

# 딸기 조직배양 시 여러가지 식물호르몬 처리에 따른 기내 증식 및 형태적, 유전적 변이 발생 비교

김혜진 · 이종남 · 최미자 · 서종택

## Comparison of in vitro propagation and occurrence of morphological and genetic variation in strawberry tissue culture with various plant hormone treatments

Hye Jin Kim · Jong Nam Lee · Mi Ja Choi · Jong Taek Suh

Received: 25 February 2019 / Revised: 31 March 2019 / Accepted: 31 March 2019

© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** The objective of this study was to carry out treatment of various plant hormones in order to determine morphological and genetic variation degree of tissue-cultured strawberry. The cultivar used in this experiment was ‘Goha’ and ‘Seolhyang’, the plant hormones used for experiment were benzyladenine (BA), N-(2-Chloro-4 pyridyl)-N’-phenylurea (CPPU) and thidiazuron (TDZ), and the concentrations were 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg·L<sup>-1</sup> with each hormone. The BA treatment of the proliferation efficiency of tissue-cultured strawberry ‘Goha’ and ‘Seolhyang’ was the highest. When processing BA, CPPU and TDZ, morphological variation and genetic variation happened in strawberry ‘Goha’ and ‘Seolhyang’, especially, the variations appeared highly in CPPU treatment. The genetic variation in ‘Goha’ appeared at the concentration more than BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup> as 1.1%, appeared at the concentration of CPPU 0.5 mg·L<sup>-1</sup> as 15.3%, and at the concentration of TDZ 2.0 mg·L<sup>-1</sup> as 1.2%. The genetic variation in ‘Seolhyang’ appeared at the concentration of BA 4.0 mg·L<sup>-1</sup> as 2.3%, and at the concentration of CPPU 0.5 mg·L<sup>-1</sup> as 14.3%. Therefore, CPPU should not be treated during strawberry tissue culture, and BA and TDZ should be treated at low concentration.

**Keywords** Benzyladenine, *Fragaria × ananassa*, N-(2-Chloro-4 pyridyl)-N’-phenylurea, Thidiazuron, Propagation efficiency

### 서 언

현재 재배종 딸기(*Fragaria × ananassa* Duch.)의 대부분은 배수성이 8배체(2n=8x=56)로 영양번식을 통해 자모를 증식하여 재배에 이용한다. 영양번식 작물의 증식 시 모주의 갱신 없이 장기간 번식에 이용할 경우, 병원균 또는 바이러스 등에 감염되어 자모 생산량이 줄어들 뿐만 아니라 자모로 병원균이나 바이러스가 전이되어 재배 시 생산량, 품질 등에 나쁜 영향을 미친다(Martin and Spiegel 1998; Martin and Tzanetakis 2006; Mellor and Krczal 1987; Thompson and Jelkman 2003).

조직배양기술은 식물의 잎, 줄기, 뿌리 및 성장점 등의 조직을 이용하여 새로운 개체를 만들어내는 기술로 대부분의 영양번식작물에서 대량생산 또는 virus-free묘를 생산하기 위하여 많이 이용되어 왔다(Badoni and Chauhan 2009; Boxus 1989; Pant et al. 2015). 딸기는 조직배양 시 품종 본연의 특성을 유지하기 위해 성장점 배양만을 통해 조직배양묘를 생산해 왔는데, 증식률이 1.8배로 매우 낮아(Lee et al. 2010), 대량 증식이 어려워 식물호르몬 등을 처리하여 증식률을 향상시켜왔다(Ashrafuzzaman et al. 2013; Boxus 1999; Marandi et al. 2011).

1980년대에 우리나라의 딸기 조직배양묘의 보급은 호르몬 처리를 통해 대량 증식하여 조기 보급에 성공하였으나, 생산력 및 후대검정을 거치지 않고 조직배양묘가 농가로 직

H. J. Kim (✉) · J. N. Lee · M. J. Choi · J. T. Suh  
국립식량과학원 고령지능업연구소  
(Highland Agricultural Research Institute, National Institute of Crop Science, Pyeongchang 25342, Korea)  
e-mail: heijin79@korea.kr

접 보급되면서 종묘 사고가 발생하여 조직배양을 통한 딸기 종묘보급체계가 사라졌다. 그 후 2000년대 초반부터 딸기 조직배양묘의 보급이 다시 이뤄지고 있으나, 2013년에 민간 조직배양업체에서 보급한 딸기 조직배양묘에서 변이주가 발생함으로써 딸기 재배농가의 피해가 매우 컸다.

Koruza and Jeleska (1993)는 조직배양 시 나타나는 대부분의 변이는 후생적으로(epigenetic), 시간이 지나면 사라진다고 보고하였으나, 그 외의 많은 연구자들은 삽입, 결손, 점돌연변이와 재배열 같은 유전적 변이가 조직배양 중에 일어나며(Anderson et al. 1991; Kane et al. 1992), 이로 인해 나타나는 표현형적 증상들이 유전된다(Karp 1995; Sansavini et al. 1990)고 보고하였다.

