

## 스프레이국화 ‘퍼플엔디’의 꽃잎 배양에 있어서 식물체 재분화요인

이현숙 · 박현로 · 김현석 · 김창길

### Factors influencing shoot regeneration from petal explant in spray mum ‘Purple ND’

Hyun Suk Lee · Hyun Rho Park · Hyun seak Kim · Chang Kil Kim

Received: 15 October 2015 / Revised: 12 November 2015 / Accepted: 12 November 2015  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** This experiment compared the regeneration conditions of the radiation mutant spray chrysanthemum ‘purple ND’. The four different flower blooming stages (S1: 10% opened flower, S2: 30% opened flower, S3: 50% opened flower, and S4: 70% opened flower) and different petal parts (TBOP: the basal of petal and TEOP: the end of petal) were used to compare regeneration conditions between plants grown in MS medium supplemented with IAA and BAP. The highest adventitious shooting rate was identified in plants grown on the IAA 1.0mg·L<sup>-1</sup> and BAP 2.0mg·L<sup>-1</sup> when using the end of petal at the S2 stage. It displayed 79.2% regeneration and produced 33.4 shoots. Rooted plantlets were successfully established in the greenhouse, showing the same morphological characteristics of vegetative and reproductive organs with those of the mother plant. Flow cytometry analysis revealed no ploidy variation between the regenerated plants and the mother plant grown under greenhouse conditions.

**Keywords** Spray chrysanthemum, Adventitious shoot, Petal explants, IAA, BAP

### 서론

국화는 생산액의 27%를 점유하고 있고 화훼작물 중 절화 생산 비중이 높은 작목이며 국제신품종보호연맹(UPOV)의 규제가 강화되면서 외국품종을 재배할 경우 그 품종에 대한 로열티 지불이 불가피하게 되었다(Choi 2002). 또한 우리나라도 2001년에 UPOV에 가입하여 2012년부터는 전 화훼작물이 품종보호대상작물로 지정되어 그동안 도입품종으로 재배한 화훼작물은 모종 가격에 로열티가 포함됨으로써 재배 농가에게는 상승한 종묘구입비가 큰 부담으로 남게 되었다. 2014년 말 현재 우리나라에 등록된 국화는 734품종이며(국립종자원 2014), 이 중 국내육성품종은 458품종으로 개인육종가와 종자업체가 등록된 124품종을 제외하면 대부분은 국립원예특작과학원을 비롯한 국내 지방자치단체 연구기관에서 육성된 것이다. 매년 다수의 새로운 품종이 육성됨에도 불구하고 아직까지는 소비자와 재배자의 기호도와 맞는 품종이 그다지 많지 않은 실정이다.

우리나라 국화품종 육성은 주로 교배육종에 의존하고 있고 화훼육종 선진국에서 시도하고 있는 방사선조사를 통한 화색 돌연변이유기 등과 같은 새로운 기법은 활성화되지 못하고 있다. 1990년대부터 국화에서 방사선을 이용하여 화색, 화형, 꽃의 크기 등의 형질을 개선한 보고들이 있고(Broertjes 1996; Datta et al. 2001; Mandal and Datta 2005) 육성된 품종들은 스프레이국화의 경우 이미 선진국에서는 품종시리즈로 개발하여 상업적으로 적극 활용하고 있다. 국화의 방사선 돌연변이 육종은 삼수나 어린식물체에 방사선을 조사하여 방사선 처리세대에서 변이체를 선별하는데 이때 고정된 형태의 돌연변이체(solid type)가 발생하기도 하지만 꽃의 일부에서 돌연변이가 발생하는 주연구분 키메라(mericlinal chimera)나 구

Hyun Suk Lee · Hyun Rho Park · Hyun seak Kim  
경북농업기술원  
(Gumi Floricultural Experiment Station, Gyeongsangbuk-do  
Agricultural Research & Extension Services, Gumi 730-831,  
Korea)

