.4 (including vitamin)	0.01	5	sucrose 30	Plant agar 8	0
6	MS 4.4 (including vitamin)	0.05	5	sucrose 30	Plant agar 8	3.6
7	MS 4.4 (including vitamin)	0.1	5	sucrose 30	Plant agar 8	3.6
8	MS 4.4 (including vitamin)	0.5	5	sucrose 30	Plant agar 8	0
9	MS 4.4 (including vitamin)	0.01	10	sucrose 30	Plant agar 8	0
10	MS 4.4 (including vitamin)	0.05	10	sucrose 30	Plant agar 8	1.8
11	MS 4.4 (including vitamin)	0.1	10	sucrose 30	Plant agar 8	0
12	MS 4.4 (including vitamin)	0.5	10	sucrose 30	Plant agar 8	0
13	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.01	3	sorbitol 30	Daishin agar 7	3.6
14	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.05	3	sorbitol 30	Daishin agar 7	1.8
15	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.1	3	sorbitol 30	Daishin agar 7	1.8
16	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.5	3	sorbitol 30	Daishin agar 7	1.8
17	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.01	5	sorbitol 30	Daishin agar 7	16.4
18	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.05	5	sorbitol 30	Daishin agar 7	0
19	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.1	5	sorbitol 30	Daishin agar 7	0
20	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.5	5	sorbitol 30	Daishin agar 7	0
21	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.01	10	sorbitol 30	Daishin agar 7	5.5
22	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.05	10	sorbitol 30	Daishin agar 7	7.3
23	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.1	10	sorbitol 30	Daishin agar 7	3.6
24	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.5	10	sorbitol 30	Daishin agar 7	0

품종의 잎으로부터 신초 형성이 일어나고 있음을 보여준다. 동양배의 재분화에 관한 연구결과에서 ‘풍수’(*Pyrus pyrifolia* cv. Housui)와 ‘행수’(*Pyrus pyrifolia* cv. Kousui)는 IBA 5 mg/L의 높은 농도에서 캘러스 형성과 발근을 유도하였으며(Hennayake et al. 2003) 선행 연구결과에서 ‘황금배’에서는 IAA 0.3 mg/L에서 높은 재분화율이 보고되었다(Chun et al. 2012). 이러한 차이는 품종에 따라 서로 다른 최적 auxin 농도를 가지는 것으로 보인다. 배 ‘신고’의 경우는 IBA 0.05 mg/L의 낮은 농도에서 높은 재분화율을 보인 연구 결과가 보고되었으나(Lee et al. 2002) 본 연구에서는 IBA 처리보다 NAA 0.01 mg/L의 낮은 농도가 신초의 재분화에 효과적인 auxin으로 나타났다(Table 1).

Cytokinin 처리에 따른 식물체 재분화

배 ‘신고’의 신초 재분화에 적합한 cytokinin의 농도를 찾기 위해서 NAA의 농도를 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mg/L (Table

1), IBA의 농도를 0.05, 0.1, 0.5, 1 mg/L (Table 2)로 고정하고 BA의 농도를 3, 5, 10 mg/L, TDZ의 농도를 1, 3, 5 mg/L를 각각 조합한 배지에 잎 절편체를 치상하였다. BA 농도에 따른 식물체 재분화는 5 mg/L의 농도에서 높은 재분화율 16.4%을 보였고(Table 1). TDZ 처리구에서도 1 mg/L의 낮은 농도 배지에서 9%의 재분화율을 보였다(Table 2). 배 신고 품종에서 동일한 농도의 TDZ 처리구가 66.7%의 높은 재분화율을 보인 연구 결과가 보고되었으나(Lee et al. 2002) 본 연구실에서는 재현이 되지 않았다(Table 2). 동양배의 재분화에 관한 연구결과에서 ‘풍수’와 ‘행수’는 TDZ 5 mg/L의 높은 농도에서 식물체 재분화가 잘 되었으며(Hennayake et al. 2003) ‘황금배’에서는 TDZ 0.25 mg/L에서 높은 재분화율이 보고되었다(Chun et al. 2012). 지금까지 TDZ는 cytokinin과 유사한 역할을 하는 물질로 난(Nayak and Rath 1997)에서 식물체 재분화에 매우 유용하다는 연구 결과가 있었고 목본식물에서도 신초의 증식에 효과적인 생장조절물질로 조직배양에 이용되고 있다(Huetteman