딸기의 경우 식물호르몬 종류 및 농도, 계대배양 횟수 등에 따라 변이체가 발생할 수 있는데(Faedi et al. 2002), 특히 식물호르몬 중 조직배양묘 대량증식에 주로 이용되는 시토키닌류를 고농도로 사용할 경우 체세포 변이 발생률이 높아진다(Sansavini et al. 1990)고 보고하였다. 그러나 현재까지 딸기 조직배양 시 식물호르몬 종류에 따른 조직배양묘의 기내 증식률 정도, 변이 발생 및 검정에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 딸기 조직배양묘의 안정적인 대량 증식을 위해 조직배양에 주로 사용되고 있는 여러가지 식물호르몬을 농도 별로 처리하여 품종 별 증식률을 비교하고, 식물호르몬 처리에 따른 형태적, 유전적 변이 발생 정도를 확인하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 공시 품종 및 식물호르몬 처리

본 연구에 사용된 공시 품종은 사계성(ever-bearing) 딸기 ‘고하’와 일계성(june-bearing) 딸기 ‘설향’이었다. ‘고하’와 ‘설향’의 포복경의 선단으로부터 생장점을 적출하여 배지(1/3MS 무기염, 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose, 8 g·L<sup>-1</sup> plant agar, pH5.6-5.8)에 치상하여 6주간 배양하여 기내 유식물체를 얻었다.

본 실험에 사용된 식물호르몬은 benzyladenine (BA), N-(2-Chloro-4 pyridyl)-N<sup>7</sup>-phenylurea (CPPU) 및 thidiazuron (TDZ)이며, 종류 별로 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg·L<sup>-1</sup>의 농도로 처리하였으며,

각 처리 별로 indole-3-butyric acid (IBA)를 0.1 mg·L<sup>-1</sup>의 농도로 혼합 처리 하였다. 생장점에서 발아된 유식물체의 뿌리와 잎을 제거한 후 식물호르몬이 첨가된 배지에 치상하여, 각 처리 별로 6주간 배양 후 기본 배지(MS 무기염(Murashige and Skoog 1962), 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose, 8 g·L<sup>-1</sup> plant agar, pH5.6-5.8)에 4주간격으로 3회 계대 배양하여 하나의 온전한 조직배양묘(whole plant)를 생산하였다.

### 온실 순화 및 형태적 변이주 선별

식물호르몬 처리에 의해 증식된 유식물체는 온실에서 딸기 전용상토 ‘푸르미’(서울바이오(주))를 충전한 흑색비닐포트(3치, 접은 윗 지름 13 cm×높이 6.8 cm×펼친 윗 직경 9 cm)에 순화하였다. 순화 후 일주일간 50% 차광막으로 차광하고, 상대습도를 80%이상으로 유지한 후 서서히 제거하고 6주간 육묘 후 본포에 정식하였다. 본포에 정식 후 딸기전용양액인 PBG액(Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente, Netherlands) (Sonneveld and Straver 1994)을 전기전도도(EC, electrical conductivity) 0.8 dS·m<sup>-1</sup>로 맞추어 1일 4-5회 관수하며 재배하였다. 전 재배기간동안 화방 출뢰성(불연속 출뢰 또는 불출뢰), 비정상 과일 출현, 초세 등을 바탕으로 형태적 변이주를 선별하였다.

### DNA 추출 및 유전적 변이 검정

선발된 형태적 변이주의 어린 잎을 채취하여 NucleoSpin® Plant II Kit (Macherey-Nagel, Germany)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 분광 광도계(DS-11+ Spectrophotometer, DeNovix, USA)로 DNA양을 측정하여 10 ng·μL<sup>-1</sup>로 정량하여 분석에 이용하였다.

본 실험에 사용한 SSR 마커는 Govan et al. (2008)과 Honjo et al. (2011)이 사용한 4개의 마커 정보를 수집하여 프라이머를 제작하였으며, 프라이머의 정방향에 5-FAM (Bioneer, Korea)으로 형광 표지한 다음 SSR 분석을 실시하였다(Table 1).

PCR 반응은 genomic DNA 20 ng, 2X TOPsimple™ PreMix-nTaq (Enzymomics, Korea) 10 μL, forward와 reverse primer 각 1 μL (10 pM·μL<sup>-1</sup>)를 넣고 증류수를 첨가하여 전체 부피를 20 μL로 조절하였다. PCR (Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, Applied

**Table 1** The Primer sequences, repeat motif, and annealing temperature of 4 SSR markers used in the analysis of genetic variation plants

Marker <sup>a</sup>	Forward primer	Reverse primer	Repeat motif	Tm (°C)
FxaHGA02P13	F:ccagcgcttggcttctgtactact	R:cccatttccccaaatctaacaat	-	59
FxaAGA21F11	F:caattcacaatggctgatgacgat	R:gcactcagacatatttggggagg	-	59
EMFv104	F:tggaacattcttcatagccaaa	R:cagacgagtcctctcatgtgc	(AG) <sub>17</sub>	53
EMFvi136	F:gagcctgctacgctttctatg	R:cctctgattgatgatttct	(TC) Direct	54

<sup>a</sup>SSR markers have been cited in Govan et al. (2008) and Honjo et al. (2011)

Biosystems, USA) 증폭 조건은 95°C에서 15분동안 변성시킨 후, 95°C에서 30초, 65°C에서 30초(반복 당 1°C씩 감소), 72°C에서 30초간 25회 반복한 후, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초간 30회 반복한 후 72°C에서 5분간 처리하였다.

