연구논문

韓資植誌 24(2) : 121~129(2011)
Korean J. Plant Res.

효율적 조직배양체계 확립을 위한 카네이션 품종 선발 및 배양조건 설정

강찬호*, 한범수[1], 한수곤, 권성환, 송영주

전라북도농업기술원, [1]농촌진흥청 국립농업과학원 기능성물질개발과

Selection of Suitable Varieties of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) and Optimization of Culture Conditions for Efficient Tissue Culture

Chan Ho Kang*, Bum So Han[1], So Gon Han, Sung Hwan Kown and Young Ju Song

Jellabukdo Agricultural Research and Extension Service, Iksan 570-703, Korea
[1]National Academy of Agricultural Science, Rural Developement Administration, Suwon 441-707, Korea

Abstract - As the molecular breeding was progressed, many plant transformation techniques were attained for improving transformation accuracy and used to produce useful transgenic plants. Day by day, new varieties were developed so new transformation techniques required for these newly developed varieties. Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) is a popular and economically important ornamental plant, all over the world. Keeping this in view, we selected 18 varieties of *D. caryophyllus* L. commonly available in the market and did optimization of culture conditions for more efficient tissue culture and to get higher number of plants via micro-propagation. Four varieties namely Yellowdotcom, Jakarta, Belmonte, Polartessino etc. were selected for organ culture studies from single cell line. The optimum growth was recorded in the MS media supplied with sucrose 3%, NAA 1.0 mg/L and TDZ 1.0 mg/L. except Belmonte, in which, BA 1.0 mg/L was found to be the best combination, in place of TDZ, rest ingredients were same. The most efficient coagulating agent used to obtain higher number of plant from callus was phytagel 0.3%. The most effective explant for higher shoot formation was stem in which 80.2% shoot formation was recorded. It also reduced culture periods by 6 days.

Key words - Callus culture, Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.), Micro-propagation, Plant growth regulators, Transgenic crops

서 언

고전 육종이 그동안 내생적 한계를 넘어서 많은 수의 품종을 통하여 그 효용성을 증명하여 왔으나 유전자원의 제한, 원연 교잡 시 교배 양친의 불화합성 또는 배수성 차이에 의한 제한, 유용 형질 특성이 복수의 유전자들에 의해서 조절되는 것 등 교배육종의 한계가 엄연히 존재함에 따라 이를 극복할 수 있는 새로운 기술의 출현이 요구되게 되었다. 최근 생명공학 기술을 이용한 획기적인 선호품종 개발을 위한 효율적이고 다양한 시도가 이루어지고 있는데 특히 분자육종은 기존의 유익한 형질특성들을 유지하면서도 단일 유전자의 도입을 통하여 원하는 특성을 특정해서 단시간 내에 빠르게 개량 할 수 있는 장점으로 인해 최근 다양한 유전자를 이용한 여러 가지 시도들이 이루어지고 있는 분야이다. 과거 10여년 동안 원예 분야의 형질전환은 *Agrobacteria*에 의한 형질전환 기술의 개발에 집중되어 왔으나, 최근에는 형태적 생리적 변화, 조기개화, 무측지성, 내병성, 내충성 등 도입된 유전자의 형질발현에 초점을 맞추어 실질적인 형질개량을 목적으로 하는 시도들이 이루어지고 있다(Han *et al.*, 2007; Kubo *et al.*, 2006; Mitiouchkina and Dolgov, 2000; Takatsu *et al.*, 1999). 이렇게 분자육종 기술이 필수기술로 인식되고 있으나 늘어나는 품종과 시장의 반응성에 기초한 중점 육성 품종을 선별하는데 상당한 어려움을 겪고 있는 것 또한 사실이다. 카네이션(*Dianthus caryophyllus* L.)은 국내 4대 절화작목 중의 하나로 연간 농가 생산액이 210억에 이르는 주요 절화작물이며 국외에서도 중요한 경제 작물로(Zuker *et al.*, 1999) 취급되고 있으나 국내에서는 생산비 문제로 묘주를

*교신저자(E-mail) : kangho68@korea.kr

거의 전량 수입하여 사용하고 있으며 시장을 선도하는 주요 우점 품종이 없어 사용되는 품종의 시장 선호도 변화가 해마다 심하게 일어나는 작물 중 하나이다. 따라서 분자육종의 대상이 되는 대상 품종을 선정하는데도 상당한 어려움이 있는데 다양한 품종 특성상 모든 품종에 공통으로 적용할 수 있는 형질전환 조건을 선정하는 것에도 어려움이 존재한다. 따라서 본 연구에서는 기호도가 강한 색상과 형태를 지니고 있으면서 국내 시장에서 주로 소비되고 있는 카네이션 품종 18종을 선정하여 조직배양 적응성과 신초 분화 효율을 향상시킬 수 있는 배양조건 등을 설정하였다. 원래 형질전환은 모든 체세포가 새로운 유전자가 도입된 상태로 변화하기 위해서 단세포에 유전자를 주입한 후 이 세포가 증식을 거쳐 개체로 진화하는 과정을 거치기 때문에, 형질전환 기술의 효용성을 높이기 위해서는 효율적인 조직배양기술이 선제적으로 확립되어야만 한다. 그러나 새로이 개발된 품종들의 유전적 다양성에 의해 조직배양 반응이 서로 다르게 나타날 수 있어 유전형별 특성에 따른 형질전환 효율성을 극대화시키기 위해서는 조직배양 및 형질전환 효율성이 강한 품종을 선발하여야 한다. 또한 같은 비용 및 노력을 투하한다면 조직배양의 효율성 특히 신초 분화율을 높이는 것이 가장 효과적인 방법이 될 수 있는데 신초 분화율을 2배로 올릴 수 있다면 같은 시기에 같은 노력을 기울인 형질전환 과정에서 2배로 형질전환체를 만들어 낼 수 있고 이로 인해 우수한 형질전환 계통 선발의 기회가 늘어날 수 있게 된다. 따라서 본 연구는 카네이션의 형질전환 효율 향상을 위한 조건을 구명하기 위하여 적정 품종을 선정하고 재분화율을 향상시키는 주요한 방법들인 식물체에 적당한 기본배지를 선정하거나 탄소공급원의 변화나 배지응고제의 선택 등 배지 및 배양조건을 개선할 수 있는 방법들의 효용성에 대하여 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

