

무 원종 대량생산을 위한 경정배양

박한용 · 김유경 · 최수빈 · 모숙연

Shoot-tip culture for massive production of radish foundation seeds

Han Yong Park · You Kyoung Kim · Soo Bin Choi · Sug Youn Mo

Received: 8 February 2023 / Revised: 27 March 2023, 17 April 2023 / Accepted: 17 April 2023 / Published: 15 May 2023

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Shoot-tip culture was used to produce clonal plants of radish stock seeds. Using 6-benzyladenine (BA), the largest number of RA2 line multi-shoots were formed with an average of 14.67 shoots on 1.33 μ M BA in early seedlings and 11.33 shoots on 1.78 μ M BA in juvenile seedlings. The largest number of RA4 line multi-shoots were formed with an average of 11.67 shoots on 2.22 μ M BA in early seedlings and 13.67 shoots on 1.33 μ M BA in juvenile seedlings. There was little difference in the significance level by BA concentration in both lines. Using Thidiazuron (TDZ), the number of RA2 line multi-shoots increased with increasing TDZ concentration, forming the largest number of multi-shoots in 0.45 μ M TDZ (7.0 and 3.0 multi-shoots for early and juvenile seedlings, respectively), but few multi-shoots were formed from TDZ 2.25 and 4.5 μ M. RA4 line produced almost no multi-shoots in early seedlings, and 3.7 multi-shoots were produced in 0.23 and 0.45 μ M TDZ in juvenile seedlings, but not at higher concentrations. Analysis of the tissue culture seedlings grown by cultivating the generated multi-shoots with Radish Foundation seeds using SSR marker revealed a weak pattern of mutation in the generated tissue culture seedlings, but there was no mutant. In addition, in terms of root roots, both RA2 and RA4 lines generally had the best rooting, number of roots, and degree of root development in 4.9 μ M indol-3- butyric acid (IBA).

Keywords *Raphanus sativus*, Thidiazuron, 6-Benzyladenine, indol-3-butyric acid, Multi-shoots, SSR marker

H. Y. Park[†] · Y. S. Kim · S. B. Choi · S. Y. Mo (✉)
세종대학교 바이오산업자원공학과
(Department of Bioengineering, Sejong University, Seoul,
05006, Republic of Korea)
e-mail: ysmo0708@naver.com

서 언

무(*Raphanus sativus* L.)는 십자화과(Brassicaceae)에 속하는 뿌리채소로 전 세계적으로 재배되며, 한국, 중국, 일본에서 특히 많이 이용되고 있다. 한국에서 무는 국내 채소 내수시장 및 종자 시장에서 경제적 가치가 매우 큰 작물이며, 국내 종자 매출의 15%를 차지하고 있고, 수출종자 매출의 18%를 점유하고 있을 만큼 경제적 가치가 매우 큰 원예작물이다 (Korea Seed Association 2022).

현재 우리나라에서 시중에 판매되고 있는 무는 약 99%가 F₁ 품종(Seo et al. 2003)으로, F₁ 품종을 생산하기 위해서는 양친 계통(원종)을 유지하는 것이 매우 중요하다. 원종의 종자 생산은 고유 특성상 꼬투리 당 종자 수확량이 적어 F₁ 종자 생산을 위한 원종의 대량생산이 어렵다. 또한 원종 증식을 위해 원원종을 인공적으로 뇌수분하는 과정에서 일어날 수 있는 유전적 혼입은 원종의 순도를 낮춰 종자 사고로 이어질 수 있기 때문에 순도가 유지된 원종의 대량생산이 중요하다.

순도가 균일한 원종을 생산하기 위해 다양한 조직배양 기술을 통하여 클론묘를 대량생산할 수 있다. 최근 식물을 이용한 조직배양 기술은 크게 발달하여 모든 작물은 아닐지라도 여러 작물에서, 특히 서양란의 경우 이미 유전적으로 같은 클론묘의 대량생산으로 산업화가 원활히 이루어지고 있고, 대량생산된 클론묘를 농장재배 했을 때에도 유전적 변이가 없이 원활히 재배되는 것으로 확인되고 있다(Chang and Chang 2000; Gao et al. 2014; Shimasaki and Uemoto 1990; Tokuhara and Masahiro 1993).

대표적인 조직배양 기술로 성장점 배양이나 shoot-tip culture를 이용할 수 있는데 성장점 배양은 성장점 적출이 어려워 배양 성공율이 낮고 식물재료의 양이 충분하지 않을 경우 대량생산의 시도가 어렵다. 반면에 Shoot-tip culture를 통한 식물의 증식은 유전자 변이를 최소화 하고 건강한 shoots를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 증식률이 높기 때문에 유전적으로

안정적인 대량변식을 가능하게 한다(Waseem et al. 2009).

Raphanus sativus var. longipinnatus Bailey cv. Gungjung (F₁)을 재료로 kinetin과 BA (6-benzyladenine) 호르몬을 이용한 shoot-tip culture에 관한 연구가 진행되었다(Paek et al. 1987). 실험결과 kinetin보다 BA에서 효과가 더 좋았고, 어린 묘의 shoot-tip을 BA 5 mg/L가 첨가된 배지에서 배양했을 때 가장 건강하고 과수화가 적으며 가장 많은 multi-shoots을 형성하였다.