Chang Kil Kim (✉)  
경북대학교  
(Department of Horticultural Science, Kyungpook National  
University, Taegu 702-701, Korea)  
e-mail: ckkim@knu.ac.kr

분 키메라(sectorial chimera)가 발생하기도 한다. 이러한 키메라 돌연변이의 경우 삽목을 하면 다음 세대에서 분리가 일어나거나 변이가 소실될 수 있기 때문에 꽃잎배양을 통해 돌연변이체를 고정된 계통으로 육성할 필요가 있다. 이러한 육종기법을 적용하기 위하여 경상북도농업기술원 구미화훼시험장에서는 교배육종을 통하여 2011년 8월에 국립종자원에 품종보호 등록한(품종보호 제 3610호) ‘퍼플엔디’를 대상으로 돌연변이 유기를 시도하고 있다. ‘퍼플엔디’는 자주색의 겹꽃 화형이며 10월 중순에 자연개화하는 중생추국으로 개화반응이 7주인 조기개화성으로 농가와 소비자의 기호도가 매우 높은 품종이다. 일반적으로 국화재배에 있어서 개화반응일수가 짧은 품종을 재배하게 되면 재배기간단축으로 노동력과 경비절감의 요인이 되어 품종선택의 중요한 조건으로 알려져 있다. 더욱이 겹꽃은 홑꽃보다 조기에 개화하는 품종이 드물어 품종개발이 시급한데 ‘퍼플엔디’의 경우 조기개화성이면서 겹꽃인 특성을 지니고 있어 돌연변이 유기를 위한 유용한 육종재료로 다양한 화색의 품종시리즈로 개발할 가치가 있다. 이에 수반되는 과정 중에서 화색돌연변이체를 고정하기 위해서는 꽃잎배양기술이 필수적이고 꽃잎유래 부정아의 유기 및 shoot 양성의 실용적인 배양조건을 밝힐 필요가 있다.

지금까지 국화의 조직배양은 잎(Himstedt et al. 2001), 꽃가루 또는 꽃(Mandal and Datta 2005; Petty et al. 2003), 정아(Waseem et al. 2009; Zalewska et al. 2007)와 줄기(Annadana et al. 2000; Himstedt et al. 2001; Park et al. 2007) 등 다양하게 시도되었지만 꽃잎배양에 대한 세밀한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 실험은 스프레이 국화 ‘퍼플엔디’의 전개된 꽃잎을 이용하여 배양 절편체 부위와 성장조절제(IAA, BAP)의 처리가 부정아 유기 및 신초형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

실험에 사용한 식물재료는 자주색의 겹꽃 화형을 가진 절화용 스프레이국화 ‘퍼플엔디’로 하였고 꽃잎의 개화전개 정도를 4단계로 구분하여 배양하였다. 1단계는 단일처리 42일 후 꽃봉오리가 10% 정도 개화한 상태, 2단계는 단일처리 45일 후 꽃봉오리가 30% 정도 개화한 상태, 3단계는 단일처리 48일 후 꽃봉오리가 50% 정도 개화한 상태에서 채취하였고, 4단계는 단일처리 51일 후 꽃봉오리가 70% 이상 개화한 상태로 구분하였다. 채취한 꽃봉오리에서 꽃잎을 하나씩 분리하여 전착제(Tween 20)한 방울을 첨가한 수돗물로 세척한 다음 Clean bench에

서 표면 살균하였다. 분리한 꽃잎의 표면살균은 1% 차아염소산나트륨(NaOCl) 수용액에 15분간 침지소독한 후 멸균수로 3회 세척하였다. 세척한 꽃잎은 멸균한 필터페이퍼를 이용하여 표면에 남아있는 수분을 제거한 후 꽃잎의 길이로 중간부위에서 가로로 2등분한 후 꽃잎의 기부부분(the basal of petal; TBOP)과 끝부분(the end of petal; TEOP)으로 구분하여 배지위에 치상하였다.