카네이션(*Dianthus caryophyllus* L.) 적정 품종 선발

조직배양의 효율성 강화를 목적으로 배양기간 및 배양의 난이도와 높은 신초 분화특성을 가진 카네이션 품종을 선발하기 위하여 시장에서 주요하게 거래되고 있는 카네이션 품종 18종을 네덜란드 육종회사에 의뢰하여 품종별로 수입한 후 기내 화하여 증식하고 시험재료로 사용하였다. 증식은 생정조절제가 첨가되지 않은 MS 배지 내에서 실시하였으며 발근 후 본 엽이 6매 정도 전개된 재료를 배양병으로부터 적출하여 부위별 배양재료로 사용하였다(Table 1).

배양 및 배지조건 설정

형질전환을 위하여 선발된 각 품종의 유전적 특성에 따른 배양 및 배지조건을 설정하기 위하여 배양부위 및 기본배지, 탄소원 및 농도, 배지응고제원 및 농도를 정하는 연구를 수행하였다. 조직배양을 위하여 생장조절제를 단용 또는 혼용으로 처리 하였는데 auxin 계열로 NAA, 2,4-D, IAA가 사용되었고 cytokinin 계열로 BA, kinetin, 2iP, TDZ 등이 0.1~5.0 mg/L 농도로 첨가되었다. 적절한 배양부위를 정하기 위하여 배양재료를 크게 잎, 줄기, 엽병으로 구분하여 배양하고 신초 분화율 및 분화기간을 관찰함으로서 배양의 효율성을 비교하였으며 MS, B5, White, SH, LS(Murashige and Skoog, 1962; Bhojwani *et al.*, 1989; Linsmaier and Skoog, 1965) 등 5종을 공시하여 기본배지를 설정하고 탄소원으로는 sucrose와 fructose 그리고 lactose를 1.5%, 3%, 6%로 공시하여 캘러스형성율과 기관분화 정도를 조사하였다. 배지응고제 선발을 위하여 agar와 phytagel을 일정량씩 배지에 투입하였는데 agar는 0.8%, 1.0%, 1.2% 농도로 투입하였고 phytagel은 0.2%, 0.3%, 0.4%를 첨가하였다.

결과 및 고찰

카네이션(*Dianthus caryophyllus* L.) 적정 품종 선발

옥수수(Hodges *et al.*, 1986)와 두릅나무(Moon *et al.*, 2001)에서 보듯이 조직배양에서 사용되는 재료의 유전적 특성에 따라서 조직배양의 효율성이 결정되는 사례는 많이 있다. 따라서 대부분의 배양실험에서 1차적으로 수행하는 내용이 여러 품종들 중에서 가장 왕성하게 분열하는 유전자 군을 선발하는 것도 이러한 이유에서 기인한다.

이러한 필요성을 감안하여 국내 시장에서 주로 거래되고 있는 카네이션 품종 18종을 수집하여(Table 1) 기내 화 과정을 거친 후 이를 재료로 하여 조직배양을 수행하고 생장조절제 처리에 따른 조직배양의 반응성을 조사하였다. 각 수집된 품종들을 생장조절제를 단용 처리하여 각 품종별 반응성을 조사한 결과 2,4-D와 NAA와 같은 auxin에 대한 반응성이 BA, Kinetin, TDZ, 2iP와 같은 cytokinin에 비하여 높게 나타났으며 품종별로도 Gucci, Blognya,

Table 1. Varieties of carnation(*Dianthus caryophyllus* L.) used for optimization of growth conditions for tissue culture

No.	Variety	Type	No.	Variety	Type
1	Fugato	Standard	10	Blognya	Sprey
2	Belmonte	〃	11	Chealsy	〃
3	Gucci	〃	12	Derby	〃
4	Jakarta	〃	13	Detroit	〃
5	Memphis	〃	14	Dark L tessino	〃
6	Cherry tessino	Sprey	15	Morony	〃
7	Pink tessino	〃	16	Picapica	〃
8	Trendy tessino	〃	17	Yellow dotcom	〃
9	Barny	〃	18	Polar tessino	〃

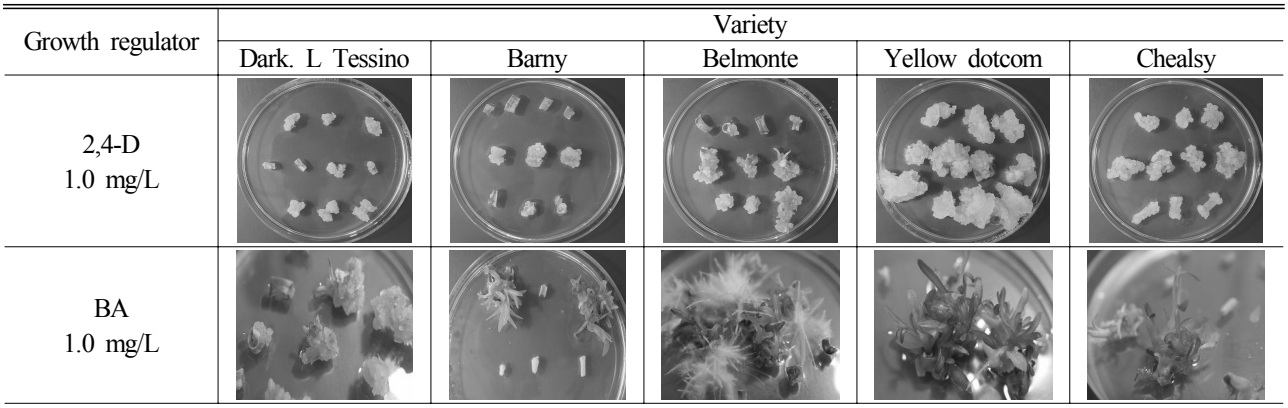


Fig. 1. Growth of different *D. caryophyllus* L. varieties treated with 2, 4-D and BA after 8 weeks of inoculation.