한편 최근 조직배양에 많이 이용되고 있는 TDZ (Thidiazuron)을 이용한 무의 shoot-tip culture는 연구가 진행되지 않았으나 대마, 반다(서양란), 비비추 등 여러 작물에서는 이미 이용되어 왔다(Choi et al. 2019; Jitsopakula et al. 2013; Wang et al. 2009). TDZ은 axillary shoot 증식과 shoot의 형성을 촉진하고, BA와 zeatin에 비해 더 활성을 나타내며 낮은 농도(< 1 μM)로 첨가했을 때 효과적이라고 알려져 있다(Naseem and Mohammad 2018).

유전적으로 균일한 원종의 클론묘를 대량생산하기 위해, 본 연구는 BA와 TDZ을 다양한 농도로 첨가함으로써 무의 shoot-tip culture에 효과적인 호르몬의 종류와 농도를 규명하고, 식물 재료로 유묘와 성묘를 이용하여 어떤 단계의 식물체를 shoot-tip culture에 이용하는 것이 효율적인지 규명하며 또한 무 조직배양 클론묘의 발근에 효과적인 호르몬의 종류와 농도를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

경정배양에 사용할 식물재료와 조직배양묘의 발근 유도 및 발달 실험을 위한 식물재료는 원종 계통 RA2 (오하루, 북지계), RA4(박달무, 북지계)를 사용하였고 각 실험을 위해 원종 무 종자를 사용하여 종자소독 후 기내에서 발아시켜 사용하였다.

종자소독 및 배양

종자를 일반세제(퐁퐁)로 세척한 후, 수돗물로 거품이 없어질 때까지 세척하였다. 세척된 종자를 75% ethanol에 넣고 20 초 동안 흔들며 표면살균한 후 버리고, 클린벤치 내에서 시판중인 락스(NaOCl) 0.2% 희석액으로 15분 흔들며 주면서 전처리하였다. 전처리가 끝난 종자를 다시 락스 1.5% 희석액에 넣어 15분간 진공처리하여 후처리하였다. 후처리된 종자를 클린벤치 내에서 멸균수로 5회 수세한 후 마지막 수세한 멸균수에 30분간 침지시켰다. 종자 소독 후 식물생장조절제를 첨가하지 않은 1/2MS배지(0.75% agar+2% 설탕, pH 5.8, test-tube)에 파종하여 25 ± 2°C, 2500 lux, 명암주기 16/8 hr의 배양실에서 발아시켰다(Murashige and Skoog 1962).

경정배양과 뿌리 유도 및 발달을 위한 호르몬 조건

경정배양시 식물체의 연령에 따른 multi-shoots 발생 효과를 측정하기 위해 발아 후 5일(유묘:본엽 2-3매)된 식물체의 shoot tip (0.5 cm 정도)과 발아 후 30일(성묘:본엽 8-9매)된 식물체의 shoot-tip (0.5 cm 정도)을 사용하여 각 호르몬 조합에 치상하였다. 호르몬 종류와 농도에 따른 multi-shoots 발생 효과를 측정하기 위해 식물체의 shoot-tip 0.5 cm를 잘라 BA (0, 0.44, 0.89, 1.33, 1.78, 2.22 μM) 또는 TDZ (0, 0.23, 0.45, 2.25, 4.5 μM)이 포함된 MS 고체배지(0.4% agar+0.2% gellite+3% sugar, pH 5.8, 400 ml 마요네즈병)에 치상하였고 각 계통마다 모든 처리구는 3반복하여 2번 실시하였다. 치상 후 6주 후에 multi-shoots의 수를 측정하였다. 각 호르몬을 통해 생성된 multi-shoots의 식물체는 MS 고체배지로 계대배양하여 성장시킨 후 SSR (Simple Sequence Repeat) marker를 사용하여 돌연변이 검정을 하였다. 뿌리 유도와 발달 실험을 위해서 발아 후 40일된 기내 식물체의 뿌리 밑부분을 자른 후, 각각 NAA (α-Naphthaleneacetic acid) 0.5, 2.7 μM and IBA (indol-3-butyric acid) 4.9, 9.8 μM가 첨가된 MS 고체배지(0.4% agar+0.2% gellite+3% sugar, pH 5.8, 400 ml 마요네즈병)에 치상하였다. 대조구는 생장조절제를 첨가하지 않은 기본 MS배지에 치상하였고 각 계통마다 모든 처리구는 3반복하여 2번 실험하였다. 모든 실험은 치상 후 배양 7주 후에 발근율, 뿌리 길이, 뿌리 수, 뿌리 발달정도를 측정하였다. 배양조건은 25 ± 2°C, 2500 lux, 명암주기 16/8 hr이다.

