

국화 ‘오블랑’의 재생 효율 증진을 위한 식물생장조절제와 AgNO_3 적정 농도 선별

윤여진 · 양용준

Optimal concentrations of plant growth regulators and AgNO_3 for the improvement of regeneration efficiency in *Chrysanthemum morifolium* ‘Ohblang’

Yeo Jin Youn · Yong Joon Yang

Received: 14 September 2023 / Revised: 18 September 2023 / Accepted: 18 September 2023 / Published: 11 October 2023
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract A plant regeneration system was developed through shoot organogenesis from *in vitro* leaf explants of *Chrysanthemum morifolium* ‘Ohblang’. The effects of different concentrations of plant growth regulators and AgNO_3 on efficient shoot regeneration and inhibition of browning were evaluated in chrysanthemum. The explants were cultured on MS shoot induction medium supplemented with 12 combination treatments of 6-benzyladenine (BA) 0.5, 1.0 and 2.0 mg/L, and α -naphthaleneacetic acid (NAA) 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/L in darkness for 6 weeks and cultured under a 16/8 h photoperiod for 6 weeks. The highest shoot regeneration was obtained from the explants cultured on the medium with 1.0 mg/L BA and 1.0 mg/L NAA. Based on this result, AgNO_3 was added to a shoot induction medium containing MS salts, vitamins, 1.0 mg/L BA, 1.0 mg/L NAA, 30 g/L sucrose, and 6 g/L agar to reduce browning of chrysanthemum leaf explants. In the control treatment without AgNO_3 , leaf explants turned brown at the cut edge; however, browning was not observed in AgNO_3 treatments. Shoot organogenesis was higher at low concentrations of AgNO_3 and decreased with an increase in AgNO_3 concentration. The explants cultured on shoot induction medium (MS salts, vitamins, 1.0 mg/L BA, 1.0 mg/L NAA) with 1 mg/L of AgNO_3 produced the highest shoot regeneration with 2.6 shoots per explants and a

browning index of 0.7. When the regenerated shoots were detached from the explants and cultured on MS medium, the shoots were elongated and rooted successfully.

Keywords Chrysanthemum, ‘Ohblang’, Shoot organogenesis, Plant regeneration, Silver nitrate

서론

국화(*Chrysanthemum morifolium*)는 장미, 카네이션과 함께 세계에서 소비가 가장 많은 3대 화훼작물 중 하나로서, 장식용뿐만 아니라 식용, 약용으로도 사용된다(Pandya and Saxena 2001). 우리나라의 절화 국화 재배면적은 299ha이며, 이는 전체 절화 면적의 약 25%에 해당된다(MIFAFF 2022). 그러나 국내에서 재배되는 대부분의 국화는 해외에서 도입된 품종으로 해마다 많은 로열티가 지불되고 있기 때문에 신품종 육성이 필요한 상황이다(Shin 2012). 그리하여 스프레이 국화의 경우 최근 국내에서 ‘오블랑’, ‘드림라운드’(Jung et al. 2013), ‘그린캔디’(Lim et al. 2013) 등 다양한 품종이 개발되었다.

그중 국화 ‘오블랑’은 국립원예특작과학원에서 2015년도에 육성한 품종으로, ‘바카디’와 ‘연자’를 교배하여 만든 스프레이 품종이다. 10월 하순에 자연 개화하는 절화용 국화로 고온일 때 균일하게 자라고, 절화수명과 기호도가 우수하다는 특성이 있다. 그러나 흰녹병에는 취약하다는 단점이 있어, 이를 개선하기 위해서는 식물 형질전환 및 분자 육종을 통한 생명공학 육종 기술이 필요하다. 식물 형질전환을 통한 육종에 있어서는 식물 조직배양이 기반이 되어야 하며, 이를 통해 효율적인 식물체 재생 체계가 확립되어야 한

Y. J. Youn · Y. J. Yang (✉)
상명대학교 식물식품공학과
(Department of Plant and Food Sciences, Sangmyung University,
Cheonan 31066, Korea)
e-mail: yjyang@smu.ac.kr

다(Kim and Hyung 2014). 국화의 기내 식물체 재생은 다양한 품종에서 주로 잎(Lee et al. 1999), 줄기(Kaul et al. 1990) 등의 절편체로부터 기관형성을 통하여 성공적으로 이루어졌다. 또한 캘러스 단계를 거쳐 유식물체로 발달하는 체세포배 형성(May and Trigiano 1991)에 대한 연구도 보고된 바 있다. 국화의 신초 기관형성은 절편체의 종류와 상태, 성장조절제의 종류 및 농도, 배지 조성, pH 등의 요인에 의해 많은 영향을 받는다(Panicker et al. 2007). 이러한 국화의 식물체 재생에 대한 다양한 연구가 여러 품종을 대상으로 이루어졌음에도 ‘오블랑’의 식물체 재생에 대한 보고가 이루어진 바 없고, 또한 절편체에서의 갈변이 많이 발생하는 등 재생이 어렵다는 문제가 있다.