Derby, Detroit, Morony와 같이 캘러스 형성이 평균 40% 이하로 아주 낮게 형성되는 품종들과 Belmonte, Polar tessino, Fugato, Barny, Pink tessino, Jakarta, Dark L. tessino, Trendy tessino, Memphis, Yellow dotcom, Chealsy 등과 같이 75%를 넘어서는 품종들이 구분되었다. 이 중 Trendy tessino, Polar tessino, Jakarta, Yellow dotcom, Belmonte 같은 품종은 2,4-D를 0.5~3.0 mg/L 농도로 처리 할 경우 캘러스 형성이 97%를 상회하여 상대적으로 높은 분열능력을 가진 품종임이 확인되었다(Data was not shown). 그러나 2,4-D와 NAA와 같은 auxin 처리는 캘러스 생성은 활발히 이루어지나 신초 생성이 거의 이루어지지 않는 non-embryogenic callus의 분포특성이 강하게 나타나 신초를 얻는데 어려움이 있는 반면 auxin에 비하여 식물체 분화가 비교적 활발한 BA 처리는 전체적인 분열비율이 20.1% 정도로 낮게 형성되어서(Fig. 1) 이들 단점을 극복하기 위한 생장조절제 혼용처리의 필요성이 제기되었다.

생장조절제 단용 처리를 통하여 선발된 상대적 분열능력이 우수한 카네이션 품종 10종을 대상으로 auxin과 cytokinin 혼용처리 결과를 나타낸 것이 Table 2이다. 품종별 혼용처리에 따른 캘러스 발생을 분석해 보면 단용 처리와는 다른 양상이 전개 되었는데 단용 처리 시 캘러스 발생률이 높게 형성되었던 2,4-D는 BA 등 cytokinin과 혼용 처리할 경우 캘러스 분열능력이 줄어들어 평균 캘러스 발생이 10.7% 감소하였으며 품종별 신초 발생률도 10품종 평균 14.4%를 나타내어(Data was not shown) 재분화 식물체 획득 수율을 높이는 데는 부적합 하였다. 반면 NAA는 혼용처리를 통하여 상대적인 분열능력이 상승하였는데 cytokinin 중 Thidiazuron(TDZ)과의 혼용처리 상승효과가 뚜렷하여 NAA 단용처리 시의 평균 캘러스 발생율 56.7%에 비해 27.2% 높아진 83.9%를 나타내어 가장 높은 증가 효과를 나타내었다. 신초 생성률도 같은 경향으로 상승하였는데 NAA와 BA 그리고 NAA와 Kinetin 혼용처리의 10개 품종 평균 신초 생성률 31.3%와 24.8%에 비해 각각 20.4%와 26.9% 높이 형성된 51.7%를 나타내어 가장 높았다. 또한 형성된 신초 수도 NAA+TDZ 처리가 leaf disc 당 평균 2.5개로

Table 2. Response of *D. caryophyllus* L. varieties for the callus formation rate under different combinations of growth regulators after 8 weeks of inoculation