PCR이 완료된 후 5 µL의 증폭산물을 1.5% (w/v) agarose gel에서 전기 영동하여 증폭 여부를 확인한 후 PCR 증폭 산물 0.5 µL (50 ng·µL<sup>-1</sup>), GeneScan 500 LIZ dye Size Standard (Applied biosystems, USA) 0.5µL와 Hi-Di Formamide (Applied biosystems, USA) 9 µL를 혼합하여 95°C에서 3분간 변성시킨 후 4°C에서 1분간 안정화 시켰다. 변성시킨 PCR 산물은 자동염기서열 분석기(DNA Analyzer 3730xl, Applied Biosystems, USA)를 활용하여 전기영동한 다음 Gene Mapper 프로그램(Applied Biosystems, USA)을 사용하여 마커 별로 분석하여 유전적 변이 검정을 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 식물호르몬 종류 별 기내 증식주수 비교

딸기 조직배양 시 여러가지 식물호르몬 처리에 따른 신초 증

**Table 2** The number of new shoots with various plant hormone treatment of strawberry plant via tissue culture

Concentration of plant hormone <sup>a</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	No. of new shoots	
	Goha	Seolhyang
BA 0.5 + IBA 0.1	47±3 <sup>b</sup>	40±2
BA 1.0 + IBA 0.1	38±2	22±1
BA 2.0 + IBA 0.1	33±1	31±1
BA 4.0 + IBA 0.1	26±1	42±1
Average	36.0±1.5	33.8±2
CPPU 0.5 + IBA 0.1	13±1	14±2
CPPU 1.0 + IBA 0.1	15±1	36±4
CPPU 2.0 + IBA 0.1	28±1	30±3
CPPU 4.0 + IBA 0.1	36±2	27±3
Average	22.3±1	26.8±3
TDZ 0.5 + IBA 0.1	18±1	- <sup>c</sup>
TDZ 1.0 + IBA 0.1	23±1	-
TDZ 2.0 + IBA 0.1	28±2	-
TDZ 4.0 + IBA 0.1	16±1	-
Average	21.3±1	-

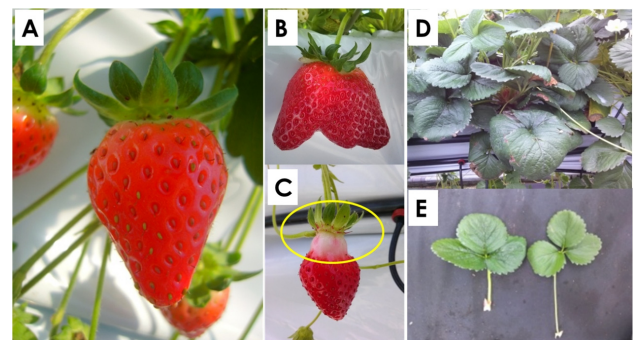
<sup>a</sup>Various plant hormone treated tissue culture plants ‘Goha’ and ‘Seolhyang’. BA is ‘Benzyladenine’, CPPU is ‘N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N’-phenylurea’, TDZ is ‘Thidiazuron’, and IBA is ‘Indole-3-butyric acid’

<sup>b</sup>mean ± standard error

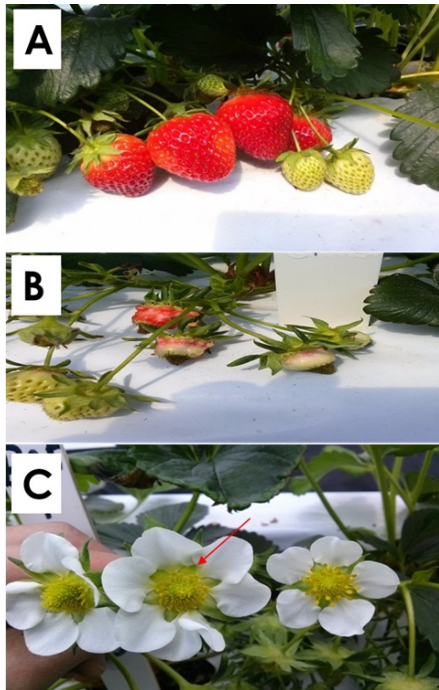
<sup>c</sup>Do not tested in ‘Seolhyang’

식을 비교한 결과(Table 2), BA 처리 시 ‘고하’는 기내 유식물체 1주당 평균 36.0개, ‘설향’은 33.8개가 발생되었고, CPPU 처리 시 ‘고하’는 22.3개, ‘설향’은 26.8개 발생되었으며, TDZ 처리 시 ‘고하’에서 21.3개가 발생되었다. 신초 발생은 품종에 관계없이 BA 처리가 가장 많이 발생하였고, CPPU 처리, TDZ 처리 순으로 나타났다. 지금까지 딸기의 기내 유식물체의 대량증식에는 처리 시 증식 효율이 높다고 보고된 benzyladenine (BA)을 주로 사용하였는데(Ahmad 2013; Marcotrigiano et al. 1984; Żebrowska et al. 2003), 본 실험에서도 benzyladenine (BA) 처리에서 증식 효율이 가장 높게 나타나 딸기의 기내 조직배양묘의 증식에 BA가 가장 적합한 것으로 판단되었다. 그리고 Fatemeh et al. (2010)은 딸기의 경우 절편체 종류 및 유전적 배경이 다른 품종의 종류에 따라 식물호르몬 처리에 따른 재분화 반응이 다르게 나타난다고 보고하였지만, 본 연구에서 고하는 생태형이 사계성이고, 설향은 생태형이 일계성으로 유전적 배경이 매우 다름에도 불구하고, 재분화 반응이 비슷하게 나타나는 상반된 결과를 보였다.