### 배양조건

부정아 유기를 위하여 사용한 배지는 MS (Murashige and Skoog 1962) 무기염에 3% sucrose, 0.7% agar를 첨가하여 pH는 5.8로 조정하였다. 식물성장조절제는 IAA와 BAP를 단용 또는 혼용하였고 IAA는 0, 1.0 mg·L<sup>-1</sup>, BAP는 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg·L<sup>-1</sup>의 농도로 각각 처리하였다. 15분간 고압 멸균한 배지는 clean bench하에서 직경 100 mm, 높이 15 mm의 일회용 petri-dish에 30 ml씩 분주하여 사용하였고, 꽃잎배양 절편체는 4개씩 12반복으로 치상하였다. 배양 6주 후에 부정아 유기와 shoot 발생정도를 조사하였고 기외이식 가능한 shoot수는 신장과 발근이 진행된 shoot 수를 조사하였다. 꽃잎배양 유래 shoot는 MS 무기염에 3% sucrose, 0.7% agar를 첨가한 배지에서 shoot 신장과 발근을 유도한 후 육묘용 원예상토(그린-소일, 토비테크)에 이식하여 순화시켰다.

### Flow cytometry

꽃잎배양을 통하여 획득한 재분화 식물체와 모본과의 염색체의 배수성을 확인하고자 비닐하우스에서 재배중인 식물체로부터 0.5 cm<sup>2</sup> 크기로 잎을 채취하여 0.25 mL의 HR-A 용액(Partec사)을 첨가하고 조직을 chopping하였다. 이 조직액을 30 μm의 막(Partec CellTrics)에 통과시킨 후 실온에서 5분간 방치하였다. 여기에 1.0 mL의 HR-B 용액(Partec사)을 첨가하여 염색한 다음 flow cytometer (Partec PA-II, 독일)를 사용하여 각 세포 당 DNA함량을 측정하고 peak의 위치를 조사하여 배수성을 판별하였다.

### 생육특성 조사

순화 후 생산된 유묘는 7월 23일에 구미화훼시험장 육종 온실의 토양에 12.5 cm × 12.5 cm 간격의 절화용 네트를 설치한 후 꽃잎배양 유래의 유묘와 ‘퍼플엔디’의 삽목 증식묘와 생육비교하기 위하여 각각 30개체씩 정식하였다. 재배는 토경관비 표준재배법(RDA 2002)에 준하였고 그 이후의 생육 및 개화특성을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

국화 스프레이 품종 ‘퍼플엔디’의 꽃잎을 배양하여 부정아를 유도하기 위해 꽃봉오리의 개화전개 정도에 따라서 10% 개화(S1), 30% 개화(S2), 50% 개화(S3)와 70% 개화(S4)로 구분하여 배양하였을 때 전반적으로 개화전개율이 높아질수록 부정아 분화율이 낮아지고 신초형성 수가 적어지는 경향이었다(Table 1). 개화전개 정도가 10%인 S1단계에서는 BAP 단독보다는 IAA와 BAP를 혼용처리하였을 때 부정아 분화율이 높고 신초형성 수가 많았으

며 BAP 농도가 높아질수록 신초형성 형성이 많았다. S2 단계에서도 S1단계와 마찬가지로 BAP 농도가 높아질수록 신초형성 형성이 많았고 BAP 단독처리에서 신초형성이 되었으나 IAA와의 혼용에서 훨씬 더 많이 shoot가 형성되었다. S3, S4단계에서는 IAA와 BAP의 처리에 따라 뚜렷한 경향치가 보이지 않았고 IAA 1 mgL<sup>-1</sup>+BAP 1 mgL<sup>-1</sup> 처리구가 두 단계에서 가장 많은 신초가 형성되었다. 전반적인 배지조성에서 S1과 S2단계가 부정아 분화율이 높았는데 이러한 결과는 발육단계에 있는 조직이 체세포배 발생과 부정아유도에 유리하다는 보고(Gilissen et al. 1996;