Growth regulator (mg/L)		Varieties									
		Bel -monte	Polar Tessino	Barny	Pink Tessino	Jakarta	Dark L. Tessino	Trendy ressino	Mem -phis	Yellow dotcom	Chealsy
NAA 0.5	BA 0.5	46.8	78.4	48.2	28.6	46.0	18.6	32.6	12.8	100	12.6
	BA 1.0	52.6	82.6	29.6	28.2	54.2	42.8	40.8	14.6	100	18.4
	BA 3.0	68.5	68.4	30.2	16.4	38.6	36.2	21.6	20.8	100	32.6
NAA 1.0	BA 0.5	72.6	84.9	56.2	82.4	84.6	64.8	62.0	24.6	100	21.8
	BA 1.0	84.2	90.6	40.8	70.0	82.8	58.2	58.4	32.0	100	46.5
	BA 3.0	88.6	92.6	22.6	72.4	67.9	76.4	49.0	30.9	100	38.0
NAA 3.0	BA 0.5	94.6	81.2	64.0	68.2	90.6	84.6	84.2	28.2	100	72.6
	BA 1.0	92.6	84.6	72.8	74.2	91.6	82.8	78.6	48.9	100	60.4
	BA 3.0	82.4	90.6	52.6	71.6	87.9	76.0	62.8	52.4	100	80.6
NAA 0.5	Kin 0.5	72.8	24.8	36.4	70.4	48.6	22.6	52.4	30.6	100	20.6
	Kin 1.0	64.5	68.2	18.2	72.8	24.8	42.8	48.0	42.0	100	26.0
	Kin 3.0	76.2	56.8	-	71.2	30.6	38.6	42.9	46.4	100	-
NAA 1.0	Kin 0.5	46.0	86.2	48.6	64.8	48.9	64.8	72.4	78.6	100	41.2
	Kin 1.0	82.5	64.9	26.4	76.2	68.7	76.2	68.0	80.2	100	28.6
	Kin 3.0	69.4	78.6	-	76.9	82.4	78.4	80.6	64.5	100	26.0
NAA 3.0	Kin 0.5	46.8	62.8	58.2	78.2	91.2	86.5	78.0	80.2	100	24.2
	Kin 1.0	52.6	74.6	64.6	61.8	88.6	68.9	64.5	82.1	100	40.6
	Kin 3.0	48.5	82.1	62.8	71.2	90.4	72.6	72.8	75.6	100	-
NAA 0.5	TDZ 0.5	52.6	92.6	78.6	68.2	82.4	82.8	89.4	82.6	100	89.6
	TDZ 1.0	88.2	94.8	84.2	70.4	92.8	87.8	78.6	78.6	100	90.2
	TDZ 3.0	90.4	96.2	80.6	71.6	91.2	89.6	86.5	84.8	100	82.4
NAA 1.0	TDZ 0.5	56.8	92.8	74.6	71.8	92.0	86.8	84.9	87.2	100	78.6
	TDZ 1.0	82.6	100	72.8	80.8	89.8	86.8	84.0	72.8	100	96.6
	TDZ 3.0	86.2	94.8	70.2	82.6	92.8	90.4	87.6	80.4	100	86.4
NAA 3.0	TDZ 0.5	59.0	86.2	62.6	76.6	81.6	88.2	86.8	82.9	100	78.0
	TDZ 1.0	88.6	98.2	40.4	72.4	84.0	86.8	89.4	86.8	100	86.0
	TDZ 3.0	89.2	90.4	42.8	60.4	79.8	87.2	87.2	82.9	100	82.4
2,4-D 0.5	BA 0.5	56.4	84.6	60.4	28.6	62.8	48.6	46.5	74.6	100	76.4
	BA 1.0	48.2	78.2	40.8	42.9	70.6	52.8	42.8	72.8	100	82.6
	BA 3.0	60.6	81.6	32.6	64.8	64.2	36.9	54.0	76.2	100	78.2
2,4-D 1.0	BA 0.5	78.6	84.0	40.9	36.9	50.6	42.8	62.8	58.6	100	80.4
	BA 1.0	81.7	86.2	28.6	62.8	74.6	42.8	40.5	72.4	100	86.5
	BA 3.0	79.6	78.9	20.8	58.6	80.8	50.2	43.8	78.6	100	82.6
2,4-D 3.0	BA 0.5	84.2	74.2	60.4	62.4	79.2	48.6	65.4	71.0	100	71.6
	BA 1.0	92.6	68.0	58.2	64.8	48.6	62.4	72.6	54.6	100	58.4
	BA 3.0	78.4	59.8	36.2	70.6	29.5	28.6	48.8	28.8	100	36.4

2,4-D 혼용처리의 0.6개/leaf disc에 비해 1.9개 이상 많이 형성되었으며 NAA+BA의 1.6개/leaf disc에 비해서도 신초 형성이 0.9개 많았다(Table 2, Fig. 2). 종합하면 카네이션 조직배양을 위한 생장조절제는 auxin이나 cytokinin 단용처리 보다는 양 생장조절제 type을 혼용하는 것이 신초생성과 생성 기관수 증가 면에서 효과적이었으며 가장 효율적 조합처리는 NAA와 TDZ 혼용이었다.

선발된 NAA와 TDZ의 적정 처리 농도 및 품종별 분화정도를 캘러스 및 신초 분화 정도를 비교하여 선정하였는데 NAA와 TDZ를 각각 0.5, 1.0, 3.0 mg/L 농도로 교차 조

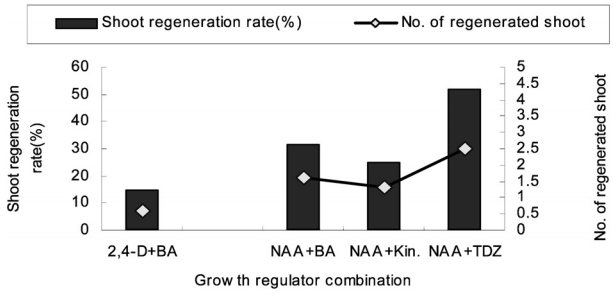


Fig. 2. Average shoot regeneration rate and no. of regenerated plantlets of ten *D. caryophyllus* L. varieties under different combinations of growth regulators after 8 weeks of inoculation.

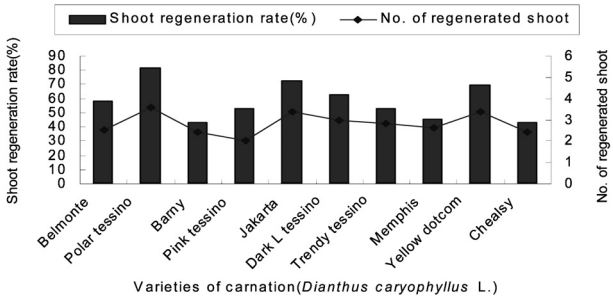


Fig. 3. The comparative shoot regeneration rate and no. of regenerated plantlets of different *D. caryophyllus* L. varieties as treated with NAA 1.0 mg/L and TDZ 1.0 mg/L after 8 weeks of inoculation.