데이터 수집 및 분석

배양 6주 후, 각 계통의 연령에 따른 호르몬 종류별, 호르몬 농도별(각 계통의 연령 × 호르몬 종류별, 호르몬 농도별) shoot tip 절편체 당 발생한 3 반복의 multi-shoots의 수를 측정하였다. 또한 배양 7주 후 RA2, RA4 계통 3반복의 발근율, 뿌리 수, 뿌리길이를 측정하였다. 수집된 데이터를 이용하여 통계 분석은 IBM SPSS Statistics 프로그램의 Duncan test를 이용하여 수행하였고, 통계적 유의성 검정을 위한 유의수준은 0.05로 하였다.

SSR marker를 이용한 생성된 multi-shoots 식물체(조직배양묘)의 돌연변이 검정

gDNA 추출 방법

RA2와 RA4 계통의 BA와 TDZ 호르몬으로 말미암아 생성된 multi-shoots을 계대배양하여 4주 정도 성장시킨 후 0.2 g 잎을 각각 채취하여 CTAB방법(Doyle and Doyle 1987)으로 gDNA를 추출하였다. 추출한 gDNA는 Nano drop (DS-11 spectrophotometer/DeNovix/USA)을 이용하여 농도 및 순도(Purity: 1.8 < 260/280 < 2.0 and 260/230 > 2.0)측정하여 순도가 높은 것

을 사용하였다.

SSR marker를 위한 PCR 및 전기영동 조건

Lee and Park (2017)에서 PIC값이 높은 순서대로 구성된 무 EST-SSR primer 26 sets를 screening 하여 3개의 primer sets (RSS2047, RSS0015, RSS1146)을 선발하였다(Table 1). PCR reaction mixture는 Template DNA (50 ng/ul) 1.5 ul, Dyne Ready-2x-Go (PCR buffer, dNTPs, DNA polymerase (DYNEBIO, Korea) 7.5 ul, 5X TuneUp™ solution (optional) 1.5 ul, Forward Primer (5 pmoles/ul) 1.5 ul, Reverse Primer (5 pmoles/ul) 1.5 ul, Distilled water 1.5 ul로 전체 15 ul volume으로 하였다. PCR 기기(T100 Thermal Cycler/BIORAD/USA) 조건은 Pre-denaturation 95°C 5 분, denaturation 94°C 30초, Primer-annealing 55°C 30초, Extention 72°C 60초, Full-extention 72°C 10분으로 35 cycle 작동시켰다. 전기영동 조건은 3% Agarose gel (0.5X TBE buffer 이용)에 180v 60 min을 영동 후 관찰하였다.

결과 및 고찰

BA 호르몬을 이용한 무 계통의 유묘와 성묘의 shoot-tip culture 효과

RA2 계통의 BA 호르몬 대해서 유묘에서는 0.44 μ M 을 제외한 나머지 농도에서 통계적으로 유의성 있게 많은 multi-shoots이 형성된 것으로 나타나나 성묘의 경우에는 모든 농도에서 통계적으로 유의성이 나타나지 않아 호르몬 수준에

따른 효과가 없는 것으로 나타났다(Table 2). RA4 계통의 경우 유묘나 성묘에서 BA 호르몬에 대한 통계적으로 유의성이 나타나지 않아 호르몬 수준에 따른 효과가 없는 것으로 나타났다(Table 3).

RA2 계통 유묘에서는 BA 1.33 μ M 첨가 배지에서 평균 14.7개로, 성묘의 경우 BA 1.78 μ M 첨가 배지에서 평균 11.3개로 가장 많은 개수의 multi-shoots이 형성되었다. 각각의 농도에서 가장 많은 수의 multi-shoots를 형성하였지만 BA 호르몬 농도별 발생한 multi-shoots 개수는 유의수준에서 큰 차이가 없었다(Table 2). 또한 대조구에서도 shoot가 발생하였는데 이는 shoot-tip을 배지에 치상할 때 상처난 것에 기인한 것으로 추정된다. RA4 계통에서도 유묘나 성묘에서 BA 호르몬 농도별 처리효과는 유의수준에서 별차이가 없었지만 유묘에서 BA 2.22 μ M 첨가 배지에서 평균 11.7개로 가장 많은 multi-shoots가 형성되었고, 성묘에서는 BA 1.33 μ M 첨가 배지에서 평균 13.7개로 가장 많은 multi-shoots이 형성되었다(Table 3).

위의 결과를 통해 계통 내에서, BA 호르몬 농도별에 대한 shoot-tip 배양시 multi-shoots의 생성 효과가 유의수준에서는 차이가 거이 없었지만 두 계통(RA2, RA4)을 비교할때 농도별로 실제 수치상 많이 다른 것으로 나타났다. 계통별 BA 호르몬 농도에 따른 multi-shoots이 가장 많이 생성되는 호르몬 농도의 차이(유묘의 경우 RA2:BA 1.33 μ M, RA4:BA 2.22 μ M; 성묘의 경우 RA2: BA 1.78 μ M, RA4: BA 1.33 μ M)뿐만 아니라, 'multi-shoots의 개수 차이(유묘의 경우 RA2:7-15개, RA4:6-12개; 성묘의 경우 RA2:8-11개, RA4:4-14개)도 많이 차이를 알 수 있었다(Table 2, 3). 또한 실험에 사용된 재료, 즉 유묘와 성묘 차이에 따라 multi-shoots이 가장 많이 생성되는 농도와 수