**Table 1** Effects of IAA and BAP concentrations on adventitious shoot formation and number of shoots from petal explants in chrysanthemum ‘Purple ND’

PGR (mg·L <sup>-1</sup> )		Stage1 <sup>a</sup>		Stage2 <sup>b</sup>		Stage3 <sup>c</sup>		Stage4 <sup>d</sup>	
IAA	BAP	Adventitious shooting (%)	No. of shoots	Adventitious shooting (%)	No. of shoots	Adventitious shooting (%)	No. of shoots	Adventitious shooting (%)	No. of shoots
0.0	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-
	1.0	-	-	4.2	1.0d	-	-	-	-
	2.0	-	-	4.2	1.0d	-	-	-	-
	5.0	4.2	2.3c <sup>e</sup>	16.6	2.9cd	4.2	1.0d	-	-
1.0	0.5	20.8	6.6c	18.7	8.1c	25.0	5.3c	20.8	6.4c
	1.0	45.8	21.7ab	58.3	22.4b	16.6	23.8a	14.6	17.6a
	2.0	69.2	29.4a	79.2	36.7a	8.3	9.3bc	16.7	10.3bc
	5.0	70.0	20.2ab	77.1	19.2bc	16.6	12.3b	12.5	12.5b

<sup>a</sup>Stage1: the flower was blooming with the petals splay out of 10%

<sup>b</sup>Stage2: the flower was blooming with the petals splay out of 30%

<sup>c</sup>Stage3: the flower was blooming with the petals splay out of 50%

<sup>d</sup>Stage4: the flower was blooming with the petals splay out of 70%

<sup>e</sup>Mean separation within columns by Duncan’s multiple range test at p = 0.05

**Table 2** Effects of IAA and BAP concentration on adventitious shoot formation, number of shoots, and number of established plantlet from different part of petal explants in chrysanthemum ‘Purple ND’<sup>a</sup>

IAA (mg·L <sup>-1</sup> )	BAP (mg·L <sup>-1</sup> )	TBOP <sup>b</sup>			TEOP <sup>c</sup>		
		Adventitious shooting (%)	No. of shoots	No. of established plantlet	Adventitious shooting (%)	No. of shoots	No. of established plantlet
0.0	0.5	-	-	-	-	-	-
	1.0	4.2	1.0d <sup>d</sup>	1.0d	-	-	-
	2.0	4.2	1.0d	1.0d	-	-	-
	5.0	16.6	4.0cd	4.0cd	16.6	1.8d	4.0d
1.0	0.5	20.8	8.6c	5.0c	16.6	7.5c	8.6cd
	1.0	45.8	21.7b	15.2b	70.8	23.0b	16.7b
	2.0	79.2	29.4a	20.4a	79.2	43.9a	33.4a
	5.0	75.0	20.2b	8.2c	79.2	18.2bc	10.2c

<sup>a</sup>Petals were cultured at the flower was blooming with the petals splay out of 30%

