

시클라멘 (*Cyclamen persicum* Mill.)의 조직배양에 의한 식물체 재분화

은종선* · 김영선¹ · 한상권²

전북대학교 농과대학 생물산업연구소, ¹남도대학 원예산업과, ²북면초등학교

Plantlet Regeneration by Tissue Cultures of *Cyclamen persicum* Mill.

EUN, Jong Seon* · KIM, Young Seon¹ · HAN, Sang Kwon²

Research Institute of Bioindustry, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea,

¹Department of Horticultural Industry, Provincial College of Namdo, Changhung, 529-850, Korea,

²Bukmyun Primary School, Chongup, 580-810, Korea

ABSTRACT This study was conducted to examine the effects of explant sources and plant growth regulators on mass propagation of *Cyclamen persicum*. Tuber, cotyledon, and petiole tissues were cultured on MS medium supplemented with different concentrations and combinations of auxins and cytokinins. Shoots were not induced from calli on cotyledon and petiole explants cultured on MS medium containing various concentrations of 2,4-D or NAA. However, multiple shoots were formed directly from tuber explants cultured on the medium containing 0.5 and 1.0 mg/L 2,4-D or NAA. In MS medium with cytokinin alone, TDZ was more effective in shoot formation than BA or kinetin in all explants. The combinations of NAA and BA was found to be most effective in shoot formation from tuber, cotyledon and petiole explants. Especially, shoots were formed from all the tuber explants on the medium containing 0.5 mg/L of NAA and BA. Hormonal effects on root formation were examined by subculturing single shoots on MS medium containing NAA or IBA. The medium with 0.5 mg/L IBA was most effective in root induction and subsequent plantlet regeneration.

Key words : Cyclamen, mass propagation, plant growth regulator

서 론

시클라멘은 다른 괴경식물과는 달리 분구 또는 목자를 형성하지 않는 특징을 가지고 있기 때문에 주로 종자, 괴경분할, 엽삽 등에 의해 번식하고 있으나 괴경분할의 경우 부패율이 높아 실제 번식수단으로 이용하기는 곤란하다. 따라서 종자번식에 의존하고 있는데 종자가 고가이고 발아율이 낮으며 발아기간도 길어 개화까지의 소요기간이 약 15~18개월이 소요되므로 재배기간이 상당히 긴 것이 문제점으로 지적되고 있다. 또한 유전적으로 잡종성이 강하기 때문에 우량품종을 육성하여도 종자번식 후대에는 형질분리가 일어나 화색이나 엽

반에 변이가 많이 발생하는 문제점이 따르며, 우수한 형질을 가진 개체를 육종하여도 당대에 한하기 때문에 F₁잡종의 양친유지에도 많은 어려움이 있다.

이와 같이 품종유지 증식에 많은 문제점이 있어 우수한 품종을 육성하여 모본의 형질을 그대로 유지할 수 있는 영양번식에 의한 증식 수단으로서 조직배양에 의한 번식법이 시행되었는데, 다른 식물에 비해 증식률이 낮아 조직배양이 비교적 어려운 식물종의 하나로 되어 있다.

시클라멘의 조직배양은 Mayer (1956)가 괴경조직편을 처음으로 배양하였고 그 후 많은 연구가 되어왔는데 개화주의 괴경, 엽병, 엽신, 화경, 약, 무균실생 등이 배양재료로 이용되어 왔지만 개화주의 괴경은 내생균이 많아 조직의 무균화작업이 어렵다. Kiviharju 등 (1992)은 접합자배, 자방, 약 등을 배양재료로 하여 체세포배 유도에 적합한 배양절편을 구명하기 위한 실험을 수행한 바 있고, 무균실생의 괴경조직, 자엽,

* Corresponding author. Tel 063-270-2576

E-mail jseun@moak.chonbuk.ac.kr

엽병 등을 이용할 경우 괴경절편에서 체세포배나 기관분화 유도가 가능하였다 (Schwenkel and Grunewaldt 1987).

본 실험은 시클라멘 우량종묘의 대량생산을 위하여 기내 발아한 괴경, 엽병, 자엽 등을 배양하여 shoot 발생에 요구되는 성장조절제의 효과 및 shoot로부터 뿌리발생을 조사하였다.