Table 1 SSR marker information on the 3 EST-SSR primer sets used in this study

Marker name	Forward primer sequence (5' → 3')	Reverse primer sequence (5' → 3')
RSS2047	CCTCAGAAACGCCAAAAGAG	ACAGGTGATCGAGTTGTC
RSS0015	GRACCAAAGCGCAAACAACA	GTACCAAAGCGCAAACAACA
RSS1146	CGCACCGTCAACTTCTCAG	CATGGACTTGTGTACGCACC

Table 2 The effect of BA and TDZ on induction of multi-shoots from shoot tip explants of *Raphanus sativus* line RA2 after 6 weeks in culture

Explant Age	Average numbers of multi-shoots per explant										
	BA (μ M)						TDZ (μ M)				
	0.00	0.44	0.89	1.33	1.78	2.22	0.00	0.23	0.45	2.25	4.5
Early explant*	0.0 ± 0.0 ^c	7.0 ± 1.5 ^b	12.7 ± 1.7 ^a	14.7 ± 0.3 ^a	13.7 ± 1.9 ^a	12.3 ± 1.2 ^a	0.0 ± 0.0 ^c	3.0 ± 0.6 ^b	7.0 ± 1.7 ^a	0.3 ± 0.3 ^c	0.0 ± 0.0 ^c
Juvenile explant**	0.7 ± 0.7 ^b	10.7 ± 2.0 ^a	10.7 ± 2.8 ^a	8.0 ± 2.5 ^{ab}	11.3 ± 5.4 ^a	9.0 ± 2.1 ^{ab}	0.7 ± 0.7 ^b	0.3 ± 0.3 ^b	3.0 ± 0.0 ^a	0.7 ± 0.7 ^b	0.0 ± 0.0 ^b

*Radish plant shoot-tip, 5 day (leaf no. 2 ~ 3) after germination.

**Radish plant shoot-tip, 30 day (leaf no. 8 ~ 9) after germination. Values are means and standard errors of 3 replicates with 3 explants per bottle repeated 2 times within explant age for each treatment. Means followed by the same letter in each row are not significantly different from each other (Duncan's Multiple Range Test at 5% level).

Table 3 The effect of BA and TDZ on induction of multi-shoots from shoot tip explants of *Raphanus sativus* line RA4 after 6 weeks in culture

Explant Age	Average numbers of multi-shoots per explant										
	BA (μM)						TDZ (μM)				
	0.00	0.44	0.89	1.33	1.78	2.22	0.00	0.23	0.45	2.25	4.5
Early explant*	0.0 \pm 0.0 ^b	7.3 \pm 2.4 ^a	10.0 \pm 0.6 ^a	6.7 \pm 2.8 ^a	6.0 \pm 3.2 ^{ab}	11.7 \pm 0.3 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	0.7 \pm 0.3 ^a	0.3 \pm 0.3 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a
Juvenile explant**	0.0 \pm 0.0 ^b	4.0 \pm 1.0 ^{ab}	10.3 \pm 1.9 ^a	13.7 \pm 0.9 ^a	7.7 \pm 2.7 ^{ab}	12.3 \pm 5.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^b	3.7 \pm 1.2 ^a	3.7 \pm 0.3 ^a	0.7 \pm 0.3 ^b	0.3 \pm 0.3 ^b

*Radish plant shoot-tip, 5 day (leaf no. 2~3) after germination.

**Radish plant shoot-tip, 30 day (leaf no. 8~9) after germination. Values are means and standard errors of 3 replicates with 3 explants per bottle repeated 2 times within explant age for each treatment. Means followed by the same letter in each row are not significantly different from each other (Duncan’s Multiple Range Test at 5% level).

가 다름을 알 수 있었다. Paek et al. (1987)은 F₁ 품종 ‘Gungjung (Japanese radish)’의 유묘를 이용하여 shoot-tip 배양을 한 결과 BA 호르몬의 여러 농도 중 2.22 μM 첨가 배지에서 가장 많은 5.7개의 multi-shoots를 얻었다는 보고에서도 위의 논문 결과와 다름을 보여 주었다. 같은 복지계 무 계통 간에 BA 호르몬에 대한 multi-shoots의 생성 효과가 많이 다른 것을 알 수 있었다.

각 계통의 유묘와 성묘의 shoot-tip을 이용한 결과 생성된 multi-shoots의 평균수는 유묘와 성묘가 비슷하였지만 표준 오차가 유묘가 각 계통에 있어 전체적으로 더 낮아 안정적인 multi-shoots의 생성에 유묘가 더 효과적인 것으로 나타났으며 통계적 유의수준내에서 두 계통의 유묘나 성묘에서 낮은 BA 농도에서도 multi-shoots이 많이 생성되므로 식물변이 안정성에 있어서도 낮은 BA 농도 처리로 경정배양하는 것이 대량증식에 더 효과적인 것으로 예상된다(Table 2).