현재까지 딸기 조직배양 시 식물호르몬의 처리에 따른 증식률 향상 연구만 진행되어(Ashrafuzzaman et al. 2013; Boxus 1999; Marandi et al. 2011), 식물호르몬 처리에 따른 조직배양 변이 발생에 관한 연구는 매우 미비한 실정이다. 딸기 조직배양 시 발생하는 변이를 검정하는 방법에는 표현형적, 세포학적, 생화학적 방법 및 유전적 방법 등이 있다(Kaeppeler et al. 2000). 그 중 표현형적 분석은 기본적으로 필수적인 분석 방법으로 원종 식물과 변이체의 형태적 특성을 비교하여 구분하는 1차적인 방법이다. Cameron and Hancock (1986)의 여러 학자들은 딸기 조직배양 시 나타나는 변이로 주로 엽색 변이체, 왜화 식물체 등이 나타난다고 보고하였으나(Irkaeva and Matveena 1997; Sansavini et al. 1990; Swartz et al. 1981), ‘고하’의 형태적 변이주는 전 재배기간동안 화방이 출현하지 않아(Fig. 1D) 영양생장이 과도하여 잎이 크고 두꺼운 형태였으며(Fig. 1E), 정상과의 모양이 원추형인 것에 비해(Fig.



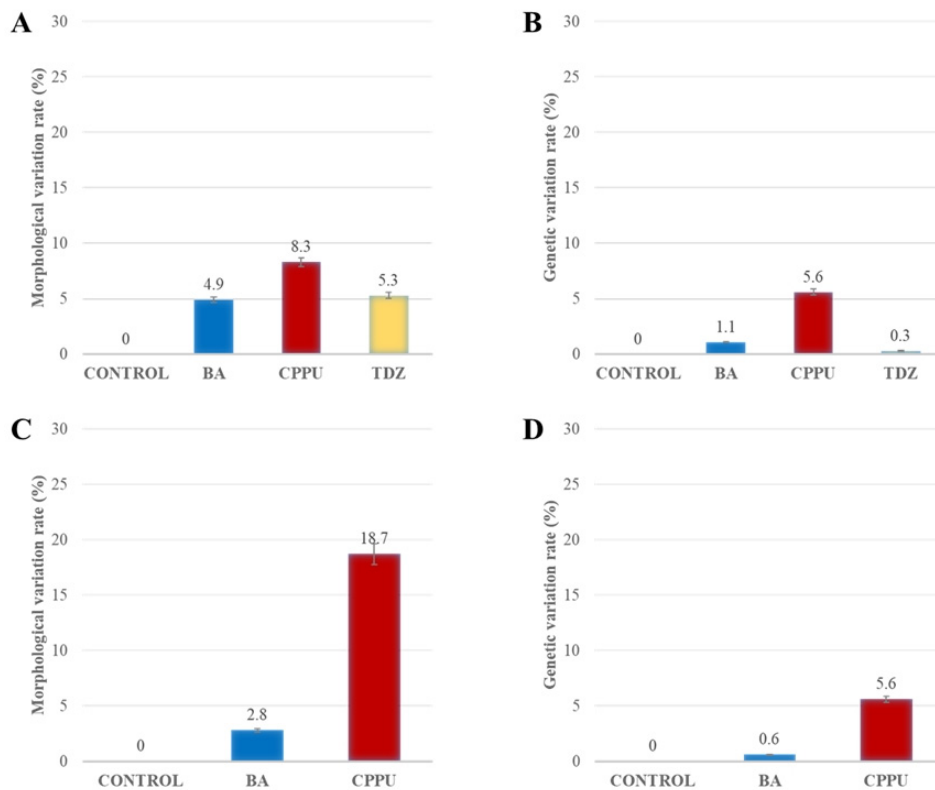
**Fig. 1** Comparison of morphological traits with plant hormone treatment of strawberry ‘Goha’. (A) Normal fruit. (B and C) Abnormal fruits. (D) Do not appear flower cluster. (E) A leaf characteristics of normal plant (right) and variation plant (left)