재료 및 방법

시클라멘 F₁ 품종 "Bonfire Red"를 무균발아시킨 약 40일 후 유식물체의 괴경, 자엽, 엽병의 절편을 배양재료로 이용하였으며, 괴경은 2 mm의 두께로 1개의 괴경에서 3개의 절편을 취하였고, 자엽은 5×5 mm, 엽병은 5 mm의 크기로 잘라서 치상하였다. 배지는 MS기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에 auxin류로 FA (4-fluorophenoxyacetic acid), 2,4-D, NAA, cytokinin류로 BA, kinetin, TDZ (Thidiazuron)를 각각 0.5 및 1.0 mg/L 첨가하였고, NAA와 BA 혼용처리는 0.2~1 mg/L를 조합하여 사용하였으며, 20℃의 성장상에서 암배양하여 배양 60일 후에 캘러스 및 shoot 분화율을 조사하였고 shoot 분화 후에는 2,000 Lux의 형광등 하에서 명배양하였다. Shoot에서 뿌리를 발생시키기 위하여 NAA와 IBA를 조합한 MS배지에 배양 후 뿌리발생률을 조사하였다.

결과 및 고찰

Auxin류 단독처리 효과

괴경절편배양의 경우 캘러스는 배양 4주일 후부터 0.5, 1.0 mg/L FA 처리구에서만 발생되었는데 캘러스가 계속적으로 증식되지는 않았으며, 캘러스로부터 shoot 분화도 관찰되지 않았다 (Figure 1). 그러나 0.5, 1.0 mg/L 2,4-D 처리구는 배양 30일 후에 절편의 절단면에서 뿌리발생이 먼저 유도되었고 배양 6주일 후부터는 shoot가 분화되기 시작하였는데 치상절편의 모두에서 다아체로 분화되어 양호한 결과를 보였다. NAA 처리구에서는 배양 90일 후까지 캘러스 발생은 관찰되지 않았으며 배양 20일경부터 절편체의 절단면에서 직접 shoot가 발생된 후 배양 90일 후에는 일부의 치상절편에서 1개의 절편당 10개 이상의 다아체 분화가 관찰되었고 분화된 shoot는 절편체에서 성장하기 시작하여 괴경절편에서 shoot 분화는 2,4-D와 NAA가 적당하였다.

자엽절편의 경우 0.5, 1.0 mg/L FA, 2,4-D, NAA 처리구의 경우 몇 개의 절편체에서 약간의 캘러스가 유도되었으나 크게 증식되지는 않았고 0.5 mg/L FA 처리구에서 유도된 캘러스로부터 약간의 shoot 발생이 관찰되었으나 1개의 절편에서 1~2개 분화되는 정도였고, 2,4-D와 NAA 처리구 역시 배양

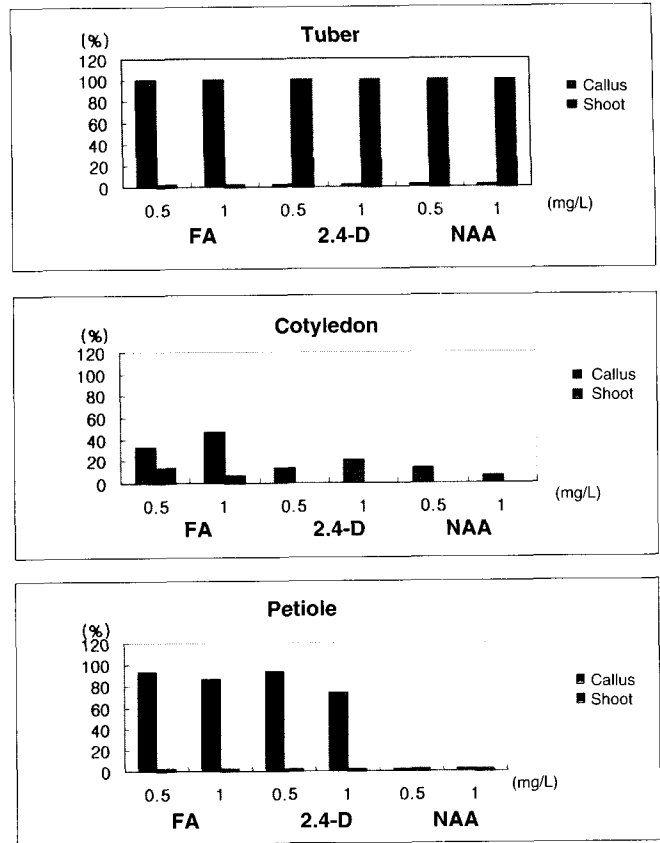


Figure 1. Effects of callus and shoot formation by tuber, cotyledon and petiole explants culture on MS medium with auxins.