절편체의 갈변은 조직배양시 에틸렌 가스 및 페놀 화합물에 의한 것으로, 기내 식물체 대량 증식에서 생육불량의 주요 원인으로 작용하여 조직배양에서 큰 문제점으로 이어져 왔다. 해바라기(Chraïbi et al. 1991), 딸기(Qin et al. 2005) 등 다양한 식물에서 $AgNO_3$ 를 이용한 갈변 방지 효과를 입증하였고, 또한 나리(Roh et al. 2013)와 국화(Kim and Hyung 2014)의 식물체 배양에서 $AgNO_3$ 를 사용함으로써 갈변을 억제 시킬 뿐 아니라 재분화에 도움이 된다고 보고되었다.

따라서 본 연구에서는 국내 품종인 국화 ‘오블랑’에 있어 신초 재생에 적합한 식물성장조절제와 $AgNO_3$ 를 이용하여 효율적인 재생 및 갈변방지를 위한 적정 조건을 알아보고자 하였으며, 이를 통해 효율적인 재생 시스템을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 기내 신초배양

식물재료는 국화(*Chrysanthemum morifolium*) ‘오블랑’의 기내 신초배양을 통해 얻어진 잎 절편체를 이용하여 식물체 재생 실험을 수행하였다. 기내 신초배양은 MS 염류와 비타민(Murashige and Skoog 1962)에 sucrose 30 g/L와 agar 8 g/L를 첨가한 후, pH를 5.8로 조정된 배지를 사용하였다. 배양은 형광등을 이용한 광도 $32 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 16/8 h 광주기, 온도 $23 \pm 2^\circ C$ 인 배양실에서 이루어졌으며 4-6주 간격으로 신선한 동일 배지에서 계대배양을 실시하였다.

잎 절편체로부터의 신초 기관형성

기내 배양된 신초의 잎 절편체로부터 신초 기관형성에 적합한 조건을 구명하기 위하여 식물성장조절제의 종류와 $AgNO_3$ 의 농도에 따른 배지조성을 달리하여 실험을 수행하였다. 4-6주 동안 기내 배양된 식물체의 상단부로부터 완전히 전개된 잎을 절취한 후, 10-15 mm² 크기로 주맥을 포함하게 4면 절단하여 향측면이 배지에 닿도록 치상하였다. 모든

배양은 $23 \pm 2^\circ C$ 인 배양실에서 이루어졌으며, $32 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 16/8 h 광주기 조명하에서 실시하였다.

식물성장조절제로부터의 신초 기관형성 유도

기내 배양된 국화의 절취한 잎 절편체로부터 신초 기관형성에 미치는 식물성장조절제의 영향을 알아보기 위하여 MS 기본배지(MS 염류와 비타민, sucrose 30 g/L, agar 6 g/L)에 6-benzyladenine (BA) 0.5, 1.0, 2.0 mg/L와 α -naphthaleneacetic acid (NAA) 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L를 조합하여 총 12개 처리로 실험을 수행하였다. 잎 절편체를 배지에 치상하여 6주 동안 암조건에서 배양 한 후 명조건으로 옮겨 bud 및 신초 형성을 유도하였다.

$AgNO_3$ 를 첨가한 배지에서의 신초 기관형성 유도 및 갈변억제

잎 절편체로부터 효율적인 신초 기관형성 유도 및 갈변을 감소하는데 적합한 $AgNO_3$ 농도를 알아보고자 MS 염류와 비타민, BA 1.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L, sucrose 30 g/L, agar 6 g/L를 포함한 기본배지에 $AgNO_3$ 0, 1, 3, 5, 7, 10 mg/L를 각각 첨가하여 실험을 수행하였다.

갈변억제의 효과를 수치화 하기 위한 갈변지수(Browning index)는 배양 12주 후 육안으로 관찰하여 0-4단계로 나누어 조사하였다. 0단계는 절편체의 갈변이 나타나지 않으며, 1단계는 갈변이 절편체당 면적의 1/4 이하, 2단계는 절편체당 면적의 2/4, 3단계는 절편체당 면적의 3/4, 4단계는 절편체의 전체 면적 갈변 되었을 때를 기준으로 하였다.

실험구 조사 및 통계분석

모든 처리구는 배양 용기 당 절편체 4개씩 치상한 것을 1반복으로 하여 처리당 5반복을 실시하였고, 완전임의배치법으로 배치하여 배양하였다. 배양 12주 후 절편체의 생존율, 캘러스 형성율(전체 절편체에서 캘러스가 형성된 절편체의 백분율), bud 형성율(전체 절편체에서 bud가 형성된 절편체의 백분율), 절편체당 bud 수, 신초 형성율(전체 절편체에서 신초가 재생된 절편체의 백분율), 절편체당 신초 수를 각각 조사하였으며, 신초의 수는 bud가 형성된 절편체에서 완전히 잎이 전개한 약 5 mm 크기 이상의 신초를 집계하여 표시하였다.

통계분석은 SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA)로 one-way ANOVA를 실시하였고, Duncan's multiple range test로 사후검정하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 설정하여 분석하였다.