합하여 처리 한 결과 Belmonte, Polar tessino, Jakarta, Dark L. tessino, Yellow dotcom, Chealsy 등 6품종의 캘러스 형성이 90%가 넘었으며 농도별 조합 처리 비교에서는 NAA 1.0 mg/L에 TDZ 1.0 mg/L을 혼합할 경우가 6개 품종 평균 캘러스 생성율 92.6%로 가장 높아 가장 왕성한 분열능력을 가진 것으로 확인되었다. 신초 분화 양상도 이와 비슷하였는데 NAA 1.0 mg/L+TDZ 1.0 mg/L 혼합처리의 신초 생성률이 10개 품종 평균 58.1%로 가장 높았으며 단위 leaf disc당 생성된 신초 수도 2.7개로 가장 많았다. 그러나 품종 별 신초분화 양상은 결과가 상이하였는데 6개 품종 중 Dark L. tessino와 Chealsy 품종의 신초 생성율이 60% 이하로 낮아서 다수의 개체를 획득하기 위한 조직배양 효율성 기준에서는 부적합하였으며 이를 제외한 4품종의 신초 생성률이 각각 Belmonte 68.6%, Polar tessino 83.6%, Jakarta 72.4%, Yellow dotcom 69.7%로 상대적으로 높아서 조직배양 및 형질전환을 위한 카네이션 품종으로는 가장 적절하였고 leaf disc 당 생성된 평균 신초 수도 각각 1.93, 2.64, 3.13, 3.20개로 높은 경향

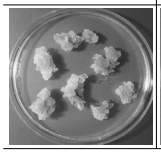
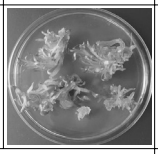
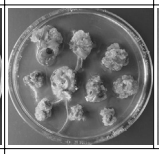
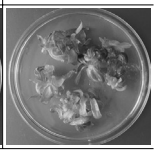
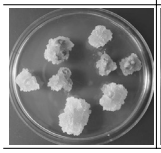
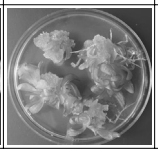
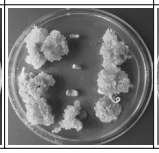
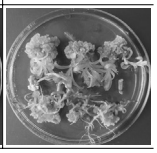
Belmonte		Jakarta	
Single	Combined combination	Single	Combined combination
			
Yellow dotcom		Polar tessino	
Single	Combined combination	Single	Combined combination
			

Fig. 4. Difference in response of *D. caryophyllus* L. explant under single and combined growth regulators treatment, after 8 weeks of inoculation.

이었다(Table 2, Fig. 3). 이러한 결과는 Liu 등(1986) 과 Choi 등(1986)이 보고한 바와 같이 배양 중 체세포배의 발생을 유도하기 위해서는 2,4-D를 고농도에서 저농도로 낮추거나 아주 제거한 배지에서 효율적이다 라는 기존의 보고와 일치한 것이다.

배지 및 배양조건 개선을 통한 재분화법 향상기법 개발

생장조절제 처리에 따라 선발된 활력이 우수한 카네이션 4품종 Belmonte, Jakarta, Polar tessino, Yellow dotcom을 대상으로 최상의 신초 분화를 보일 수 있는 배양 및 배지조건을 설정하였다.

적절 배양부위 설정

배양 조건을 설정하기 위하여 우선 적절한 배양 부위를 설정하였는데 배지는 MS 기본배지에 sucrose 3% 탄소원과 생장조절제 NAA 1.0 mg/L와 TDZ 1.0 mg/L를 혼합처리하고 배지응고제로 agar를 1.0% 첨가하였다. 배양 8주후에 캘러스 형성과 신초 생성률을 위주로 배양반응을 조사하였는데 전체적으로 잎을 배양재료로 사용할 경우 분열 반응 정도가 미약하여 캘러스 생성 정도나 신초 형성이 떨어지는 경향을 나타내었고 엽병의 경우에는 잎 배양 보다는 다소 향상된 결과를 나타내었으나 캘러스 형성 비율이 68.2%로 높지 않고 신초 생성이 가능한 embryogenic 캘러스의 생성비율 및 신초 생성율이 64.2% 정도로 낮아

Table 3. Response of culture material of *D. caryophyllus* L. "Belmonte" in callus formation and organogenesis after 8 weeks of inoculation

Culture material	Callus formation			Organogenesis		
	Formation rate(%)	Embryogenic Type formation rate(%)	Fresh weight (mg/ea)	Shoot formation rate(%)	No of formed shoot (ea/Disc)	Days need for shoot formation(Days)
Leaf	24.2	12.6	160	12.6	1.2	48
Petiole	68.2	48.0	215	64.2	2.0	42
Stem	86.4	82.5	268	92.8	2.8	42

※ MS medium was containing 3% sucrose, 1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L TDZ and agar 1.0%

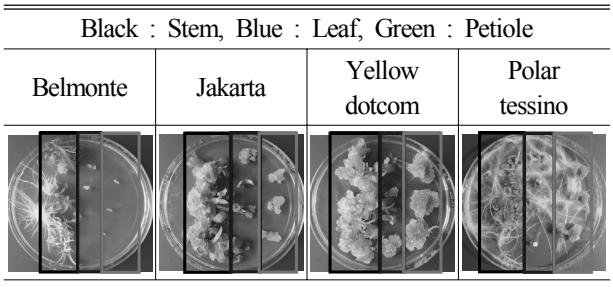


Fig. 5. Response of culture material of *D. caryophyllus* L. with NAA 1.0 mg/L and TDZ 1.0 mg/L after 8 weeks of inoculation.

서 조직배양 효율성 향상 면에서는 적합하지 못하였다. 줄기 배양에 있어서는 캘러스 발생률이나 embryogenic 캘러스 발생이 80%를 넘어 상대적으로 높은 신초 생성 가능성을 보여주고 있으며 분열반응이 활발하여 배양 8주 후 생성된 캘러스의 생체중이 268 mg/Leaf disc로 상대적으로 높은 분열 정도를 나타내었다. 캘러스 분화 과정을 거친 후 생성되는 신초 생성도 이와 비슷한 양상으로 전개 되었는데 줄기 배양 시 신초 생성률이 92.8%로 잎배양의 12.6%, 엽병 배양의 64.2%에 비하여 상대적으로 높았으며 신초수도 배양체당 2.8개로 잎과 엽병 배양에 비하여 월등히 많아서 카네이션을 배양할 때는 줄기 부위가 가장 적절하였다.