90일까지 약간의 캘러스만 유도되었고 대부분의 절편은 shoot 발생에 효과적이지 못하였다.

엽병절편은 FA와 2,4-D 처리구에서 캘러스 발생률은 거의 80% 이상으로 높았으나 배양 90일까지 단 1개의 shoot 분화도 관찰되지 않았고, NAA 처리구는 캘러스도 발생되지 않고 치상 당시의 상태로서 shoot 분화율이 낮은 것은 자엽과 비슷한 결과를 보였다.

Cytokinin류 단독처리 효과

모든 절편체에서 BA와 kinetin 처리구는 캘러스 발생 없이 shoot 분화를 보였고, TDZ 처리구에서는 캘러스 발생과 함께 shoot가 분화되어 3종의 배양절편체가 비슷한 경향을 보였다 (Figure 2).

괴경절편의 경우 0.5, 1.0 mg/L BA 처리구에서 각각 66.7%, 53.3%의 shoot가 분화되어 0.5, 1.0 mg/L kinetin 처리구의 46.6%, 33.3%보다 약간 높은 shoot 분화율을 보였다. BA와 kinetin 처리구에서는 모든 절편체에서 캘러스 발생 없이 절편체의 절단면에서 직접 shoot가 분화되었다. 그러나 TDZ의 경우 100%의 캘러스 발생률을 보였고 0.5 mg/L 처리구의 경우 73.3%, 1.0 mg/L 처리구의 경우 100%의 shoot 발생률을 보여 1.0 mg/L TDZ 처리구에서 가장 양호한 결과를 보였다.

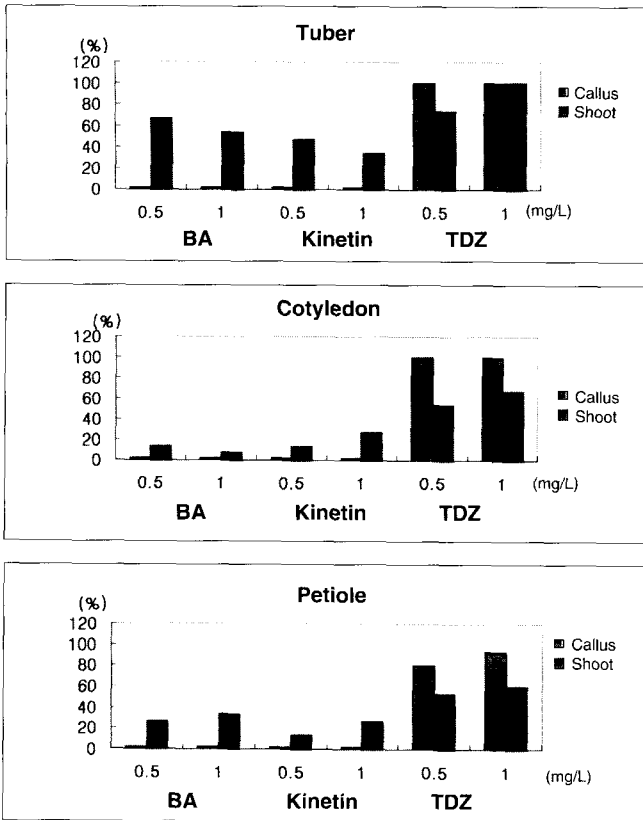


Figure 2. Effects of callus and shoot formation by tuber, cotyledon and petiole explants culture on MS medium with cytokinins.