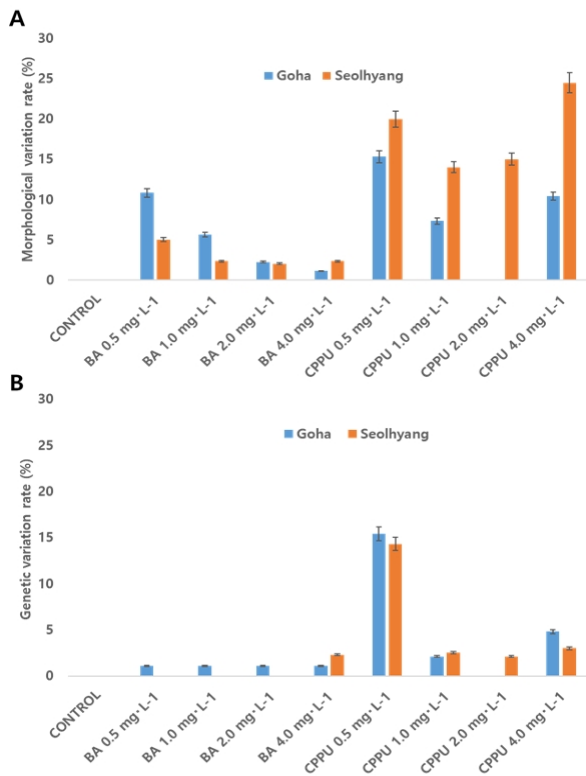
**Fig. 2** Comparison of morphological traits with plant hormone treatment of strawberry ‘Seolhyang’. (A) Normal fruits. (B) Abnormal fruits. (C) An abnormal flower without anther

1A) 변이주의 과일 모양은 닭벼슬 모양이나 과탁이 길어지는 등의 비정상적인 과일의 모양을 지속적으로 생산하였다 (Fig. 1B, 1C). 그리고 ‘설향’의 형태적 변이주들은 약(葯)이 소실된 꽃(Fig. 2C)이 피고 그로 인해 수정이 불량하여 기형과(Fig. 2B) 등이 발생하는 경향을 보였다. 이것은 조직배양 시 식물호르몬 처리에 의해 나타나는 형태적 변이가 매우 다양하며, 이러한 형태적 변이는 후생적 변이(epigenetic variation)와 유전적 변이(genetic variation)를 모두 포함하고 있으므로 (Zhang 2014) 우량모 생산을 위해서는 반드시 유전적 변이 검정을 실시해야 할 필요성이 있음을 시사하는 것이다.

여러가지 식물호르몬 처리에 따른 형태적 변이 발생 정도를 비교한 결과, ‘고하’는 무처리에서 0.0%, BA 처리에서 4.9%, CPPU 처리에서 8.3%, TDZ 처리에서 5.3%로 무처리에 비해 식물호르몬 처리에서 형태적 변이가 많이 발생하였으며, 특히 CPPU 처리가 가장 높게 나타났다(Fig. 3A). ‘설향’은 무처리에서 0.0%, BA 처리에서 2.8%, CPPU 처리에서 18.7%로 CPPU 처리에서 형태적 변이가 매우 높게 발생하였다 (Fig. 3C). 이렇게 선별된 형태적 변이개체를 SSR 마커를 이용하여 분석한 결과, ‘고하’의 유전적 변이율은 무처리에서 0.0%, BA 처리에서 1.1%, CPPU 처리에서 5.6%, TDZ 처리에서 0.3%로 나타났고(Fig. 3B), ‘설향’의 유전적 변이율은 무처리에서 0.0%, BA 처리에서 0.6%, CPPU 처리에서 5.6%로 나



**Fig. 3** Comparison between morphological and genetic variation rate of tissue cultured strawberry with respect to BA, CPPU and TDZ treatment. (A) Morphological variation rate of strawberry ‘Goha’. (B) Genetic variation rate of strawberry ‘Goha’. (C) Morphological variation rate of strawberry ‘Seolhyang’. (D) Genetic variation rate of strawberry ‘Seolhyang’



**Fig. 4** Comparison between morphological and genetic variations of tissue cultured strawberry with respect to concentration of BA and CPPU. (A) Morphological variation rate of strawberry ‘Goha’ and ‘Seolhyang’. (B) Genetic variation rate of strawberry ‘Goha’ and ‘Seolhyang’

타났다(Fig. 3D). 본 실험의 결과, 품종에 관계없이 식물호르몬 처리 시 형태적 및 유전적 변이가 발생하며, 특히 CPPU 처리 시 타 식물호르몬에 비해 현저히 높은 변이 발생을 보였다(Fig. 3).

‘고하’에 BA를 농도 별로 처리한 결과(Fig. 4), 형태적 변이는 0.5 mg·L<sup>-1</sup>에서 10.8%로 가장 높게 나타났으나 그 중 1.1%만이 유전적 변이임을 확인하였다. 그러나 ‘고하’에 CPPU 0.5 mg·L<sup>-1</sup>을 처리했을 때 형태적 변이가 15.3%로 매우 높게 나타났을 뿐만 아니라 형태적 변이를 보인 모든 개체가 유전적 변이임을 확인할 수 있었다. ‘설향’에 BA를 농도 별로 처리한 결과(Fig. 4), 형태적 변이 발생은 0.5 mg·L<sup>-1</sup>에서 5.0%로 가장 높게 나타났고, 유전적 변이 발생은 4.0 mg·L<sup>-1</sup>에서 2.3%로 가장 높게 나타났다. ‘설향’에 CPPU를 농도 별로 처리한 결과, 형태적 변이 발생은 4.0 mg·L<sup>-1</sup>에서 24.5%로 가장 높게 나타났고, 유전적 변이 발생은 0.5 mg·L<sup>-1</sup>에서 14.3%로 가장 높게 나타났다. ‘고하’ 및 ‘설향’ 모두 CPPU 처리에서 형태적, 유전적 변이 발생이 높았고, 특히 CPPU 0.5 mg·L<sup>-1</sup>의 저농도에서도 유전적 변이 발생이 많은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4B).