기본 배지설정

카네이션의 최적 분화 및 기내생장에 적합한 배지를 선발하고자 MS, B5, white, LS, SH 배지를 배지 표에 따라 조성하여 사용하였다(Murashige and Skoog, 1962; Bhojwani *et al.*, 1989; Linsmaier and Skoog, 1965). 치상은 유엽이 기내에서 전개되어 5-6매 정도 되었을 때 기내로부터 식물체를 채취하여 잎을 제거한 후 줄기 부위를 0.5 cm 길이로 잘라 사용하였으며 생장조절제 NAA 1.0 mg/L과 TDZ 1.0 mg/L을 첨가하여 기간 경과에 따른 조직배양 반응성을 조사하였다. B5배지에서 카네이션 줄기를 배양할 경우 전체적으로 분화하는 세포가 적어 캘러스 발생률이 떨어졌으며 발생한 캘러스도 배발생 캘러스 비율이 낮게 형성되고 이에 따라 신초생성도 적었다. 이는 어성초의 절간배양에서 관찰할 수 있었던 바와 같이 B5배지에서 형성되고 생장한 캘러스는 치밀하지 못하고 회백색의 non-embryogenic 캘러스의 비율이 높게 나타나 배양배지로는 부적합 하였다는 보고와 일치하였다(Ryu *et al.*, 1996). 조직배양에서의 배의 형성은 배지내의 질소형태에 의해 큰 영향을 받는데(Sung *et al.*, 1994; Wetherel and Dougall, 1976) 당근으로 한 실험에서 KNO_3 단독 보다는 NH_{4+} 이온을 첨가함으로서 배발생을 증가시킬 수 있다고 보고한 내용으로 볼 때 B5 배지는 환원형 질소의 양이 적어서 신초발생 양상이 저조한 것으로 판단되었다. 또한 White 배지도 캘러스 분화 및 신초 발생이 저조하였는데 이는 White 배지가 뿌리배양을 위한 배지로는 사용될 수 있으나 캘러스 형성 및 생장을 목적으로 사용할 때에는 무기성분의 함유량이 부족하다는 보고와 유사하였다(Bhojwani *et al.*, 1989). 이에 비해 MS와 LS 그리고 SH 배지는 상대적으로 높은 분열반응을 나타내었는데 품종별로 약간의 차이는 있었으나 3종류의 배지 모두에서 대체적으로 80% 이상의 캘러스 발생과 50% 이상의 신초 형성 능력이 있음이 확인되고 있으나 LS, SH 배지보다는 MS 배지에서의 분열과 재분화 능력이 뛰어나서 Belmonte 품종은 62.4%의 신초 분화율을 Jakarta 품종은 76.2%, Yellow dotcom 품종 68%, 그리고 Polar tessino 품종에서 78.6%을 나타내서 LS와 SH 배지에 비해서 각각 평균적으로 13.3%, 12.2% 높아 기본 배지로는 가장 적합하였다(Table 4).

Table 4. The callus and shoot formation rate of *D. caryophyllus* L. varieties in different culture media after 8 weeks of inoculation

Culture Media	Belmonte		Jakarta		Yellow dotcom		Polar tessino	
	C.F.R(%)	S.F.R(%)	C.F.R(%)	S.F.R(%)	C.F.R(%)	S.F.R(%)	C.F.R(%)	S.F.R(%)
MS	92.8	62.4	92.4	76.2	100	68.0	98.2	78.6
B5	28.6	12.5	24.8	20.6	52.6	10.8	24.8	12.6
White	68.2	28.6	50.6	30.6	68.0	32.9	42.6	28.5
LS	82.4	56.4	84.2	68.2	100	48.9	81.6	58.6
SH	86.8	52.6	88.8	62.4	100	52.6	87.8	64.8

※ C.F.R. means callus formation rate and S.F.R. means shoot formation rate

※ Culture media was containing 3% sucrose, 1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L TDZ and agar 1.0%

Table 5. The culture response of *D. caryophyllus* L. varieties with different coagulating agents after 8 weeks of inoculation

Coagulating agent(%)		Belmonte		Jakarta		Yellow dotcom		Polar tessino	
		C.F.R(%)	S.F.R(%)	C.F.R(%)	S.F.R(%)	C.F.R(%)	S.F.R(%)	C.F.R(%)	S.F.R(%)
Agar	0.8	92.0	58.6	93.2	74.6	100	66.2	96.5	76.4
	1.0	92.8	62.4	92.4	76.2	100	68.0	98.2	78.6
	1.2	94.2	64.8	92.0	78.0	100	72.0	96.8	78.6
Phytagel	0.2	92.0	61.8	91.6	78.0	100	66.8	97.6	76.8
	0.3	94.8	65.2	93.6	81.2	100	74.2	97.0	81.2
	0.4	93.2	60.0	91.4	74.4	100	62.8	98.0	73.8

※ MS medium was containing 3% sucrose, 1.0 mg/L NAA and 1.0 mg/L TDZ

캘러스의 생장 및 분화가 배지 내 수분 및 양분흡수와 관련이 있는 배지응고제에 따라 변화할 수 있음을 카네이션 배양을 통하여 조사하였다. Lee 등 (1996)이 agar와 phytagel의 농도가 증가할수록 캘러스의 수분 흡수가 어려워 스폰지형의 캘러스가 발달하고(Moon *et al.*, 1983) 물리적 변화에 따른 함수능력의 감소가 식물체 분화능을 증대시킨다는 보고와(Liu *et al.*, 1985) 벼 약배양에서는 Phytagel이 embryogenic 캘러스의 발생을 촉진한다는 보고가(Lee *et al.*, 1995; Van and Kitto, 1992) 있었듯이 카네이션 조직배양 시 사용되는 배지응고제에 있어서도 agar 보다는 phytagel을 사용하는 것이 신초생성률 향상에 있어 유리하였다. 선발된 카네이션 품종인 Belmonte, Jakarta, Yellow dotcom, Polar tessino 등 4개 품종 모두가 phytagel 0.3% 첨가 배지에서 가장 높은 신초 생성율을 나타내었는데 가장 높은 81.2%를 보인 Jakarta와 Polar tessino 품종을 위시하여 일반적인 배지응고제 처리인 agar 1.0%에 비하여 2.6~6.2% 향상된 생성율을 나타내었다(Table 5).