또한 BA 호르몬 첨가 배지에서 배양된 식물체 대부분에서 대조구와 비교하여 엽폭이 좁아지는 경향이 나타났으며 이는 BA 호르몬의 영향으로 추정된다. 이러한 경향은 RA2 계통에서 확실하게 나타났다. RA4 계통의 경우 저농도의 BA가 첨가된 배지에서는 잎의 형태가 정상적이지만 BA의 농도가 높아질수록 엽폭이 좁아졌다. 이러한 현상은 배 (Pear)의 기내배양에서도 BAP의 농도가 증가하면서 엽폭이 좁아지는 같은 현상이 나타났다고 보고되었고 *Coscinium fenestratum* 기내배양에서도 높은 BA 농도에서 작고 좁은 잎을 가지며 성장이 저해된 multiple shoots 덩어리를 형성했다고 보고하였다(Moretti et al. 1992; Senarath 2010).

RA2 계통과 RA4 계통에서 공통적으로 하배축 절단면에서 tumor가 형성되었다. 특히 성묘 shoot-tip에서 대부분 큰 tumor가 형성되었다. 성묘 절편체는 tumor의 여러 방향에서 multi-shoots가 형성되어 multi-shoots로 인해 절단면이 배지 위로 들려지는 현상이 대부분 일어났다. BA나 TDZ를 첨가한 배지에서 배양된 유묘와 성묘의 절편체에서 대부분 tumor를 형성하였고 BA가 첨가된 배지에서 형성된 tumor가 TDZ에서 형성된 tumor보다 대부분이 크게 형성되었다. 이

러한 tumor 형성의 유력한 원인은 multi-shoots 유도를 위해 첨가한 cytokinin으로 인해 절편체 뿌리 조직 내의 auxin과 cytokinin 비율이 변화되므로 기인한다고 보고되었다(Lutova and Dodueva 2019). 이러한 현상은 바나나의 대량번식에서도 다양한 농도의 BAP가 포함된 재분화 배지에서 단단한 meristematic tuber같은 구조를 형성하였고, 바나나 shoot-tip 배양에서도 shoot 증식동안 Tuber같은 구조가 shoot의 기저부에서 형성되었고 BAP에 기인한다고 보고하였다(Ferdous et al. 2015; Habib 1994).

TDZ 호르몬을 이용한 무 계통의 유묘와 성묘의 shoot-tip 배양 효과

RA2 계통의 TDZ 호르몬 대해서 유묘에서는 0.45 μM 과 0.23 μM 농도에서, 성묘에서는 0.45 μM 농도에서 통계적으로 유의성 있게 많은 multi-shoots이 형성된 것으로 나타났으며 RA4 계통의 경우 성묘에서 0.45 μM 과 0.23 μM 농도에서 통계적으로 유의성이 있게 많은 multi-shoots이 형성된 것으로 나타났으나 유묘에서는 호르몬 수준에 따른 효과가 없는 것으로 나타났다(Table 2, 3).

TDZ를 사용한 무 유묘와 성묘의 shoot tip 배양에서는 BA에 비해 multi-shoots의 개수가 많이 적게 나타났다. RA2 계통에서는 TDZ 농도가 증가할수록 multi-shoots의 수가 증가하여 유의수준내에서 TDZ 0.45 μM 첨가 배지에서 가장 많은 multi-shoots이 형성되었으나(유묘 7.0개, 성묘 3.0개) TDZ 2.25 μM 부터는 거의 multi-shoots이 형성되지 않았다(Table 2). RA4 계통에서는 유묘의 경우 거의 multi-shoots이 생성되지 않았고 성묘의 경우 유의수준내에서 TDZ 0.23, 0.45 μM 첨가 배지에서 3.7개로 가장 많은 multi-shoots이 생성되었으나 그 이상의 농도에서는 유묘에서와 같이 생성되지 않았다(Table 3).

결과를 통해 계통내(각 RA2, RA4)에서, 식물재료의 연령에 따라 TDZ 호르몬 농도수준에 대한 shoot-tip 배양시 multi-shoots의 생성 효과가 유의수준내에서는 차이가 매우 다른

것을 볼 수 있었다. RA2의 경우 성묘보다 유묘에서의 multi-shoots의 생성 효과가 더 좋았고 RA4의 경우는 반대로 효과가 나타났다. 또한 TDZ 호르몬에 있어 RA2 유묘에서 최고 7개의 multi-shoots을 생성(0.45 μM) 하여 RA4 보다 효과가 좋은 것으로 나타났다. BA 호르몬과 같이 같은 복지계 무계통간에 TDZ 호르몬에 대한 농도별 경향은 같지만 multi-shoots의 유도 효과가 많이 다른 것을 알 수 있었다.

또한 TDZ 첨가 배지에서 배양된 두 계통(RA2, RA4)은 전체적으로 농도가 증가할수록 잎이 부푸는 경향이 있었으나 RA4 계통은 좀더 심하게 나타났고 RA2는 잎이 좁고 길게 형성되었다. BA를 첨가한 배지에서 배양된 식물체에 비해 tumor의 형성이 훨씬 작았고, RA4 계통에서는 매우 작은 tumor가 생성되거나 없고 tumor 밑에 일반적인 뿌리도 형성되었다. Murthy et al. (1995)은 TDZ 포함 배지에서 배양된 peanut 유묘에서 auxin의 새로운 합성이 관찰되었다고 보고하였는데 이 실험에서도 TDZ의 비슷한 메커니즘으로 auxin이 합성되어 일반적인 뿌리가 형성되지 않았을까 추정된다.