신초 신장 및 발근 유도

배양 12주 후 절편체로부터 재생된 신초 중 2 cm 이상 신장한 신초를 절편체에서 분리하여 신초 배양배지로 옮겨 신장과

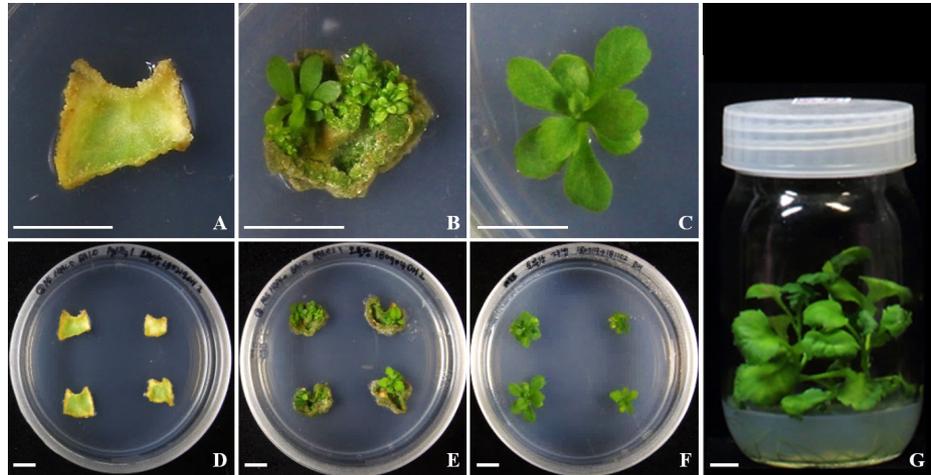


Fig 1 Plant regeneration via adventitious shoot organogenesis from leaf explants of chrysanthemum ‘Ohblang’. (A, D) Callus and bud formation from leaf explants after 6 weeks in MS medium supplemented with 1.0 mg/L BA and 1.0 mg/L IAA. (B, E) Shoot formation from leaf explants cultured on MS medium with 1.0 mg/L BA and 1.0 mg/L NAA after 6 weeks (12 weeks in total). (C, F) Shoot multiplication and elongation after 8 weeks (16 weeks in total) in culture. (G) Rooting of regenerated shoot in MS medium. Scale bar: 1 cm

발근을 유도하였다. 신초 배양배지는 MS 염류와 비타민, sucrose 30 g/L, agar 8 g/L를 첨가하고 pH를 5.8로 조정된 배지를 사용하였다. 배양은 23±2°C인 배양실에서 이루어졌으며, 32 μmol·m⁻²·s⁻¹, 16/8 h 광주기 조명하에서 실시하였다.

결 과

기내 잎 절편체로부터의 신초 기관형성

국화 ‘오블랑’의 잎 절편체를 재료로 식물생장조절제와 AgNO₃를 처리하여 신초 기관형성에 적합한 농도를 선정하고자 실험을 수행하였다. 기내 잎 절편체를 신초 기관형성 배지에 치상하여 암조건에서 배양하였으며, 배양 3주 후부터 절단면을 따라 캘러스가 형성되기 시작하였다(Fig. 1A, D). 배양 6주가 되었을 때 명조건으로 옮겨 배양하였으며, bud가 형성되는 것을 확인하였다(Fig. 1B, E).

식물생장조절제로부터의 신초 기관형성 유도

BA 0.5, 1.0, 2.0 mg/L와 NAA 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L를 포함한 MS 기본배지에 잎 절편체를 치상하여 암배양 6주 후부터 모든 절편체에서는 절단면을 따라 엷은 노란색 캘러스가 형성되었다. 이후 명배양 조건에서 6주간 배양하였을 때, 캘러스는 연한 초록색을 나타내었으며 bud가 형성되었다(Fig. 2). 배양 12주 후 절편체로부터 반응을 조사한 결과, 모든 배지에서 생존율과 캘러스 형성율은 100%로 나타났다(Table 1). Bud 형성율 및 절편체당 bud 수에 있어서는 처리간에 차이가 나타났다. BA 2.0 mg/L, NAA 0.2 mg/L를 첨가한 배지에서

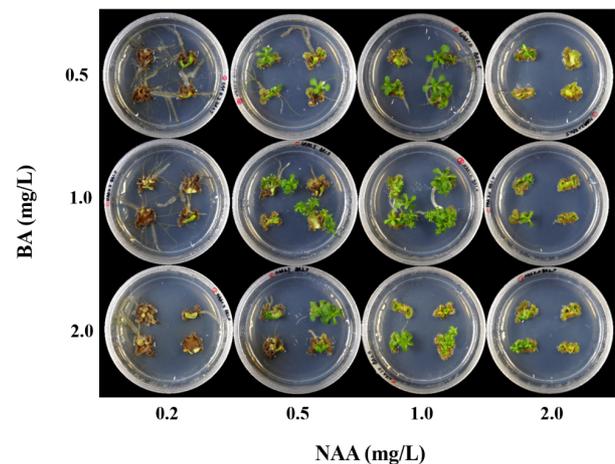


Fig 2 Effect of the BA and NAA growth regulators on the in vitro shoot regeneration of chrysanthemum ‘Ohblang’ at 12 weeks of culture