카네이션 품종별 조직배양 시 탄소공급원에 따른 캘러스 유기 및 식물체 분화정도를 조사한 바는 Table 6과 같다. 식물조직 배양 시 영양원과 탄소공급원으로 쓰이는 당은 5탄당과 6탄당 그리고 단당류와 이당류로 나누어지는데 배양되는 식물체에 따라 가장 잘 이용할 수 있는 당의 종류가 달라질 수 있다. 카네이션을 배양할 때에는 탄소원으로 sucrose를 사용할 경우가 가장 양호 하였는데 기타 탄소원을 보면 fructose와 lactose 순으로 사용효과를 보였으나 캘러스 생장정도가 약하고 기관분화 능력이 떨어져서 탄소원 으로는 적당하지 못하였다. 탄소원 처리 농도별 신초 발생 양상을 비교해 보면 탄소원을 첨가하지 않은 배지에서는 캘러스의 발생 및 분화가 거의 이루어지지 않아 배지조성에 탄소원이 반듯이 첨가되어야 함을 알 수 있었으며 sucrose 1.5% 처리에서 전체적으로 신초 발생이 적고 신초수도 적게 형성되는 결과를 보이는 것으로 보아 카네이션 배양 시 요구되는 최소 탄소원 공급량이 1.5% 보다는 높은 것을 알 수 있었다. 배양 8주 경과 후 탄소원으로 sucrose 3.0%를 처리하고 신초 분화 양상을 보면 Belmonte, Jakarta, Yellow dotcom, Polar tessino 등 카네이션 4품종 모두에서 탄소원으로 sucrose 3% 처리 시 가장 높은 캘러스 발생과 신초분화 정도를 나타내었는데 92.4~100% 범위의 캘러스 발생과 70.4~82.6%의 신초가 생성되었다. Sucrose 6.0%의 고농도 처리에서는 신초 생성 감소 현상이 나타났는데 6.0% 처리 시 3.0% 처리에 비해 4품종 평균 6.1% 하락하였고(Table 6) 분화되는 신초수도 절편체당 0.6개 감

Table 6. Effect of different carbon source on organogenesis from stem culture of different *D. caryophyllus* L. varieties supplied with NAA 1.0 mg/L and TDZ 1.0 mg/L

Carbon source(%)		Belmonte		Jakarta		Yellow dotcom		Polar tessino	
		C.F.R(%)	S.F.R(%)	C.F.R(%)	S.F.R(%)	C.F.R(%)	S.F.R(%)	C.F.R(%)	S.F.R(%)
Non-carbon source		-	-	6.2	-	4.8	-	-	-
Sucrose	1.5	86.4	42.6	90.2	48.4	100	46.6	62.8	41.6
	3.0	92.8	70.4	92.4	82.6	100	76.2	98.2	80.2
	6.0	82.6	62.4	89.6	76.2	100	68.0	86.0	78.6
Fructose	1.5	76.4	25.8	62.4	28.4	100	30.4	72.6	28.7
	3.0	80.6	40.6	78.2	42.6	100	48.6	86.4	60.4
	6.0	62.8	24.2	50.6	32.6	100	42.6	68.4	42.6
Lactose	1.5	42.6	16.4	20.8	18.2	74.2	-	32.6	-
	3.0	48.4	28.2	42.6	32.6	82.6	-	52.0	-
	6.0	26.5	-	21.6	-	60.8	-	24.8	-

※ MS medium was containing 1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L TDZ and agar 1.0%

소하였다(Data was not shown). 이러한 결과는 백합의 인편 조직배양에서도 확인 할 수 있었는데(Takayama and Misawa, 1980) 형성된 캘러스의 과다한 당 흡수로 인한 조직 내 당의 축적이 자가 영양체로의 전환을 지연시킬 뿐만 아니라 배지의 높은 삼투 농도가 세포의 휴면을 유도하기 때문인 것으로 알려져 있다(Paek and Cho, 1994; Chung *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996).

적 요

분자육종의 발전에 따라 좀 더 유용한 형질전환 식물체를 더 많이 얻어내기 위한 많은 형질전환 기술들이 개발되어오고 있으나 새로운 수요를 충족시키기 위한 다양한 종류의 새로운 품종들이 실시간으로 새롭게 개발되고 있으며 개발된 품종에 적합한 새로운 형질전환 기술에 대한 개발 필요성 또한 지속적으로 요구되고 있다. 카네이션(*Dianthus caryophyllus* L.)은 전 세계적인 주요 화훼작물 중 하나로 경제적 파급효과가 매우 큰 작물이다. 따라서 기술개발의 파급효과가 큰 카네이션을 대상으로 조직배양 및 형질전환의 효율성을 향상시키기 위하여 시장에서 주요하게 거래되고 있는 주요 품종 18종을 수집하고 이 중 조직배양을 통한 신초 분화 능력이 우수한 4개 품종 Yellow dotcom, Jakarta, Belmonte, Polar tessino 등을 선발하였다. 선발된 4개 품종에 공통으로 적용시킬 수 있는 가장 효율적인 생장조절제는 MS+Sucrose 3%+NAA 1.0 mg/L+TDZ 1.0 mg/L. 이었으며 MS+Sucrose 3%+NAA 3.0 mg/L+BA 1.0 mg/L 처리는 Belmonte.에 적용 가능한 생장조절제 조합이었다. 캘러스 형성과 신초 분화에 가장 효율적인 기본 배지는 MS 이었으며 탄소원으로는 Sucrose를 3%로 , Phytagel 0.3%를 배지 경화제로 처리하는 것이 조직배양을 통한 재분화 식물체 획득에 가장 효과적이었다. 가장 효율적 조직배양 체계를 구축하기 위한 조직배양 부위는 줄기 부위 이었으며 이 부위를 배양재료로 사용할 경우 신초 생성율을 80.2%까지 올릴 수 있었고 배양소요 기간도 6일 정도 단축할 수 있었다.