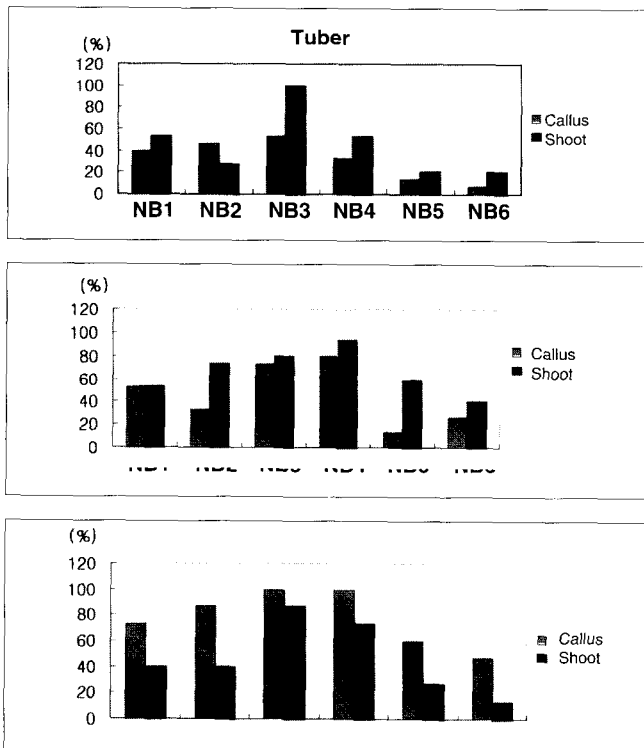


Figure 3. Effects of callus and shoot formation by tuber, cotyledon and petiole explants culture on MS medium with NAA and BA. NB1, 0.2 mg/L NAA+0.5 mg/L BA. NB2, 0.2 mg/L NAA+1.0 mg/L BA. NB3, 0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L BA. NB4, 0.5 mg/L NAA+1.0 mg/L BA. NB5, 1.0 mg/L NAA+0.5 mg/L BA. NB6, 1.0 mg/L NAA+1.0 mg/L BA.

자엽절편도 TDZ처리구에서 100% 캘러스 발생률을 보였는데 캘러스가 약간 유도된 상태에서 shoot 분화가 동시에 이루어졌고 shoot 발생률은 괴경절편보다는 약간 낮았다. 그러나 TDZ처리구에서 발생하는 shoot는 1개체의 자엽 절편체에서 절단면뿐만 아니라 엽육조직에서 배양 40일경부터 다수의 shoot가 발생되어 비교적 양호하였다.

엽병조직 역시 BA, kinetin처리구의 경우 캘러스 발생 없이 shoot분화가 이루어졌고 자엽절편보다 약간 양호하였으나 그다지 좋은 결과는 아니었다. TDZ 처리구의 경우 괴경과 자엽절편이 비슷한 결과로서 절단면의 조직이 부푼 상태에서 캘러스가 약간 유도되었으며, 주로 절단면에서 shoot분화가 관찰되었다.

NAA와 BA 혼용처리 효과

3종의 절편체에서 캘러스와 shoot가 같이 분화되었는데 (Figure 3) 괴경절편의 경우 캘러스 발생률보다는 shoot 분화율이 높은 경향으로 배양 30일경부터 대부분 절편체에서 반응을 보였다. NAA와 BA가 0.5 mg/L씩 혼용첨가된 경우 100%의 shoot 분화율을 보였으며 1개의 절편에서 다수의 shoot 분화를 보여 괴경절편배양에서 효과적으로 나타났다 (Figure 4A). 그러나 1.0 mg/L NAA와 BA의 혼용처리는 다른 처리구에 비하여 shoot분화율이 낮은 편이었다.

자엽절편의 경우 auxin류 단용이나 cytokinin류 단용처리에서 괴경절편보다 shoot 발생률이 낮은 경향이었는데, NAA와 BA혼용처리에서는 전처리구에서 비교적 양호한 결과를 보여 괴경절편보다 전체적으로 좋은 반응을 보였다 (Figure 4B). 일부 절편체에서는 캘러스가 발생되기도 하였고 일부는 자엽 절편에서 직접 shoot 분화가 이루어졌는데 cytokinin류 단용처리와 마찬가지로 뿌리발생은 전혀 이루어지지 않았다.

엽병절편은 0.2, 0.5 mg/L NAA와 BA가 혼용첨가된 경우 캘러스 발생률이 높은 편이었으며 특히 0.5 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA 혼용처리구에서 shoot 분화율이 86.7%를 보여 가장 양호하였고, 1.0 mg/L NAA와 BA의 혼용처리구에서는 캘러스 발생 및 shoot 분화가 다른 처리구에 비해 약간 낮았다. 그러나 엽병조직 역시 auxin류와 cytokinin류에서 보인 반응에 비하면 NAA와 BA의 혼용처리가 효과적이었다.