Table 2 Effect of IBA in combination with TDZ and carbon source and gelling agents on shoot regeneration from leaf explants of pear (*Pyrus pyrifolia* cv. Niitaka)

Medium number	MS (g/L)+Vitamin (ml/L)	IBA (mg/L)	TDZ (mg/L)	Carbon source (g/L)	Gelling agents (g/L)	Formation of shoots (%)
25	MS 4.4 (including vitamin)	0.05	1	sucrose 30	Plant agar 8	1.8
26	MS 4.4 (including vitamin)	0.1	1	sucrose 30	Plant agar 8	0
27	MS 4.4 (including vitamin)	0.5	1	sucrose 30	Plant agar 8	0
28	MS 4.4 (including vitamin)	1	1	sucrose 30	Plant agar 8	0
29	MS 4.4 (including vitamin)	0.05	3	sucrose 30	Plant agar 8	1.8
30	MS 4.4 (including vitamin)	0.1	3	sucrose 30	Plant agar 8	0
31	MS 4.4 (including vitamin)	0.5	3	sucrose 30	Plant agar 8	0
32	MS 4.4 (including vitamin)	1	3	sucrose 30	Plant agar 8	0
33	MS 4.4 (including vitamin)	0.05	5	sucrose 30	Plant agar 8	0
34	MS 4.4 (including vitamin)	0.1	5	sucrose 30	Plant agar 8	1.8
35	MS 4.4 (including vitamin)	0.5	5	sucrose 30	Plant agar 8	0
36	MS 4.4 (including vitamin)	1	5	sucrose 30	Plant agar 8	1.8
37	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.05	1	sorbitol 30	Daishin agar 7	9
38	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.1	1	sorbitol 30	Daishin agar 7	3.6
39	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.5	1	sorbitol 30	Daishin agar 7	1.8
40	MS 4.4+LS Vitamin 5	1	1	sorbitol 30	Daishin agar 7	7.3
41	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.05	3	sorbitol 30	Daishin agar 7	0
42	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.1	3	sorbitol 30	Daishin agar 7	0
43	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.5	3	sorbitol 30	Daishin agar 7	3.6
44	MS 4.4+LS Vitamin 5	1	3	sorbitol 30	Daishin agar 7	0
45	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.05	5	sorbitol 30	Daishin agar 7	1.8
46	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.1	5	sorbitol 30	Daishin agar 7	1.8
47	MS 4.4+LS Vitamin 5	0.5	5	sorbitol 30	Daishin agar 7	0
48	MS 4.4+LS Vitamin 5	1	5	sorbitol 30	Daishin agar 7	1.8

and Preece 1993). 그러나 벼에서는 TDZ을 첨가하면 재분화된 식물체로부터 상당수의 식물이 기형을 보인다는 연구결과가 있으며(Seo et al. 2002), 배에서도 BA보다 TDZ가 식물체의 유리화 현상을 촉진한다는 보고가 있다(Caboni et al. 1999; Kadota and Niimi 2003). 따라서 본 연구는 cytokinin류에 있어 TDZ 처리보다 BA의 처리가 배 신품종의 신훈 발생과 식물체를 분화시키는 조건에 있어 적합하다고 판단된다.