SSR marker를 이용한 생성된 multi-shoots 식물체(조직배양묘)의 돌연변이 검증

RA2 계통과 RA4 계통을 재료로 BA 및 TDZ 호르몬 수준별로 얻은 multi-shoots 식물체(조직배양묘)의 DNA를 추출하였다. 무의 26 EST-SSRs를 screening 하여 3개의 primer sets (RSS2047, RSS0015, RSS1146)를 선발하여 계통과 조직배양묘간의 SSR marker를 비교하였다. 실험결과 RA2 계통에서는 원종(mother plant)과 조직배양묘간에 조금도 변이체로 나타난 것이 없었고 RA4 계통에서는 SSR primer RSS2047을 사용했을 때 TDZ 호르몬을 사용하여 생성된 조직배양묘 한 개체에서 SSR 변이가 일어난 것으로 나타났다(Fig. 1). 그러나 SSR은 조직내에서 자주 변이가 나타나는 것으로 알려져 있고 다른 SSR primer에서는 변이가 나타나지 않은 것으로 보아 무의 형질에 변이를 나타낸다고 볼 수 없어 염려한 돌연변이체라고는 말할 수 없음을 나타내었다.

NAA와 IBA 농도에 따른 RA2, RA4 계통별 뿌리 유도 및 발달

발아 후 40일된 RA2 성묘의 뿌리 밑부분을 자르고 각 호르몬의 종류와 농도별로 치상하여 배양 7주 후 결과는 Table 4와 Fig. 2와 같다. 계통간(RA2, RA4), 호르몬간(NAA, IBA), 계통과 호르몬간의 발근율, 뿌리수, 뿌리 길이가 통계적으로 유의차가 없었다. 발근율을 볼 때 NAA의 경우 0.5 μM 첨가배지(66.7%)보다 2.7 μM 첨가배지(100%)가 양호하였고 IBA 경우 9.8 μM 첨가배지(66.7%)보다 4.9 μM 첨가배지(100%)가 더 양호하였다. 뿌리 수에 있어서는 대조구(24개)나 IBA 9.8 μM 첨가배지(25.5개)에서 더 많은 수가 나왔지만 발근에 있어서는 발근율이 가장 중요하기 때문에 NAA 2.7 μM 첨가배지(16개)와 IBA 4.9 μM 첨가배지(15.3개)가 효과적이었다고 말할 수 있으며, 이중 IBA 4.9 μM 첨가배지가 가장 효과적이라고 말할 수 있는데 이는 뿌리의 발달이 4차근까지 형성되었기 때문이다. 또한 대조구에 비해 호르몬 처리한 대부분의 RA2 식물체들이 생육이 더 왕성한 것으로 관찰되었는데 이는 auxin 호르몬의 영향으로 추정된다.

발아 후 8주된 RA4 성묘의 뿌리 밑부분을 자르고 각 호르몬의 종류와 농도별로 치상하여 배양 7주 후 결과는 Table 4와 Fig. 2와 같다. 발근율, 뿌리수, 뿌리 길이가 통계적으로 유의차가 없었다. NAA 0.5 μM 첨가배지와 2.7 μM 첨가배지 모두에서 발근율이 100%로 양호하였으나 0.5 μM 첨가배지에서 뿌리 수가 13.5개로 더 높고 뿌리 발달 수준도 4차근이 형성되어 더 우수한 것으로 나타났다. IBA 경우 발근율이 100%, 뿌리 수 15.7개, 뿌리 발달 수준도 5차근까지 형성하여 4.9 μM 첨가배지가 9.8 μM 첨가배지보다 더 양호한 결과를 보였다. RA4 계통에 있어서 NAA와 IBA의 뿌리 발달 효과를 비교할 때 NAA 0.5 μM 첨가배지와 IBA 4.9 μM 첨가배지의 발근율은 서로 같으나 IBA에서의 뿌리 수가 15.7개로 더 많고 뿌리 발달 수준도 5차근이 형성되어 IBA 4.9 μM 첨가배지가 가장 효과적인 것으로 나타났다.

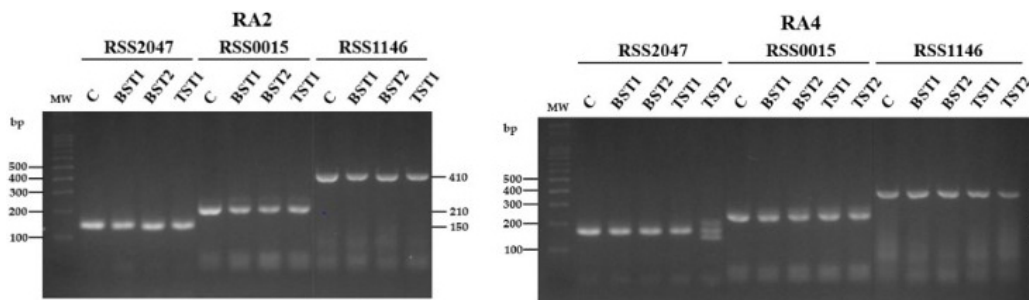


Fig 1 SSR marker analysis of multi-shoots plants using *Raphanus sativus* lines RA2 and RA4 of BA and TDZ hormones. C: mother plant; BST1:BA shoot-tip multi-shoots plant 1; BST2: BA shoot-tip multi-shoots plant 2; TST1: TDZ shoot-tip multi-shoots plant 1; TST2: TDZ shoot-tip multi-shoots plant 2, DNA size marker (MW: 100 bp)