는 bud와 신초가 전혀 형성되지 않았지만, 이를 제외한 모든 처리에서 bud와 신초가 형성되었다(Fig. 2). Bud 형성율은 BA 0.5 mg/L, NAA 1.0 mg/L 처리, BA 1.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L 처리, BA 2.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L 처리에서 모두 90% 이상으로 BA 농도와 상관없이 NAA 1.0 mg/L를 첨가한 배지에서 bud 형성율이 높게 나타났다(Table 1). 절편체당 bud 수에서도 NAA 1.0 mg/L를 포함한 배지에서 모두 1.2개 이상으로 가장 좋은 결과를 얻었다. 반면 NAA 0.2 mg/L를 첨가한 모든 배지에서는 bud 형성율이 35% 이하로 낮은 수치를 보였다. 모든 처리구 중, BA 1.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L 처리에서 bud 형성율 90%, 절편체당 bud 수가 1.8개로 가장 높게 나타났으며, p < 0.05 수준에서 유의성 있는 차이를 보여주었다. 신초 형성율과 절편체당 신초 수는 bud에 비해 전반적으로 감소하는

Table 1 Effects of plant growth regulators on shoot regeneration from leaf explants in chrysanthemum ‘Ohblang’ after 12 weeks of culture^z

PGR		Survival rate (%)	Callus formation (%)	Bud formation (%)	No. of buds/explants	Shoot formation (%)	No. of shoots/explants
BA (mg/L)	NAA (mg/L)						
0.5	0.2	100.0 ± 0.0 ^y	100.0 ± 0.0	15.0 ± 6.1de ^x	0.2 ± 0.1de	15.0 ± 6.1ef	0.2 ± 0.1de
0.5	0.5	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	55.0 ± 18.4bc	0.7 ± 0.2cd	55.0 ± 18.4abc	1.0 ± 0.3d
0.5	1.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	90.0 ± 6.1a	1.2 ± 0.2b	85.0 ± 6.1a	1.8 ± 0.2b
0.5	2.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	20.0 ± 9.4de	0.3 ± 0.2de	20.0 ± 9.4ef	0.2 ± 0.1de
1.0	0.2	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	35.0 ± 12.7cd	0.4 ± 0.1de	35.0 ± 12.7cde	0.6 ± 0.2cde
1.0	0.5	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	40.0 ± 6.1cd	0.5 ± 0.1d	35.0 ± 6.1cde	0.7 ± 0.cde
1.0	1.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	90.0 ± 6.1a	1.8 ± 0.2a	75.0 ± 7.9ab	3.2 ± 0.4a
1.0	2.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	55.0 ± 12.2bc	0.6 ± 0.1d	45.0 ± 12.2bcde	0.6 ± 0.2cde
2.0	0.2	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
2.0	0.5	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	25.0 ± 7.9de	0.3 ± 0.1de	25.0 ± 7.9def	0.5 ± 0.2cde
2.0	1.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	95.0 ± 5.0a	1.8 ± 0.2a	60.0 ± 10.0abc	1.0 ± 0.1c
2.0	2.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	80.0 ± 9.4ab	1.1 ± 0.1bc	45.0 ± 14.6bcde	0.9 ± 0.3cd

^zExplants were cultured in the dark for 6 weeks and then cultured under light for 6 weeks.

^yMean ± SE.

^xMeans within columns followed by different letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

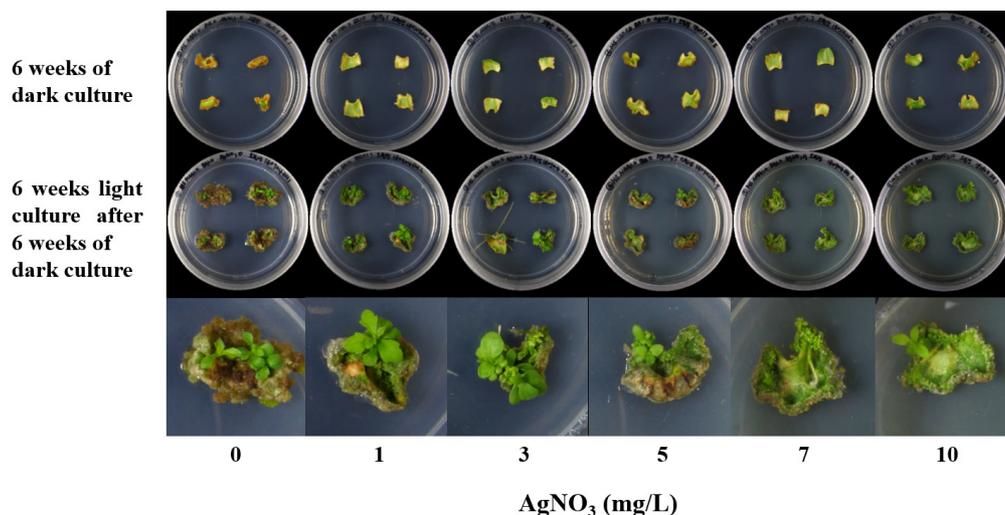


Fig 3 Comparisons of AgNO_3 concentrations on adventitious shoot formation from leaf explants in chrysanthemum ‘Ohblang’. The explants were cultured on shoot induction medium, composed of MS salts and vitamins with 1.0 mg/L BA and 1.0 mg/L NAA, for 6 weeks and then transferred to the same medium and cultured for 6 weeks

경향을 보였다. NAA 0.2 mg/L를 첨가한 모든 처리에서는 35% 이하, 절편체당 신초 수에서도 모두 0-0.6개로 낮게 나타났다. BA 0.5 mg/L, NAA 1.0 mg/L와 BA 1.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L를 포함한 배지에서 각각 85.0%와 75.0%로 가장 높게 나타났지만, 절편체당 신초 수에서는 BA 1.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L에서 1.8개, BA 1.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L에서 3.2개로 차이를 보여주었다(Table 1). 식물생장조절제의 종류 및 농도에 따른 신초 형성율, 절편체당 신초 수에서 유의한 상호작용이 있는 것으로 나타났다.