‘고하’ 및 ‘설향’의 유전적 변이체를 SSR 분석한 결과 (Table 3과 Table 4), 4개의 SSR 마커에서 ‘고하’ 대조는 총 26 개의 대립유전자를 보인 반면에 BA 처리구는 33.6개, CPPU 처리구는 30.5개, TDZ 처리구는 35개의 대립유전자를 보였다. ‘설향’ 대조는 총 27.0개의 대립유전자를 보였으며, BA

**Table 3** The number of alleles and allele size range by treatment of different plant hormones in tissue culture of strawberry ‘Goha’

Marker	CONTROL <sup>a</sup>		BA		CPPU		TDZ	
	Allele size range (bp)	No. of alleles (ea)	Allele size range (bp)	No. of alleles (ea)	Allele size range (bp)	No. of alleles (ea)	Allele size range (bp)	No. of alleles (ea)
FxaAGA21F11	106-144	6.0	106-144	6.0	106-198	6.7	106-144	6.0
FxaHGA02P13	226-274	8.0	226-274	8.0	226-274	7.6	226-247	8.0
EMFv104	74-126	6.0	74-183	13.6	74-186	10.1	74-183	15.0
EMFvi136	121-163	6.0	121-163	6.0	121-183	6.1	121-163	6.0
Total	-	26.0	-	33.6	-	30.5	-	35.0

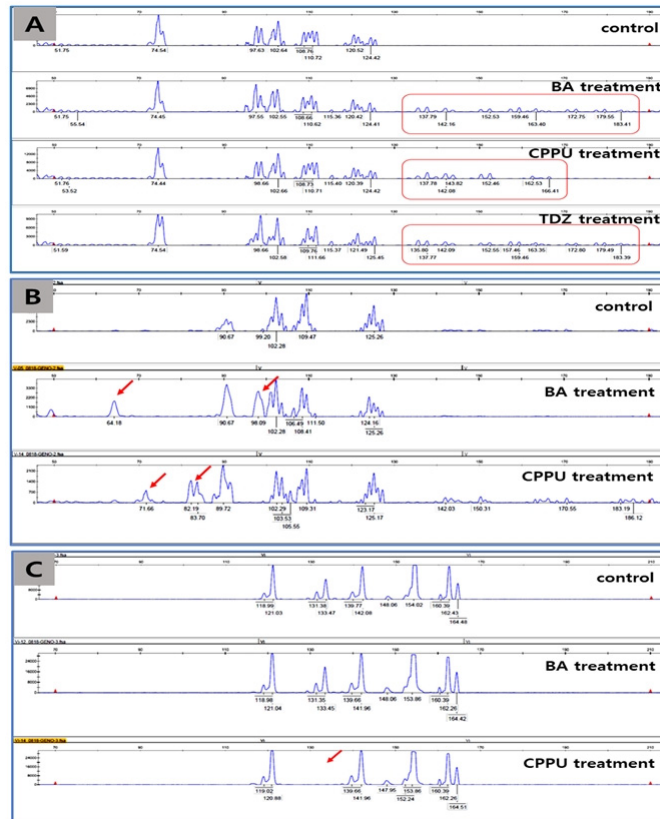
<sup>a</sup>Do not treat any plant hormone

**Table 4** The number of alleles and allele size range by treatment of different plant hormones in tissue culture of strawberry ‘Seolhyang’

Marker	CONTROL <sup>a</sup>		BA		CPPU	
	Allele size range (bp)	No. of alleles (ea)	Allele size range (bp)	No. of alleles (ea)	Allele size range (bp)	No. of alleles (ea)
FxaAGA21F11	116-139	8.0	116-139	8.0	116-139	8.0
FxaHGA02P13	207-258	9.0	207-258	9.0	207-258	9.0
EMFv104	90-125	4.0	64-125	6.0	71-125	6.8
EMFvi136	121-165	6.0	121-165	6.0	121-165	5.7
Total	-	27.0	-	29.0	-	29.5

<sup>a</sup>Do not treat any plant hormone





**Fig. 5** Peak of alleles of genetic variants by treatment of different plant hormones in tissue culture of strawberry ‘Goha’ and ‘Seolhyang’. (A) cv. Goha and used EMFv104 marker. (B) cv. Seolhyang and used EMFv104 marker. (C) cv. Seolhyang and used EMFvi136 marker

처리구는 29.0개, CPPU 처리구는 29.5개의 대립유전자를 보였다. 특히 ‘고하’는 EMFv104 마커를 이용한 분석에서 대조에 비해 135-183 bp 사이에 많은 수의 대립유전자가 나타나는 것을 확인하였고(Table 4, Fig. 5A), ‘설향’은 EMFv104 마커를 이용한 분석에서 BA처리는 64, 98 bp의 대립유전자가 추가되었으며, CPPU처리는 72, 82, 84 bp의 대립유전자가 추가적으로 나타났다(Fig. 5B). 또한 EMFvi136 마커를 이용한 분석에서 CPPU처리는 대조에 비해 133 bp의 대립유전자가 결손된 것을 확인하였다(Fig. 5C).