Table 4 The effect of NAA and IBA on induction of roots from seedling of *Raphanus sativus* line RA2 and RA4 after 7 weeks in culture

Type of growth regulator	Conc. (μM)	Rooting (%)		Average number of roots		Average length of roots (cm)		Lateral root	
		RA2	RA4	RA2	RA4	RA2	RA4	RA2	RA4
Contol		66.7 ± 0.3	33.3 ± 0.3	24.0 ± 8.5	12.0 ± 4.0	9.4 ± 3.4	7.1 ± 2.4	Tertiary	Tertiary
NAA	0.5	66.7 ± 0.3	100 ± 0.0	14.0 ± 6.2	13.5 ± 4.7	10.3 ± 4.2	12.8 ± 4.5	Tertiary	Quaternary
	2.7	100 ± 0.0	100 ± 0.0	16.0 ± 7.0	1.7 ± 0.7	8.8 ± 3.8	3.2 ± 0.6	Tertiary	Secondary
IBA	4.9	100 ± 0.0	100 ± 0.0	15.3 ± 2.4	15.7 ± 10.1	13.3 ± 1.0	10.7 ± 5.9	Quaternary	Quinary
	9.8	66.7 ± 0.3	66.7 ± 0.3	25.5 ± 8.7	7.0 ± 2.9	13.5 ± 5.3	9.2 ± 3.1	Tertiary	Tertiary
ANOVA ^Y									
Line		ns*		ns		ns			
PGR		ns		ns		ns			
Line × PGR		ns		ns		ns			

*Not significant. ^YANOVA was carried out for the effect of line and PGR on rooting of *R. sativus* L. Values are means and standard errors of 3 replicates with 3 explants per bottle repeated 2 times within explant age for each treatment. Means followed by the same letter in each column are not significantly different according to Duncan's Multiple Range Test at 5% level.

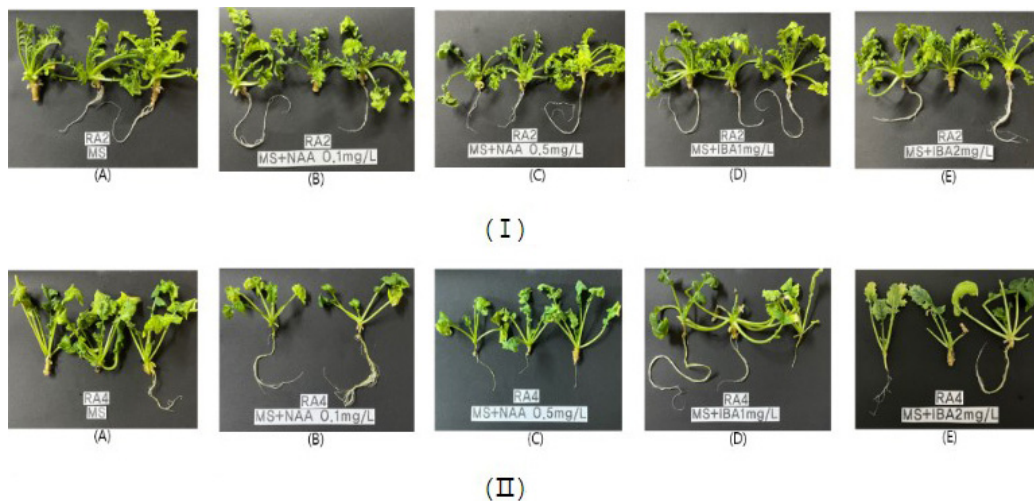


Fig 2 The effect of NAA and IBA on induction of roots from seedling of *Raphanus sativus* line RA2 (I) and RA4 (II) after 7 weeks in culture. (A) MS (control); (B) MS+ NAA 0.5 μM; (C) MS+NAA 2.7 μM; (D) MS+IBA 4.9 μM; (E) MS+IBA 9.8 μM

적 요

순도가 균일한 원종을 대량생산하기 위해 원원종 종자를 이용하여 조직배양 기술 중 경정배양을 이용하였다. 실험 재료로는 원원종 계통 RA2와 RA4 계통을 사용하였다. BA 호르몬 사용의 경우 RA2 계통의 유묘에서는 BA 1.33 μM 첨가 배지에서 평균 14.67개로, 성묘의 경우 BA 1.78 μM 첨가 배지에서 평균 11.33개로 가장 많은 개수의 multi-shoots이 형성되었으며, RA4 계통 경우 유묘에서는 BA 2.22 μM 첨가 배지에서 평균 11.67개로, 성묘에서는 BA 1.33 μM 첨가 배지에서 평균 13.67개로 가장 많은 multi-shoots이 형성되었지만 BA 농도별로 유의수준에서 거의 차이가 없는 것으로 나타났다. TDZ 호르몬 사용의 경우 RA2 계통은 TDZ 농도가 증가할수