AgNO_3 를 첨가한 배지에서의 신초 기관형성 유도 및 갈변억제

초기 6주 동안의 암배양 후, AgNO_3 농도와 관계없이 모든 절편체에서는 캘러스가 형성되었으며 잎 절편체가 모두 비대해지며 차등성장하는 모습을 보였다(Fig. 3). 또한 AgNO_3 0 mg/L 처리를 제외한 모든 배지에서는 갈변이 거의 일어나지 않았다.

이후 6주 동안 명조건에서 배양하였을 때 절단면을 따라 잎 절편체와 형성된 캘러스가 커지며, 모든 배지에서 bud와

Table 2 Effects of AgNO₃ on shoot regeneration from leaf explants after 12 weeks of culture in chrysanthemum ‘Ohblang’^z

AgNO ₃ (mg/L)	Survival rate (%)	Callus formation (%)	Bud formation (%)	No. of buds/explants	Shoot formation (%)	No. of shoots/explants
0.0	100.0 ± 0.0 ^y	100.0 ± 0.0	80.0 ± 5.0a ^x	2.7 ± 0.4a	60.0 ± 12.7ab	1.2 ± 0.4ab
1.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	85.0 ± 6.1a	3.4 ± 0.7a	80.0 ± 9.4a	2.6 ± 0.6a
3.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	80.0 ± 9.4a	4.1 ± 1.2a	55.0 ± 16.6ab	1.5 ± 0.4ab
5.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	65.0 ± 10.0a	3.1 ± 1.0a	30.0 ± 9.4b	0.9 ± 0.4b
7.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	65.0 ± 18.7a	2.1 ± 0.8a	40.0 ± 15.0ab	1.2 ± 0.5ab
10.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	70.0 ± 14.6a	4.7 ± 1.1a	50.0 ± 15.8ab	1.7 ± 0.6ab

^zExplants were cultured in the dark for 6 weeks and then cultured under light for 6 weeks.

^yMean ± SE.

^xMeans within columns followed by different letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at p < 0.05.

신초가 형성된 모습을 확인 할 수 있었다(Fig. 3). 광조건으로 옮긴 후 절편체의 갈변이 진행되었고, 갈변의 정도는 AgNO₃ 0 mg/L 처리에서 가장 심하게 나타났다. AgNO₃ 1, 3, 5 mg/L 처리에서도 갈변이 나타났지만, AgNO₃ 7, 10 mg/L 처리에서는 갈변이 거의 진행되지 않았다.

배양 12주 후 bud 형성율은 AgNO₃ 0, 1, 3 mg/L 처리에서 80% 이상으로 가장 높게 나타났다(Table 2). 이때 절편체당 bud 수는 각각 2.7개, 3.4개, 4.1개로 동일한 bud 형성율에서는 AgNO₃의 농도가 증가하면 절편체당 bud 수도 함께 증가하는 모습이 나타났지만 AgNO₃ 7 mg/L 처리구에서 절편체당 bud 수는 2.1개로 가장 낮게 나타났다. Bud 형성율과 절편체당 bud 수는 AgNO₃의 농도에 따라 차이가 있어 보였지만, 통계적 유의성은 없었다. 신초 형성율은 bud 형성율에 비해 많이 낮았는데, 처리간의 차이가 있었다. AgNO₃ 0, 1 mg/L를 첨가한 배지에서는 신초 형성율이 각각 60%, 80%로 높게 나타났다. 반면 AgNO₃ 5, 7 mg/L를 포함한 배지에서는 bud 형성율이 현저히 낮았으며, 특히 AgNO₃ 5 mg/L 처리구에서 30%로 가장 낮았다. 절편체당 신초수는 AgNO₃ 1 mg/L를 포함한 배지에서 절편체당 신초 수 2.6개로 가장 높게 나타났으며 통계적으로 유의하였다.

절편체의 갈변 정도와 상관없이 모든 처리에서 신초가 형성되었지만 AgNO₃ 1 mg/L을 첨가한 처리에서 유도된 신초가 가장 크게 발달하였으며, 이는 AgNO₃ 농도가 높을수록 bud에서 신초로의 발달이 느리다는 것을 나타낸다(Fig. 3).