사 사

본연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호 : 2008 0401034031) 지원에 의해 이루어진 것입니다.

인용문헌

Bhojwani, S.S., M.K. Razdan and S.J. Choi. 1989. Plant tissue culture. Korea text cooperation pp. 33-49, pp. 118-119.

Choi, Y.E., U.D. Yeo and W.Y. Soh. 1986. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from stem callus of *Cedrala sinensis* JUSS. Kor. J. Plant Tissue Cult. 13:61-70.

Chung, J.D., J.S. Harn and J.K. Sohn. 1995. Somatic Embryogenesis from Filament-Derived Callus of *Paeonia lactiflora* PALL. Kor. J. Plant Tissue Cult. 22:47-52.

Han, B.H., E.J. Suh, S.Y. Lee, H.K. Shin and Y.P. Lim. 2007. Selection of non-branching lines induced by introducing *Ls*-like cDNA into chrysanthemum (*Dendranthema* × *grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) “Shuho-no-chikara”.

Scientia Horticulturae 115:70-75.

Hodges, T.K., K.K. Kamo, C.W. Imbrie and M.R. Becwar. 1986. Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. Bio. Tech. 4:219-223.

Kubo, T., M. Tsuro, A. Tsukimori, Y. Shizukawa, T. Takemoto, K. Inaba and S. Shiozaki. 2006. Morphological and physiological changes in transgenic chrysanthemum *morifolium* Ramat. 'Ogura-nishiki' with *rolC*. Jpn. J. Soc. Horticult. Sci. 75:312-317.

Lee, J.H. and S.Y. Lee. 1995. Effects of gelling agents and growth regulation on Rice anther culture. Kor. J. Plant Tissue Cult. 22:35-40.

Lee, J.H., S.Y. Lee and S.B. Namkoong. 1996. Effects of growth regulators, sucrose and gelling agents on callus growth and plant regeneration in *Angelica koreana* MAX. Kor. J. Medicinal Crop Sci. 4:78-85.

Linsmaier, E.M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 18:100-127.

Liu, L.F. and K.L. Lai. 1985. High frequency plant regeneration from water stressed rice tissue culture. *In* Abstracts of the first international congress of plant molecular biology. p. 11.

Liu, L.F. and K.L. Lai. 1986. Further studies on the variability of plant regeneration from young embryos callus culture in rice plant (*Orisa sativa* L.). Jpn. J. Crop Sci. 55:41-46.

Mitiouchkina, T.Y. and S.V. Dolgov. 2000. Modification of chrysanthemum plant and flower architecture by *rol C* gene from *Agrobacterium rhizogenesis* induction. Acta. Hort. 508:163-169.

Moon, H.K., Y.P. Hong, Y.W. Kim and J.S. Lee. 2001. Genotype Effect on Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of 15 *Aralia elata*. Kor. J. Plant Tissue Cult. 28:129-134.

Moon, H.P., S.H. Choi and Y.H. Soh. 1983. Effect of high agar medium on plant regeneration in rice anther culture. Kor. J. Breed. 20:335-340.

Murashige, T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Paek, K.Y. and J.T. Cho. 1994. Year-round production system of pathogen-free stock and micropropagation in Fritillaria thunbergii. Korea RDA crop experiment station. pp. 11-12.

Ryu, J.H., B.G. Choo, H.S. Doo and T.H. Kwon. 1996. Plant Regeneration by the Stem Culture in *Houttuynia cordata* Thunberg. Kor. J. Medicinal Crop Sci. 4:126-131.

Sung, N.S., K.Y. Paek and Y.A. Chae. 1994. Micropropagation of *Aconitum carmichaeli* Debx. and *Rehmania glutinosa* Libosch. through the plant tissue culture techniques. Korea RDA Crop Experiment Station. pp. 33-34.

Takatsu, Y., Y. Nishizawa, T. Hibi and T. Akutsu. 1999. Transgenic chrysanthemum (*Dendrantherma grandiflorum*) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cineria*). Hort. Sci. 82:113-123.

Takayama, S. and M. Misawa. 1980. Differentiation in lillium bulb scales grown *in vitro*. Effect of activated charcol. Physiological age of bulbs and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation *in vitro*. Physiol. Plant. 48:121-125.

Van, Eck and S.L. Kitto. 1992. Regeneration of peppermint and orangemint from leaf discs. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 30:41-49.

Wetherel, D.F. and K. Dougall. 1976. Source of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. Physiol. Plant. 37:97-103.

Zukker, A., T. ahroni, T. Tzfira, H. Ben-Meir and A. Vainstein. 1999. Wounding by bombardment yields highly efficient Agrobacterium-mediated transformatiomn of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Molecular breeding: New Strategies in Plant Improvement 5(4):367-375.

(접수일 2009.10.19; 수락일 2010.12.9)