록 multi-shoots의 수가 증가하여 TDZ 0.45 μM 첨가 배지에서 가장 많은 multi-shoots가 형성되었으나(유묘 7.0개, 성묘 3.0개), TDZ 2.25 μM 부터는 거의 multi-shoots가 형성되지 않았다. RA4 계통은 유묘의 경우 거의 multi-shoots이 생성되지 않았고 성묘의 경우 TDZ 0.23, 0.45 μM 첨가 배지에서 3.7개의 multi-shoots이 생성되었으나 그 이상의 농도에서는 유묘에서와 같이 생성되지 않았다. 생성된 multi-shoots를 계대배양하여 성장한 조직배양묘를 SSR marker를 사용하여 원종계통과 비교분석한 결과 생성된 조직배양묘에서 변이의 양상이 약하게 보인 것이 있었으나 돌연변이체로 나타난 것은 없었다. 또한 뿌리 발근에 있어서는 RA2, RA4 계통 모두 대체적으로 IBA 4.9 μM 첨가된 배지에서 발근율, 뿌리 수, 뿌리발달 정도 등이 가장 좋았다.

사 사

본 결과물은 농촌진흥청의 재원으로 국가생명연구자원선진화사업의 지원을 받아 연구되었음(PJ016045032023).

References

- Chang C, Chang WC (2000) Micropropagation of *Cymbidium ensifolium* var. *misericors* through callus-derived rhizomes. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 36:517-520, November-December
- Choi H, Yang JC, Ryu SH, Yoon SM, Kim SY, Lee SY (2019) In vitro Multiplication of *Hosta* Tratt. Species Native to Korea by Shoot-tip Culture. *Kor J Plant Res* 32(1):53-62.
- Doyle, JJL, Doyle, JL (1987) Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. *Phytochem Bull* 19(11): 11-15
- Ferdous MH, Masum Billah AA, Mehraj H, Taufiqed T, Jamal Uddin AFM (2015) BAP and IBA pulsing for in vitro multiplication of banana cultivars through shoot-tip culture. *J Biosci Agric Res* 3(2):87-95
- Gao R, Wu SQ, Piao XC, Park SY, Lian ML (2014) Micropropagation of *Cymbidium sinense* using continuous and temporary airlift bioreactor systems. *Acta Physiol Plant* 36:117-124
- Habib A (1994) Mass propagation of *Mussa sapientum* var. *Sagar* and performance of different genotype of *Mussa cavendishii* (Grand Naine) in Bangladesh. M.S. Thesis, Dept. of Botany, University of Dhaka p. 53
- Jitsopakula N, Thammasirib K, Ishikawa K (2013) Efficient adventitious shoot regeneration from shoot tip culture of *Vanda coerulea*, a Thai orchid. *Sci Asia* 39:449-455
- Korea Seed Association (2022) Statistics. Status of vegetable seed exports in 2021
- Lee ON, Park HY (2017) Assessment of genetic diversity in cultivated radishes (*R. sativus* L.) by agronomic traits and SSR markers. *Scientia Horticulturae* 223:19-30
- Lutova L, Dodueva I (2019) Genetic control of regeneration processes of radish plants in vitro: from phenotype to genotype. *Biol Comm* 64:124-132
- Moretti C, Scozzoli A, Pasini D, Paganelli F (1992) In vitro propagation of pear cultivars. *Acta Hort* 300:115-118
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1995) TDZ-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. *Physiol Planta* 94:268-276
- Naseem A, Mohammad F (2018) THIAZURON: FROM UREA DERIVATIVE TO PLANT GROWTH REGULATOR. Springer, Singapore.
- Paek KY, Chandler SF, Thorpe TA (1987) Micropropagation of *Raphanus sativus* L. var. *longipinnatus* (Japanese radish) cv. Gungjung. *PCTOC* 9(2):159-165
- Senarath WTPSK (2010) In vitro propagation of *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. (Menispermaceae) - an endangered medicinal plant. *J Natl Sci Found Sri Lanka* 38(4):219-223
- Seo JP, Park KW, Kim HJ, Yang SY, Nou IS (2003) Identification of S-haplotypes and its relationship with activity of self-incompatibility in radish (*Raphanus sativus* L.). *Kor J Breed* 35(5):313-318
- Shimasaki K, Uemoto S (1990) Micropropagation of a terrestrial *Cymbidium* species using rhizomes developed from seeds and pseudobulbs. *PCTOC* 22:237-244
- Tokuhara K, Masahiro M (1993) Micropropagation of phalaenopsis and doritaenopsis by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Rep* 13:7-11
- Wang R, He LS, Xia B, Tong JF, Pak NL, Pak FP (2009) A micropropagation system for cloning of hemp (*Cannabis Sativa* L.) by shoot tip culture. *J Bot* 41(2):603-608
- Waseem K, Jilani MS, Khan MS (2009) Rapid plant regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* L.) through shoot tip culture. *Afr J Biotech* 8(9):1871-1877