잎 절편체의 갈변지수

초기 6주간 잎 절편체를 암조건에서 배양하였을 때, AgNO₃ 농도와 관계없이 모든 절편체에서 절단면을 따라서 캘러스가 형성되었다. 이때 AgNO₃ 0 mg/L 배지에서 갈변이 가장 많이 진행되었으며, AgNO₃ 0 mg/L를 제외한 모든 배지에서는 갈변이 일어나지 않았다(Fig. 3). 이후 6주간 명배양 후 12주 차에서는 잎 절편체로부터 형성된 캘러스가 커지며, 갈변 정도에서도 많은 차이를 나타냈다. AgNO₃ 0 mg/L를 첨가한 무처리구에서 갈변지수 2.5로 가장 많이 진행되었고, AgNO₃

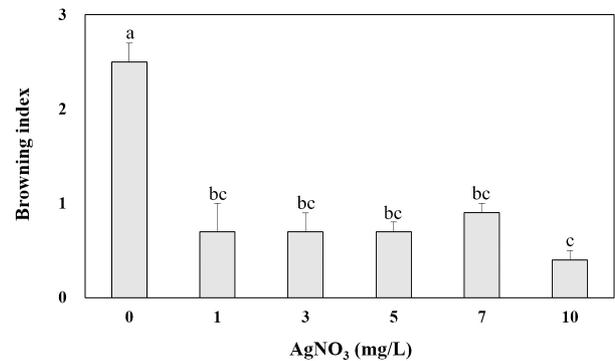


Fig 4 Effects of AgNO₃ on browning of leaf explants in chrysanthemum 'Ohblang'. The browning index was calculated as follows: 0 = none of the explants are brown, 1 = 1/4 of the explants are brown, 2 = 2/4, 3 = 3/4, 4 = 4/4). Different letters indicate a significant difference according to Duncan's multiple range test at p < 0.05

1, 3, 5, 7 mg/L 처리에서는 0.7-0.8로 비슷한 단계가 나타났으며, AgNO₃ 10 mg/L에서는 갈변이 0.4로 거의 진행되지 않았다(Fig. 4). AgNO₃ 농도가 증가함에 따라 잎 절편체의 갈변이 억제되는 경향을 보였다.

신초 증식 및 발근

국화 ‘오블랑’의 기내배양 잎 절편체로부터 bud 및 신초를 유도한 후 계대배양 없이 12주간 배양하였을 때 신초가 신장하였다(Fig. 1C, F). 2 cm 이상 신장된 신초를 절편체로부터 분리하여 신초 신장 및 발근배지에서 치상하였고, 배양 1주 후부터 뿌리가 발달하기 시작하였다. 3주 후에는 신초 신장과 발근이 이루어진 소식물체를 획득할 수 있었다(Fig. 1G).

고찰

국화의 식물체 재생 과정을 보면, 일반적으로 잎 절편체로부터 유도시킨 신초를 분리하여 신장과 발근을 유도 한 후 활착 과정을 거쳐 정상적인 재배가 이루어진다. 국화의 신

초 기관형성은 절편체의 상태, 배지첨가물의 농도와 종류, 조성 등 여러 가지 요인에 의해 많은 영향을 받는다는 여러 연구가 보고된 바 있다(Bhattacharya et al. 1990; Teixeira da Silva 2004; Waseem et al. 2009). 국화의 신초 재생과 발달은 식물생장조절제인 cytokinin과 auxin의 처리와 식물체의 유전형이 큰 영향을 미치며(Lee et al. 1999; Lee et al. 2008; Skoog and Miller 1957), 이는 생장조절제 조절을 이용한다면 더욱 효율적인 식물체 생장이 가능하다는 것을 보여준다. 따라서 국화의 기관형성을 통한 식물체 재분화를 위해서는 품종에 따른 생장조절제의 선별 및 농도 선택에 관한 연구가 필수라고 할 수 있다.

Lee 등(1999)은 국화 ‘남전’의 엽절편 배양에 의한 식물체 재생을 알아보는 실험에서 BA 0.5 mg/L와 NAA 2.0 mg/L를 조합하였을 때, 신초 형성율 83%, 절편체당 신초수 3.8개의 결과를 얻었다고 보고하였다. 또한 Suh 등(2015)은 국화 40개 품종에서 여러 부위의 절편체를 이용하여 신초 재생을 유도하였는데, 잎을 이용한 재분화 시험결과 ‘보라미’, ‘비비드스칼렛’, ‘화이트링’ 품종이 가장 재분화율이 높았으나, 10개 품종에서는 재분화 배지에 전혀 반응하지 않았다고 보고하였다. 이와 같이 국화의 신초 재생에 있어 식물생장조절제의 적정 농도와 반응은 품종에 따라 상당한 차이가 있다.

본 실험에서는 국내에서 육성된 스프레이 국화 품종 ‘오블랑’을 재료로 잎 절편체로부터 신초 재생에 적합한 식물생장조절제의 농도를 알아보았다. 모든 배지에서 캘러스가 형성되었고, BA 2.0 mg/L와 NAA 0.2 mg/L를 포함한 배지를 제외한 모든 처리에서 다수의 bud가 유도되었다. Bud 형성율은 식물생장조절제 조성에 따라서 차이를 보여주었는데, BA (0.5, 1.0, 2.0 mg/L)와 상관없이 NAA 1.0 mg/L가 첨가된 배지에서는 모두 90-95%로 가장 높았다. 반면 저농도의 NAA 0.2 mg/L를 포함한 처리구에서는 bud 재생이 상대적으로 억제되었다. 신초 형성율은 BA 0.5 mg/L, NAA 1.0 mg/L와 BA 1.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L를 조합한 배지에서 각각 85%, 75%로 가장 높았다. 절편체당 신초 수에서는 BA 0.5 mg/L, NAA 1.0 mg/L에서 1.8개, BA 1.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L에서 3.2개로 가장 높게 나타났다. 이를 제외한 나머지 처리구에서는 절편체당 신초 수에서 큰 차이가 나타나지 않았다.