Shoot로부터 뿌리발생과 식물체 재분화

절편부위별로 배양한 결과 대부분 shoot 분화는 이루어졌지만 뿌리발생 없이 분화된 shoot로부터 주로 다아체로 증식되는 경향이었는데, 이들 절편에서 분화된 shoot로부터 완전한 식물체를 얻기 위하여 분화된 shoot를 분할하여 NAA와 IBA의 단용처리에서 계대배양하였다 (Figure 5).

배양 15일경부터 0.5 mg/L IBA처리구에서 먼저 뿌리가 발생되어 배양 30일 후에는 모든 개체에서 뿌리가 배지 전체에

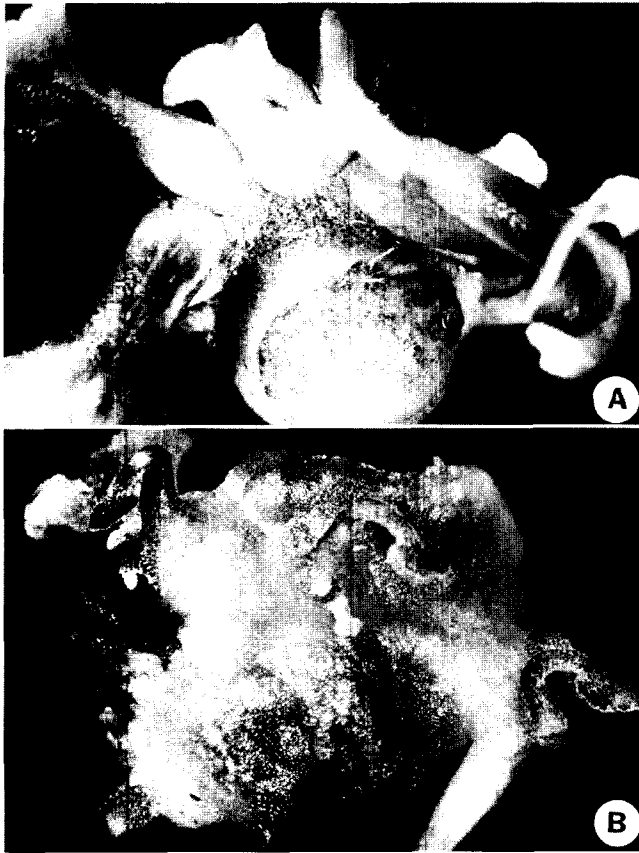


Figure 4. Multiple shoot formation by tuber(A) and cotyledon(B) explant culture on MS medium containing 0.5 mg/L NAA and BA respectively.

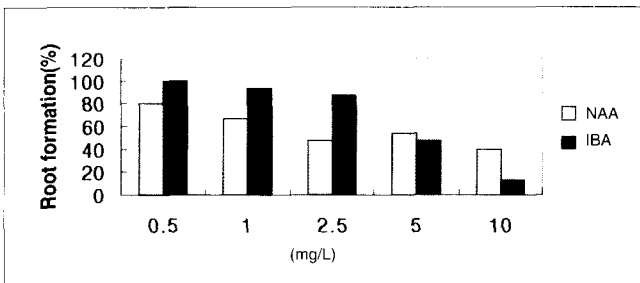


Figure 5. Effects of root formation from divided shoots on MS medium with NAA or IBA.



Figure 6. Root formation by subculture on MS medium with 0.5 mg/L IBA.

가득찰 정도로 발생되어 가장 양호하였다 (Figure 6). IBA 처리구의 경우 0.5~2.5 mg/L 처리구에서 비슷한 뿌리발생률을 보였고, 비교적 고농도인 5.0, 10.0 mg/L 처리구에서는 뿌리 발생률이 현저하게 낮아졌다.

NAA처리구 역시 뿌리발생에 효과적이었는데 IBA보다 약간 저조한 편으로 IBA가 계대배양 15일경부터 뿌리발생이 이루어진 것에 비해 배양 20일경부터 뿌리가 발생되기 시작하였고 발육속도도 비교적 느린 편이었는데 배양 30일 후의 조사에서 뿌리길이가 IBA처리구보다 짧았다.

이와 같이 발근된 shoot의 생장상태는 발근되지 않은 shoot에 비해 신초의 발생 및 생장이 빨랐고 shoot를 발근배지에 계대배양한 약 30~40일 후에는 포트에 이식이 가능할 정도로 성장되었다. 완전히 뿌리발생이 이루어진 후 재분화된 식물체들은 20°C의 순화실에서 약 10일간 순화과정을 거친 후 포트에 정식하였다.