Karp and Bright (1985)와 몇몇 연구자들은 식물호르몬이 흔히 조직배양에서 유전적 변화의 원인임을 시사하였다 (Gould 1986; Karp 1989). 특히 여러 학자들은 부적당한 혹은 최적 이상의 농도의 식물호르몬 사용 시 재분화 식물체에서 변이를 유발하는 것을 밝혀냈으며(Evans and Bravo 1986; Karp and Bright 1985; Orton 1983; Varga et al. 1988), Nehra et al. (1992)는 고농도의 BA처리(20μM) 시 왜화 식물체가 약 10% 정도 야기된다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서 ‘고하’ 및 ‘설향’의 조직배양 시 BA, CPPU 및 TDZ을 처리하여 형태적, 유전적 변이가 나타남으로써 앞선 연구와 마찬가지로 식물호르몬이 식물체의 유전적 변화를 일으키는 원인임을 확인할 수 있었다.

따라서 딸기 조직배양 시 식물호르몬을 처리할 경우 형태적, 유전적 변이가 나타날 수 있으며, 특히 BA나 TDZ에 비해 CPPU는 품종이나 호르몬 농도에 관계없이 변이 발생이 높게 나타나므로 딸기 조직배양묘 대량 증식을 위한 식물호르몬의 사용을 주의해야 하며, 반드시 후대검정을 통해 품종 본연의 특성이 유지되는지 확인해야 한다. 또한, 본 실험에서 선별된 변이 개체의 형태적, 유전적 특성이 후대에도 지속적으로 나타나는지에 대해 추후 후대검정연구가 필요할 것으로 판단된다.

**적 요**

본 실험은 딸기 조직배양 시 여러가지 식물호르몬의 농도 별 처리에 따른 증식을 및 형태적, 유전적 변이 발생 정도를 확인하고자 실시하였다. 본 실험에 사용된 공시 품종은 ‘고하’와 ‘설향’이며, 본 실험에 사용한 식물 호르몬은 BA, CPPU 및 TDZ로, 농도는 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg·L<sup>-1</sup>였다. ‘고하’와 ‘설향’의 조직배양묘 증식률은 BA 처리 시 가장 높았다. BA, CPPU 및 TDZ 처리 시 ‘고하’ 및 ‘설향’에서 형태적 및 유전적 변이가 발생하였고, 특히 품종에 관계없이 CPPU 처리에서 변이가

높게 나타났다. ‘고하’의 유전적 변이는 BA 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 이상의 농도에서 1.1%로 나타났고, CPPU 0.5 mg·L<sup>-1</sup>에서 15.3%로 나타났으며, TDZ 2.0 mg·L<sup>-1</sup>에서 1.2%로 나타났다. ‘설향’의 유전적 변이는 BA 4.0 mg·L<sup>-1</sup>에서 2.3%로 나타났고, CPPU 0.5 mg·L<sup>-1</sup>에서 14.3%로 나타났다. 따라서 딸기 조직배양 시, CPPU는 처리하지 않는 것이 좋을 것으로 판단되고, BA나 TDZ 또한 저농도로 처리하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

## 사 사

본 논문은 농촌진흥청 연구사업 (세부과제명 : 수출딸기 유망품종 조직배양묘 안정생산 기술개발, 과제번호 : PJ01186301)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## References