식물체 재분화 과정에 탄소원과 지지체의 영향

Sucrose와 sorbitol은 식물 조직배양에서 에너지와 탄소원 그리고 삼투압 조절제로서 많이 사용되고 있다. 선행 연구결과 탄소원의 농도에 따른 ‘황금배’ 품종의 재분화율에서 30 g/L의 농도가 15 g/L의 농도보다 높은 신훈 생성 결과를 보여주어서(Chun et al. 2012) 탄소원의 농도는 30 g/L로 고정하고 sucrose와 sorbitol의 영향을 비교한 결과 sorbitol에서 신훈 재분화율이 높게 나타났다(Table 1, 2). Sucrose는 열에 약해서 배지의 멸균 시간이 길어지거나 압력이 높아지면 단당류인 glucose나 fructose로 변하기 때문에 세가지의 당이 혼재할 수 있고 이는 재분화율을 억제하는 요인이 될 수 있다. Sorbitol은 배(Kadota and Niimi 2003), 사과(Sotiropoulos et al. 2006)에서 신훈의 재분화에 sucrose보다 효과적이라는 연구결과가 보고되었다. 열대과수인 가시여지(*Annona muricata* L.)의 재분화에서 sucrose 처리에 의해 캘러스가 증식하는 반면 재분화율은 감소하였는데(Lemos and Baker 1998), 이는 캘러스의 생장이 신훈의 재분화에 영향을 미치는 것으로 판단된다. 본 연구에서는 절편체 단면에서 약간의 캘러스가 생성이 되기는 하지만 발생한 신훈들은 캘러스가 아닌 식물체로부터 직접 분화된 것이다. 조직배양에서 plant agar를 지지체로 많이

사용하는데 본 연구에서는 재분화가 잘 되지 않는 배 ‘신훈’의 신훈 발생을 위해 plant agar와 Daishin agar를 비교 처리하였다. Daishin agar는 gel strength가 min. 700~800 g/cm²이고 plant agar는 min. 1,100 g/cm²로 차이가 나며 재분화율은 Daishin agar에서 재분화된 신훈이 더 많이 발생하는 것으로 보아 식물체 재분화에는 Daishin agar가 더 효과적인 것으로 판단된다. 잎 절편체에서 신훈이 분화되는 과정을 보면 배지에 이식 후 3~4일까지는 신훈이 생성되지 않고 절편체의 비대현상이 관찰되며 배양 7일 후 신훈 분화가 일어난다. 배양 2주후에는 엽원기로부터 어린잎이 전개된 다음(Fig. 1B) 배양 5주후에는 정상적인 식물체로 분화하였다(Fig. 1A). 배양기간이 경과할수록 절편체에서 다수의 신훈이 분화되는 것이 관찰되었다. 배양된 잎 절편체로부터 유기된 신훈에서 정상적인 개체로 성장한 식물체를 증식배지(BA 1 mg/L, IBA 0.1 mg/L, sucrose 30 g/L, plant agar 10 g/L)로 옮긴 후 1주차, 4주차, 8주차(Fig. 2A, B, C)에 관찰하였고, IBA 0.1 mg/L를 첨가한 발근배지로 옮겨 뿌리 발생을 관찰하였다(Fig. 2D). 본 연구실에서 배 재분화에 관한 선행 연구결과 ‘황금배’의 재분화율은 76.7%로 매우 높게 나타났으나 1차 재분화 실험에서 가장 적합한 배지에서 ‘신훈’의 재분화율은 16.4%로 나왔고, 48종류의 처리구 중에서 재분화율이 높은 순서대로 2개의 처리구를 선발하여 2차 재분화 실험에서 100개씩 3반복으로 실험한 결과 20%까지 향상되기는 하였지만 ‘황금배’의 재분화율 보다 낮았다. 이는 품종과 유전형에 따른 차이로 생각되며 GUS transient expression system 실험에서도 ‘황금배’의 잎에서는 GUS 발현이 관찰되었지만 재분화율이 낮은 ‘신훈’의 잎에서는 GUS 발현이 관찰되지 않았다(자료미제시). 본 연구에서는 우리나라 주요 품종인 배 ‘신훈’의 재분화 조건을 규명하였으며, 이러한 결과들은 배의 조직배양 효율 향상에 직접 이용될