<sup>b</sup>TBOP: the basal of petal

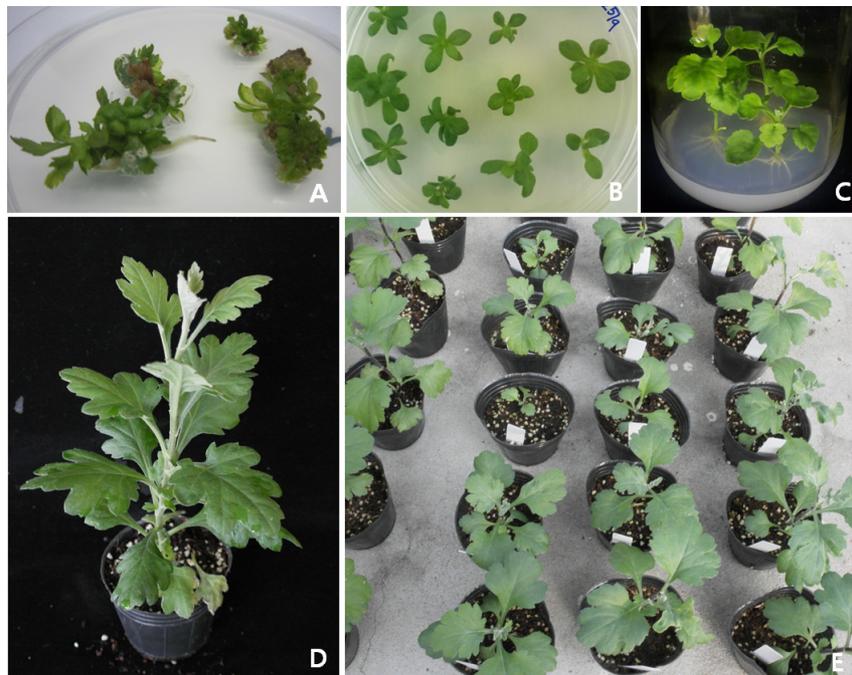
<sup>c</sup>TEOP: the end of petal

<sup>d</sup>Mean separation within columns by Duncan’s multiple range test at p = 0.05

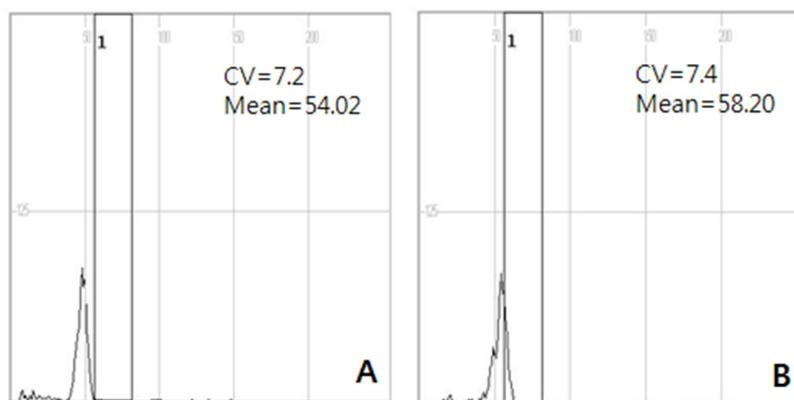
Lu et al. 1982)와 유사하였는데 꽃잎조직에 있어서도 어린조직이 재분화에 유리함을 알 수 있었다.

신초형성이 양호하였던 S2 단계일 때 꽃잎을 채취하여 꽃잎길이의 중간부분에서 가로로 절단하여 기부부분(TBOP)과 끝부분(TEOP)으로 나누어 배양하였을 때 부정아 형성정도와 기외이식 한 신초형성 수를 조사하였다 (Table 2, Fig. 1A). 꽃잎의 기부부분(TBOP)은 BAP 단용과 IAA와의 혼용에서 모두 농도가 높아질수록 신초형성이 많아지는 경향이였으나 IAA와의 혼용에서는 BAP 5 mg·L<sup>-1</sup>로 높아졌을 때 부정아 형성과 신초형성 수가 BAP 2 mg·L<sup>-1</sup>

보다도 각각 4%, 9.4개 정도 더 감소하였다. 그러나 꽃잎의 끝부분(TEOP)을 배양재료로 하였을 때 BAP 단용에서는 부정아 형성이 저조하였으나 IAA 1 mg·L<sup>-1</sup>와 혼용할 경우 BAP의 농도가 높아질수록 부정아 형성율, 신초형성 수, 기외 이식한 신초형성 수도 증가하는 경향이였다. 부정아 형성율을 볼 때 BAP 2~5 mg·L<sup>-1</sup>일 때 79.2%로 가장 높았으나 신초형성 수와 기외 이식한 재분화된 식물체 수는 BAP 2 mg·L<sup>-1</sup>일 때 43.9개, 33.4개로 5 mg·L<sup>-1</sup>일 때 보다 25.7개, 23.2개가 더 많았다(Fig. 1B). 이러한 결과는 BAP 농도가 높을 경우 불량 묘 발생으로 인한 묘 손실에