갈변 현상은 조직배양에서 자주 발생하는 문제 중 하나이다. 조직의 갈변 현상은 절편체로부터의 재생 과정 중 캘러스에서 자주 나타나는 현상이며, 폴리페놀 산화효소의 축적, 탄닌의 산화 등이 주된 원인으로 알려져 있다. 이들 산화된 폴리페놀 등은 식물세포의 괴사를 유도할 수 있어 식물 조직에 치명적이다. 이는 조직 분화 및 생장을 억제하여 재생 능력을 감소시켜, 식물 조직배양의 실패로 이루어질 수 있다(Ahmad et al. 2013).

국화 ‘오블랑’의 재생에 있어 절편체에서 발생하는 갈변으로 인해 식물체의 재생 효율이 높지 않은 문제점을 해결하기 위해 AgNO₃를 사용하였으며, AgNO₃ 농도가 증가할수록

갈변이 억제되는 효과를 보았다. Bud 형성율에 있어서는 AgNO₃ 0, 1, 3 mg/L을 처리한 배지에서 모두 80% 이상이었지만, 신초 형성율은 55-60%, 절편체당 신초 수는 1.2-2.6개로 나타났다. 이는 잎 절편체로부터 bud가 많이 분화한 반면, 신초로의 발달이 잘 이루어지지 않는다는 것을 나타낸다. Purnhauser 등(1987)은 AgNO₃가 갈변억제뿐만 아니라 식물체 재생 촉진 효과가 있음을 보고하였고, 이와 유사한 효과는 머스크멜론(Yadav et al. 1996), 배추(Takasaki et al. 2004)와 패션프루트(Faria et al. 2017)에서도 확인된 바 있다. 또한 Kim과 Hyung (2014)은 국화 ‘백마’의 신초 기관형성을 위하여 2단계 배지를 사용하였는데, bud 유도 단계에서 AgNO₃를 첨가하지 않는 배지를 사용하고 신초 형성 단계에서 AgNO₃를 첨가하는 것이 효과적이라고 보고하였다. 국화 ‘오블랑’의 신초 기관형성을 위하여 bud 유도배지와 신초 발달배지로 나누어 배양하며, 이 때 단계별 AgNO₃의 첨가 여부를 검토할 필요가 있다고 생각된다. 한편, 피스타치오 기내 배양 갈변 제거 실험에서는 AgNO₃ 처리에 있어 고농도가 될수록 갈변이 방지됨과 함께 신초 생장이 억제되었다고 하였으며 (Mederos-Molina and Trujill 1999), Roh 등(2013)은 나리 기내 식물체 생장촉진 및 갈변화 감소 연구에서 큰 영향이 없었다고 보고하였다. 이로 보아 AgNO₃ 처리에 따른 신초 형성은 식물의 종에 따라서 다양한 반응이 나타나며, 단계를 구분하여 단계별 배지를 적절히 사용하는 것이 필요하다는 것을 알 수 있다.

본 연구를 통하여 국화 ‘오블랑’의 잎 절편체로부터 신초 기관형성을 위해 식물생장조절제 BA 1.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L의 조합을 기반으로, AgNO₃ 1 mg/L를 첨가해주면 갈변을 억제하여 효과적인 신초 형성 및 식물체 재생을 유도할 수 있을 것이라고 생각된다. 이러한 결과를 바탕으로 스프레이 국화 ‘오블랑’의 효율적인 신초 기관형성에 적절한 농도를 선별함으로써, 식물체 재생 기술을 확보하여 유용한 유전자를 도입하는 형질전환 기술의 효율성 증대와 형질전환 식물체를 이용한 생명공학 기술에 유용하게 사용될 것이라고 기대한다.

적 요

국화 ‘오블랑’의 기내 배양 잎 절편체로부터 신초 기관형성을 통한 식물체 재생 시스템을 확립하는데 있어 효율적인 신초 재생 및 갈변억제를 위한 식물생장조절제와 AgNO₃의 농도를 선정하고자 실험을 수행하였다. 잎 절편체를 식물생장조절제인 BA 0.5, 1.0, 2.0 mg/L와 NAA 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L를 조합 처리한 12가지 조성의 배지에 치상하여 암조건에서 6주간, 명조건에서 6주간 배양하였을 때, BA 1.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L를 첨가한 배지를 사용하는 것이 가장 효과적이었다. 이 결과를 기반으로 잎 절편체로부터 갈변 감소를 위해

MS 염류와 비타민, BA 1.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L, sucrose 30 g/L, agar 6 g/L를 포함한 신초유도배지에 AgNO₃ 0, 1, 3, 5, 7, 10 mg/L를 각각 첨가하여 실험을 실시하였다. AgNO₃ 처리는 잎 절편체로부터의 갈변을 감소시키는 효과를 보였으나, 처리 농도가 증가됨에 따라 신초로의 발달은 원활하게 이루어지지 않았다. 결과적으로 AgNO₃ 1 mg/L를 포함한 신초유도배지(MS 염류와 비타민, BA 1.0 mg/L, NAA 1.0 mg/L)에 잎 절편체를 치상하였을 때, 갈변지수 0.7, 절편체당 신초 수가 2.6개로 ‘오블랑’ 재생에 있어 가장 적합한 농도임을 확인하였다.