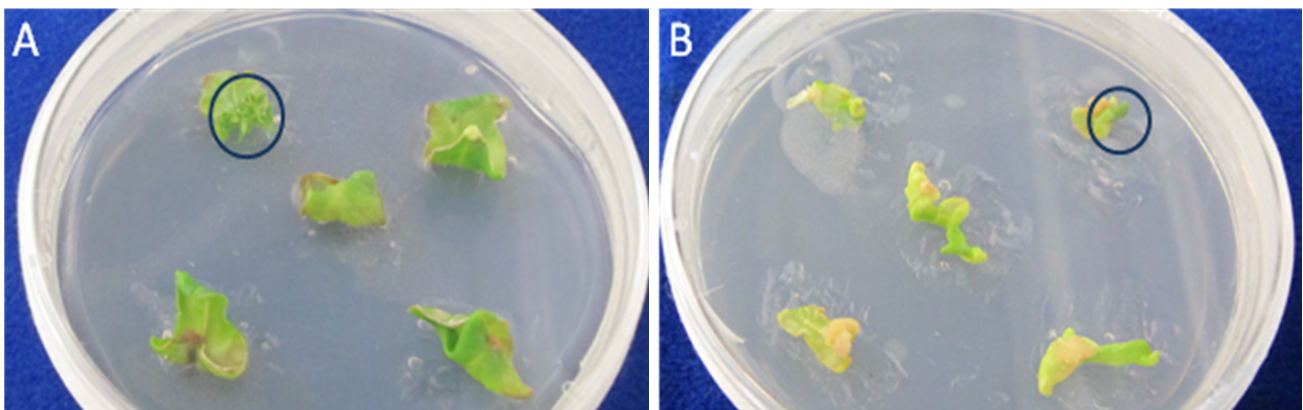


Fig. 1 Plant regeneration from the leaf explants of pear (*Pyrus pyrifolia* cv. Niitaka) on shoot induction medium A. Adventitious shoot on MS medium supplemented with LS Vitamin 5 ml/L+NAA 0.01 mg/L+BA 5 mg/L+sorbitol 30 g/L+Daishin agar 7 g/L B. Adventitious shoot on MS medium supplemented with LS Vitamin 5 ml/L+IBA 0.01 mg/L+TDZ 1mg/L+sorbitol 30 g/L+Daishin agar 7 g/L

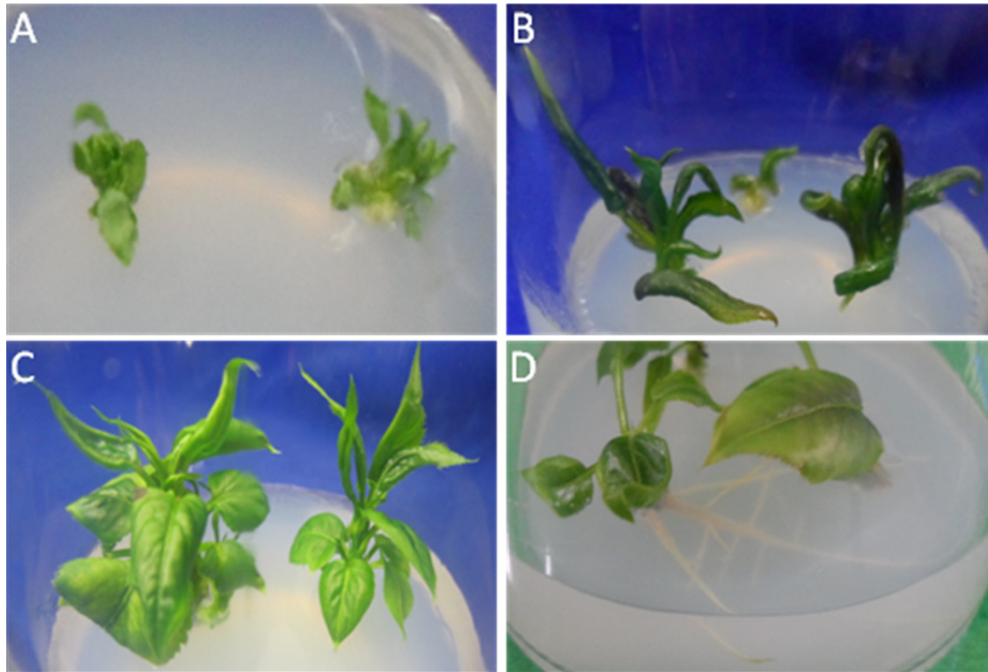


Fig. 2 Adventitious shoot formation and plant regeneration of tissue cultures in pear (*Pyrus pyrifolia* cv. Niitaka). (A) 1 weeks after transfer proliferating on the MS medium supplemented with BA 1 mg/L+IBA 0.1 mg/L (B) 4 weeks after transfer proliferating MS medium (C) 8 weeks after transfer proliferating MS medium (D) Rooting on the MS medium supplemented with IBA 0.3 mg/L