**Fig. 1** Plant regeneration through shoot organogenesis from petal explants of Chrysanthemum cv. Purple ND. (A) Formation of shoot primordia on cultured petal surfaces. (B) Development of shoot primordia into shoots. (C) Regenerated shoot growth and rooting. (D, E) Acclimatization of in vitro regenerated plantlets to the greenhouse



**Fig. 2** Analysis of the ploidy level using flow cytometry analysis of Chrysanthemum cv. Purple ND, mother plants (control) or regenerated plants via shoot organogenesis. A. Histogram of mother plants (control, hexaploid) planted in the greenhouse. B. Histogram of shoot organogenesis-obtained plant derived from medium containing 2 mg·L<sup>-1</sup> of benzyladeninepurine and 1 mg·L<sup>-1</sup> of indolacetic acid solidified with plant agar

의한 것으로 꽃잎배양에는 BAP 농도가  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  이하로 조절하는 것이 재분화 식물체의 신장과 발근에 유리할 것으로 판단된다. 발근한 재분화 개체(Fig. 1C)는 원예용 상토에 이식하고 비닐로 밀폐한 후 자연광의 70% 정도 차광하여 순화시킨 유묘(Fig. 1D)는 육종온실에서 삼목 증식한 일반묘의 생육과 비교하기 위하여 자연일장으로 재배하였다(Fig. 1E).

또한, 꽃잎배양을 통하여 획득한 재분화 식물체와 모본과의 배수성 검정결과, 배수성에 차이가 없음을 확인하였다(Fig. 2). 꽃잎배양으로 얻은 식물체와 모본으로부터 삼목한 묘간에 생육특성을 조사한 결과, 꽃잎배양으로부터 증식한 묘는 개화일이 10월 16일, 개화반응일수 50일로 일반 묘에 비하여 1일 정도 개화가 지연되었고, 초장 92.4 cm, 줄기 당 꽃수는 19개, 꽃잎 수는 235개, 꽃 직경은 6.2 cm로 일반 묘와 큰 차이가 없었다(Table 3, Fig. 3). 이상의 결과를 종합해 볼 때, 화색돌연변이체를 고정하기 위해서 꽃잎배양으로 부정아를 유기시킬 경우에는 배양재료가 어린조직일수록 유리하나 꽃잎의 화색확인이 명확한 S2단계(개화가 30% 진전된 단계)가 안정적이라고 판단된다. 꽃잎의 배양부위는 꽃잎 끝부분(TEOP)이 부정아 발생률이 높았고 BAP를 단용 처리 보다는 IAA와 혼용이 효과적이었으며 농도는  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA +  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$

BAP 일 때가 79.2%의 부정아 형성률과 shoot 수 43.9개로 가장 좋았다.

## 적 요

스프레이국화 ‘퍼플엔디’의 꽃잎을 이용하여 부정아유기에 효율적인 부정아 유기조건을 찾기 위하여 실시하였다. 배양재료로 사용한 꽃잎은 꽃봉오리의 개화진전단계 (S1; 10% 개화, S2; 30% 개화, S3; 50% 개화, S4; 70% 개화)를 4단계로 하고 꽃잎부위는 꽃잎의 기부와 끝부분 (TBOP; the basal of petal, TEOP; the end of petal)으로 나누어 MS무기염에 IAA와 BAP를 첨가한 배지에 배양하였다. 배양재료는 30% 정도 개화가 진전(S2)되었을 때 꽃잎을 채취하여 꽃잎을 하나씩 분리한 후 꽃잎 중간 길이에서 가로로 잘라서 꽃잎 끝부분(TEOP)을 사용하고  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  IAA와  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BAP의 농도로 첨가한 MS배지에 치상하였을 때 79.2%의 부정아 형성과 33.4개의 유묘를 획득할 수 있었다. 재분화된 식물체의 배수성 분석결과 모본과 동일하였으며 온실에서 순화 후 정상적인 생육과 개화를 확인할 수 있었다.