사 사

본 연구는 고인이 되신 형남인 교수님의 지도로 이루어진 것이며 이에 깊은 감사와 존경을 표합니다.

References

- Ahmad I, Hussain T, Ashraf I, Nafees M, Maryam RM, Iqbal M (2013) Lethal effects of secondary metabolites on plant tissue culture. *Am Eurasian J Agric Environ Sci* 13:539-547
- Bhattacharya P, Dey S, Das N, Bhattacharyas BC, Bhattacharya P (1990) Rapid mass propagation of *Chrysanthemum morifolium* by callus derived stem and leaf explant. *Plant Cell Rep* 9:439-442
- Chraïbi BK, Latch A, Roustan JP, Fallot J (1991) Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitor, silver and cobalt. *Plant Cell Rep* 10:204-207
- Faria GA, Felizardo LM, Ferreira AFA, Rocha PS, Suzuki AN, Souza AS, Junghans TG, Costa MAPC, Peixoto APB, Morais AR, Lopes BG, Oliveira TA (2017) Concentrations of silver nitrate in the in vitro development and conservation of *Passiflora gibertii* N. E. Brown. *American J Plant Sci* 8:2944-2955
- Jung YK, Kim SK, Kim HD, Lee YS (2013) Breeding of a new spary chrysanthemum cultivar, ‘Dream Round’ with dark pink petals and thick stem of anemone type for cut-flower. *Korean J Hortic Sci Technol* 31:517-521
- Kaul V, Miller RM, Hutchinson JF, Richards D (1990) Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 21:21-30
- Kim JH, Hyung NI (2014) The optimal medium composition and culture method for plant regeneration via adventitious shoot formation from leaf segment explants of *Chrysanthemum morifolium* ‘Baekma’. *Korean J Breed Sci* 46:218-225
- Lee JS, Lee GJ, Chung SJ, Kim JB, Kim DS, Kang SY (2008) Effect of plant growth regulators on a shoot and root formation from the leaf and flower culture of a standard-type chrysanthemum ‘Jinba’. *Korean J Hortic Sci Technol* 26: 320-324
- Lee YK, Kwon YJ, Lee KM, Hyung NI (1999) Regeneration from leaf segment cultures of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Korean J Plant Tissue Cult* 26:59-63
- Lim JH, Shin HK, Park SK, Choi SY, Lee JS (2013) A spray chrysanthemum, ‘Green Candy’ with double flower type and green petals for cut flowers. *Korean J Hortic Sci Technol* 31:338-392
- May RA, Trigiano RN (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. *J Amer Soc Hort Sci* 116:366-371
- Mederos-Molina S, Trujillo MI (1999) Elimination of browning exudate and in vitro development of shoot in *Pistacia vera* L. cv. *Mateur* and *Pistacia atlantica* Desf. culture. *Acts Soc Bot Pol* 68:21-24
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Pandya HA, Saxena OP (2001) Preservation of *Chrysanthemum* sp. by drying. *Acta Hort* 543:367-370
- Panicker B, Thomas P, Janakiram T, Venugopalan R, Narayanappa SB (2007) Influence of cytokinin levels on in vitro propagation of shy suckering chrysanthemum ‘Arka Swama’ and activation of endophytic bacteria. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 43:614-622
- Purnhauser L, Medgyesy P, Czako M, Dix PJ, Marton L (1987) Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃. *Plant Cell Rep* 6:1-4
- Qin YH, Zhang SL, Zhang LX, Zhu DY, Syed A (2005) Response of in vitro strawberry to silver nitrate (AgNO₃). *HortScience* 40:747-751
- Roh HS, Lee SI, Kang YI, Kim MS, Kim JB (2013) Effects of ascorbic acid, citric acid and silver nitrate on the growth of in vitro lily plantlets and reduction of browning. *J Plant Biotechnol* 40:224-230
- Shin HK (2012) Development of domestic flower varieties for reduction of royalty payment on foreign varieties and replacement of their import. *Korean J Hortic Sci Technol* 30:42-43
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* 54:118-130
- Suh EJ, Han BH, Lee YH, Lee SK, Hong JK (2015) The selection of domestically bred cultivars for spray-type chrysanthemum transformation. *Korean J Hortic Sci Technol* 33:947-954
- Takasaki T, Hatakeyama K, Hinata K (2004) Effect of silver nitrate on shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of turnip (*Brassica rapa* L. var. *rapifera*). *Plant Biotechnol* 21:225-228
- Teixeira da Silva JA (2004) Ornamental chrysanthemums: improvement by biotechnology. *Plant Cell Tiss Org Cult* 79:1-18
- Waseem K, Khan MO, Jaskani J, Jilani MS, Khan MS (2009) Effect of different auxins on the regeneration capability of chrysanthemum leaf discs. *Int J Agric Biol* 11:468-472
- Yadav RC, Saleh Mohamed T, Grumet R (1996) High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon. *Plant Cell Tiss Org Cult* 45:207-214