수 있을 뿐만 아니라 조직배양 기법을 이용한 배의 형질 전환 효율 향상에도 매우 유익하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

남방형 동양배(*Pyrus pyrifolia* Nakai)의 형질전환은 적합한 재분화 체계가 구축되어 있지 않아 어려운 실정이다. 본 연구의 목적은 배 신품종(*P. pyrifolia* cv. Niitaka)의 효율적인 재분화 체계를 개발하기 위해 식물생장조절제의 농도, 탄소원, 지지체 등이 신품종 재분화에 미치는 영향을 연구하기 위하여 수행하였다. 생장조절제의 영향을 알아보기 위하여 NAA 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 mg/L과 BA 3, 5, 10 mg/L을 조합하여 처리한 결과 BA 5 mg/L과 NAA 0.01 mg/L의 조합에 Daishin agar 7 g/L과 Linsmaier and Skoog (LS) vitamin을 따로 첨가한 Murashige and Skoog (MS) 배지에서 재분화율이 20%로 나왔다. 효율적인 재분화 체계를 위한 탄소원으로는 sorbitol 30 g/L가 사용되었으며 배 ‘신품종’의 재분화에는 sucrose보다 sorbitol이 더 적합한 것으로 판단된다. 재분화가 잘 되지 않는 배 ‘신품종’의 신품종 재분화율을 높이기 위해 지지체로 plant agar와 Daishin agar를 사용하였으며 Daishin agar에서 재분화율이 더 높게 나타났다.

사 사

이 논문은 2013년 농촌진흥청 원예연구사업(PJ006595 2013)의 지원에 의해 수행하였습니다.

References

- Banno K, Yoshida K, Hayashi S, Tanabe K (1982) In vitro propagation of Japanese pear cultivars. J Japan Soc Hort Sci 58:37-42
- Bustos MM, Battraw MJ, Kalkan FA, Hall TC (1991) Transient gene expression in electroporated bean cotyledon protoplasts. Plant Mol Biol Rep 9:322-332
- Carboni E, Tonelli MG, Lauri P, Angeli SD, Damiano C (1999) In vitro shoot regeneration from leaves of wild pear. Plant Cell Tissue Organ Cult 59:1-7
- Challice JS, Westwood MN (1973) Numerical taxonomic studies of the genus *Pyrus* using both chemical and botanical characters. Bot J Linn Soc 67:121-148
- Cheng TY (1979) Micropropagation of clonal fruit tree rootstocks. Compact Rruit Trees 12:127-137
- Chevreau E, Leblay C (1993) The effect of mother plant pretreatment and explants choice on regeneration from in vitro pear leaves. Acta Hort 336:263-268
- Chevreau E, Mourgues F, Martine N, Chevalier M (1997) Effect of gelling agents and antibiotics on adventitious bud regeneration from in vitro leaves of pear. In Vitro Cell Dev Biol Plant 33:173-179