**Fig. 3** Flowers of regenerated plants (left) and the mother plant (right) grown under greenhouse conditions in spray chrysanthemum cv. Purple ND

**Table 3** Plant characteristics of a spray chrysanthemum ‘Purple ND’ grown in natural season<sup>a</sup>

Planting material	Flowering date	Days to flower	Plant height (cm)	No. of flowers/stem	No. of petals/flower	Flower diameter (cm)
Propagules <sup>b</sup>	Oct. 16	50.0	92.4a <sup>d</sup>	19.0a	235.9a	6.2a
Control <sup>c</sup>	Oct. 15	49.3	95.1a	19.7a	230.2a	5.9a

<sup>a</sup>Natural season; planted on Jul. 23

<sup>b</sup>Prpagules were originated in petal tissue culture

<sup>c</sup>Control was originated in cuttings

<sup>d</sup>Mean separation within columns by Duncan’s multiple range test at  $p = 0.05$

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 농업과학기술개발 공동연구사업 (과제번호: PJ00850906)의 지원에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

## References

- Annadana S, Rademaker W, Ramanna M, Udayakumar M, de Jong J (2000) Response of stem explants to screening and explant source as a basis for methodical advancing of regeneration protocols for chrysanthemum. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 62:47-55.
- Broerjes C (1966) Mutation breeding of chrysanthemum. *Euphytica* 15:156-162.
- Choi KJ (2002) International union for the protection of new varieties of plant (UPOV) and its 1991 UPOV convention. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 20:151-159.
- Datta SK, Chakrabarty D, Mandal AKA (2001) Gamma ray-induced genetic manipulations in flower colour and shape in *Dendranthema grandiflorum* and their management through tissue culture. *Plant Breed.* 120:91-92.
- Gilissen LJW, van Staveren MJ, Hakkert JC, Smulders MJM (1996) Competence for regeneration during tobacco internodal development: Involvement of plant age, cell elongation stage, and degree of polysomaty. *Plant Physiol.* 111:1243-1250.
- Himstedt JP, Jacobsen HJ, Fisher-Kluver G (2001) Shoot regeneration from stem and leaf explant of chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflorum*). *Acta Hort.* 560:421-424.
- Mandal AKA, Datta SK (2005) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from ray florets of chrysanthemum. *Biol. Plant.* 49:29-33.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-479.
- Park IS, Lee GJ, Kim DS, Chung SJ, Kim JB, Song HS, Goo DH, Kang SY (2007) Mutation breeding of a spray chrysanthemum ‘Argus’ by gamma-ray irradiation and tissue culture. *Flower Res. J.* 15:52-57.
- Lu C, Vasil IK, Ozias-Akins P (1982) Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. *Theor. Appl. Genet.* 62:109-112.
- Petty LM, Harbred NP, Carre IA, Thomas B, Jackson SD (2003) Expression of the *Arabidopsis gai* gene under its own promoter causes a reduction in plant height in chrysanthemum by attenuation of the gibberellin response. *Plant Sci.* 164: 175-182.
- Rural Development Administration (RDA) (2002) Handbook of farming standard-131. chrysanthemum cultivation. Government publications registration number (Korea) 11-139000-001153-14. RDA, Suwon, Korea.
- Waseem K, Jilani MS, Khan MS (2009) Rapid plant regeneration of chrysanthemum (*chrysanthemum morifolium* L.) through shoot tip culture. *Afr. J. Biotechnol.* 8:1871-1877.
- Zalewska M, Lema-Ruminska J, Miler N (2007) In vitro propagation using adventitious buds technique as a source of new variability in chrysanthemum. *Sci. Hortic.* 113:70-73.