- Ahmad SS (2013) In vitro shoot proliferation of strawberry using stem plantlet explants derived from meristem culture. *Widyariset* 16:473-480 (Abstr.)
- Anderson G, Lewis-Smith AC, Chamberlain M, Smith SM (1991) Variation in organization and copy number of ribosomal RNA genes in *Petunia hybrida* somaclones. *Biologia Plantarum* 33:206-210
- Ashrafuzzaman M, Faisal SM, Yadav D, Khanam D, Raihan F (2013) Micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa*) through runner culture. *Bangladesh J. Agril. Res.* 38:467-472
- Badoni A and Chauhan JS (2009) Effect of growth regulators on meristem-tip development and in vitro multiplication of potato cultivar ‘Kufri Himalini’. *Nature and Science* 7:31-34
- Boxus P (1989) Review on strawberry mass propagation. *Acta Hort.* 265:309-320
- Boxus P (1999) Micropropagation of strawberry via axillary shoot proliferation. In: *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology. Part III. Plant propagation in vitro.* Hall RD (ed.). Humana Press Inc., Totowa NJ 111:103-114
- Cameron JS and Hancock JF (1986) Enhanced vigor in vegetative progeny of micropropagated strawberry plants. *HortScience* 21:1225-1226
- Evans DA and Bravo JE (1986) Phenotypic and genotypic stability of tissue culture plants. In: Zimmerman RH, Griesbach RJ, Hammerschlag FA, Lawson RH (eds.). *Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops* (p 73-94). Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht
- Faedi W, Mourgues F, Rosati C (2002) Strawberry breeding and varieties: situation and perspectives. *Acta Hort.* 567:51-59
- Fatemeh H, Maheran AA, Ghizan S, Azmi AR, Hossein K (2010) Micropropagation of strawberry cv. Camarosa: Proliferate shoot regeneration from in vitro shoot tips using thidiazuron with N6-benzylamino-purin. *HortScience.* 45:453-456
- Govan GL, Simpson DW, Johnson AW, Tobutt KR, Sargent DJ (2008) A reliable multiplexed microsatellite set for genotyping *Fragaria* and its use in a survey of 60 *F. ×ananassa* cultivars. *Mol. Breeding* 22:649-661
- Gould AR (1986) Factors controlling variability in vitro. In: Vasil IK (Ed.) *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol 3:549-567. Academic Press, New York
- Honjo M, Nunome T, Kataoka S, Yano T, Yamazaki H, Hamano M, Yui S, Morishita M (2011) Strawberry cultivar identification based on hypervariable SSR markers. *Breeding Sci.* 61:420-425
- Irkaeva NM and Matveeva TV (1997) Response of strawberry (*Fragaria vesca* L.) strains to cytokinin in vitro. (Russian with English abstract) *Genetika* 33:495-500
- Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.* 43:179-188
- Kane EJ, Wilson AJ, Chourey PS (1992) Mitochondrial genome variability in *Sorghum* cell culture protoclones. *Theor. Appl. Genet.* 83:799-806
- Karp A (1989) Can genetic instability be controlled in plant tissue cultures. *IAPTC Newsletter* 58:2-11
- Karp A (1995) Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85:295-302
- Karp A and Bright SWJ (1985) On the causes and origins of somaclonal variation. In: Mifflin BJ (ed). *Oxford Survey of Plant Molecular and Cell Biology*, Vol.2:199-234. Oxford University Press, Oxford
- Koruzza B and Jeleska S (1993) Influence of meristem culture and virus elimination on phenotypical modifications of grapevine (*Vitis vinifera* L., cv. Refosk). *Vitis* 32:59-60
- Lee JN, Kim HJ, Kim KD, Kwon YS, Im JS, Lim HT, Yeoung YR (2010) In vitro mass propagation and economic effects of bioreactor culture in ever-bearing strawberry ‘Goha’. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 28:845-849
- Marcotirigiano M, Swartz HJ, Gray SE, Tokaricky D, Popenoe J (1984) The effect of benzylaminopurine on the in vitro multiplication rate and subsequent field performance of tissue culture propagation strawberry plant. *Adv. Strawberry Prod.* 3:23-25
- Marandi JR, Naseri L, Mohseniazar M, Hajitagiloo R, Marhamati MR (2011) Investigation on interaction effect of benzyladenine and chitosan on in vitro proliferation of strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Selva). *Agricultural Biotechnology* 10:27-34 (Abstr.)
- Martin RR, Tzanetakis IE (2006) Characterisation and recent advances in detection of strawberry viruses. *Plant Disease* 90:384-396
- Martin RR, Spiegel S (1998) Strawberry mottle virus. In: JL Mass (ed.). *Compendium of strawberry diseases*. Sec. ed. Am. Phytopato. Soc. 66-67
- Mellor FC, Krczal H (1987) Strawberry mottle. In: RH Converse (ed.), *Virus diseases of small fruits*. United States Department of Agriculture, Agriculture Handbook No. 631, Washington, D. C., 10-16
- Nehra NS, Kartha KK, Stushnoff C, Giles KL (1992) The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on

- somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 29:257-268
- Orton TJ (1983) Experimental approaches to the study of somaclonal variation. *Plant Mol. Biol. Rept.* 1:67-76
- Pant M, Lal A, Jain R (2015) A simple cost effective method for mass propagation of *Chrysanthemum morifolium* and antibacterial activity assessment of in vitro raised plantlets. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 5:103-111
- Sansavini S, Rosati P, Gaggioli D, Toshi MF (1990) Inheritance and stability of somaclonal variation in micropropagated strawberry. *Acta Hort.* 280:375-384
- Sonneveld C and Straver N (1994) Nutrient solutions for vegetables and flowers grown in water ore substrates, (tenth edition). Proefstation voor Tuinbouw onder glas te Naaldwijk, The Netherlands, Series Voedingsoplossingen Glastuinbouw No.8: 45pp
- Swartz HJ, Galletta GJ, Zimmerman RH (1981). Field performance and phenotypic stability of tissue culture-propagated strawberries. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 106:667-673
- Thompson JR, Jelkman W (2003) The detection and variation of strawberry mottle virus. *Plant disease* 87:385-390
- Varga A, Thoma LH, Bruinsma J (1988) Effects of auxins and cytokinins on epigenetic instability of callus-propagated *Kalanchoe blossfeldiana* pollen. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 15:223-231
- Żebrowska JI, Czernaś J, Gawroński J, Hortyński JA (2003) Suitability of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) micro-plants to the field cultivation. *Food, Agriculture & Environment* 1:190-193
- Zhang Z (2014) Epigenetic and genetic variation in micro-propagated strawberry plants. *Acta Hort.* 1049:63-66