- Chevreau E, Skirvin RM, Abu-Qaoud HA, Korban SS, Sullivan JG (1989) Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of three pear (*Pyrus sp.*) cultivars in vitro. *Plant Cell Rep* 7:688-691
- Chun JA, Do KR, Kim SH, Cho KH, Kim HR, Hwang HS, Shin IS (2012) In vitro shoot regeneration from leaf tissue of ‘Whangkeumbae’ pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) *J Plant Biotechnol* 39:288-294
- Garcia R, Pacheco G, Falcão E, Borges G, Mansur E (2011) Influence of type of explants, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 106:47-54
- Hennayake CK, Dissanayake K, Matsuda N, Takasaki T, Nakanishi T (2003) An Efficient and reproducible in vitro plant regeneration from leaf discs in pear cultivars (*Pyrus spp.*). *Plant Biotechnol* 20:283-289
- Huetteman CA, Preece JE (1993) Thidiazuron: A potent cytokine for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 33:105-119
- Kadota M, Niimi Y (2003) Effect of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 72:261-265
- Kapila J, Rycke RD, Van Montagu M, Angenon G (1997) An *Agrobacterium* mediated transient expression system for intact leaves. *Plant Sci* 122:101-108
- Kim SH, Kim JH, Kim KO, Do KR, Shin IS, Cho KH, Hwang HS (2011) GUS gene expression and plant regeneration via co-culturing with *Agrobacterium* in grapevine (*Vitis vinifera*). *J Plant Biotechnol* 38:308-314
- Lane WD (1979) Regeneration of pear plants from shoot meristem-tips. *Plant Sci Lett* 16:337-342
- Lee CH, Kim CS, Kim SB (1989) In vitro shoot tip culture of pear ‘Niitaka’ as related to tree vigor, sampling time and plant growth regulators. *Korean J plant tissue culture* 25:159-163
- Lee CH, Kim CS, Kim SB, Noh YM, Han DH, Ban SJ, Kang SK, Kang SJ (2002) Development of efficient regeneration system for *Pyrus pyrifolia* cv. Nitaka from leaf segments. *J Kor Soc Hort Sci* 43:271-274
- Lemos EEP Baker DA (1998) Shoot regeneration in response to carbon source on intermodal explants of *Annona muricata* L. *Plant Growth Regul* 25:105-112
- Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 18:100-127
- LI ZT, Dhekney S, Dutt M, Van Aman M, Tattersall J, Kelley KT, Gray DJ (2006) Optimizing *Agrobacterium*-mediated transformation of grapevine. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 42:220-227
- Moon JG, Choo BK, Doo HS, Kwon TH, Yahn MS, Ryu JH (2000) Effect of growth regulators on plant regeneration from the cotyledon explants in oriental melon (*Cucumis melo* L.). *Kor J Plant Tiss Cult* 27:1-6
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Phyiol Plant* 15:473-497
- Nayak PS, Rath SP (1997) Direct shoot regeneration from foliar explants of apiphytic orchid, *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatter and McCann. *Plant Cell Rep* 16:583-586
- Ochatt SJ, Power JB (1988) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of Williams’ Bon Chretien (syn. Bartlett) pear (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell Rep* 7:587-589
- Rubtsov GA (1944) Geographical distribution of the genus *Pyrus* and trends and factors in its evolution. *Am Nat* 78:358-366
- Seo MS, Bae CH, Choi DO, Rhim SL, Seo SC, Song PS, Lee HY (2002) Investigation of transformation efficiency of rice using *Agrobacterium tumefaciens* and high transformation of GPAT (*glycerol-3-phosphate acyltransferase*) gene relative to chilling tolerance. *Korean J Plant Biotechnology* 29:85-92
- Singha S (1984) Influence of two commercial agars on in vitro shoot proliferation of ‘Almey’ crabapple and *Pyrus communis* ‘Seckel’. *Hort Science* 19:227-228
- Sotiropoulos TE, Molassiotis AN, Mouhtaridou GI, Papadakis I, Dimassi KN, Therios IN, Diamantidis G (2006) Sucrose and sorbitol effects on shoot growth and proliferation in vitro nutritional status and peroxidase and catalase isoenzymes of M9 and MM106 apple (*Malus domestica* Borkh.) rootstocks. *Europ J Hort Sci* 71:114-119
- Tukey HB (1934) Artificial culture methods for isolated embryos of deciduous fruits. *Proc Am Soc Hort Sci* 32:630-665
- Vidal JR, Kikkert JR, Wallace PG, Reisch BI (2003) High-efficiency biolistic co-transformation and regeneration of ‘Chardonnay’ (*Vitis vinifera* L.) containing npt-II and antimicrobial peptide genes. *Plant Cell Rep* 22:252-260
- Yotsuya D (1980) Effects of GA₄₊₇ and BA on the in vitro growth of ‘Kosui’ leaf bud. *Sci Rep Fac Kobe Univ* 14:45-49