시클라멘의 조직배양법으로 Kiviharju 등 (1992)은 약, 지방, 접합자 배 등을 배양재료로 하여 어린 절편으로부터 캘러스를 유도한 후 많은 체세포배를 형성시킬 수 있었고, MS기본배지에 1.0~1.5 mg/L 2,4-D, 10% coconut milk를 첨가한 경우 체세포배의 발생률이 높았으며 생장조절제 없는 배지에서 체세포배의 발아가 이루어졌고 온실에서 순화과정을 거쳐 정상적으로 개화를 유도할 수 있었으나, 엽병이나 소화경절편에서는 체세포배는 관찰되지 않았다고 하였다. 또한 Nakayama (1980)는 괴경절편을 이용하여 부정아를 유도한 후 shoot로부터 뿌리발생을 유도하여 식물체 재분화가 가능하다고 하여, 시클라멘의 조직배양은 부정아가 유도되어 기관 분화하는 경우와 체세포배를 유도하여 배 유래의 식물체를 재분화시키는 경우로 두가지 모두 조직배양에 의한 대량생산 시스템의 가능성을 가지고 있다.

이때 배지조성 및 생장조절제의 종류와 농도, 배양실내의 온도조건 등에 대한 많은 연구보고에서 (Mayer 1956; Okumoto and Takabayashi 1969; Stichel 1959) adenine은 shoot의 분화에 효과적으로 작용하였고, NAA는 shoot로부터 뿌리발생에 효과적이었으며 배양기간 동안의 온도는 20°C가 가장 양호하다고 하였다. 또한 Morel (1975)은 시클라멘의 엽병절편을 이용하여 다량의 캘러스를 유도한 다음 계속적인 캘러스의 계대배양을 할 경우 난의 배양에서 나타나는 protocorm과 같은 원괴체가 생성된 후 이 원괴체로부터 식물체가 분화된다고 하였다.

Eun 등 (1995)은 시클라멘의 자엽과 엽병절편을 auxin류와 cytokinin류가 혼용첨가된 MS배지에 배양하였을 때 자엽조직이 엽병조직보다 캘러스 및 캘러스로부터 shoot분화에 좋은 반응을 보였고, 2,4-D와 kinetin혼용처리구에서 자엽과 엽병절편 모두 shoot분화는 거의 없었으나, NAA와 BA가 혼용처리된 경우 자엽이나 엽병절편 대부분이 shoot분화가 이루어져 생장조절제의 처리에 따라 반응에 많은 차이가 있다고 하였다.

본 실험에서도 절편부위별로 배양한 결과 괴경절편이 가장 양호하였는데 auxin류 단용처리의 경우 괴경절편은 NAA처리에서 가장 양호하여, 1개의 절편체에서 10개 이상의 다아체가 분화되었고 자엽이나 엽병절편은 캘러스만 유도되었으며 대부분 치상당시의 상태로 절편부위별 반응에 많은 차이를 보였고 생장조절제에 따라서도 상당한 차이가 인정되었다. 즉 cytokinin류 단용처리에서도 1.0 mg/L TDZ처리구에서 괴경의 경우 100% shoot 분화율을 보였고, 자엽절편 역시 배양 40일 경부터 다수의 shoot가 발생되어 양호하였으나 다른 BA나 kinetin은 그다지 효과적이지 못하였다. 반면에 NAA와 BA혼용처리는 0.5 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA 혼용첨가 배지에서 괴경, 자엽, 엽병절편 모두 shoot 분화가 양호하였다. 그러나 시클라멘의 조직배양에는 많은 어려움이 뒤따르는데 무균발아한 재료를 이용하지 않을 경우에는 배양재료의 높은 오염률과 낮은 재분화율, 성장점 없이 single leaflet만 분화되는 것 등이 문제점이라고 하였다 (Fersing et al. 1982; Geier 1977).

시클라멘의 엽신, 엽병, 화경절편을 auxin류와 cytokinin류의 혼용배지에서 배양한 후 유도된 다아체를 분할하여 shoot로부터 뿌리를 유도할 경우 0.2 mg/L NAA에서 완전한 재분화 식물체를 얻을 수 있다고 하였으며 (Schwenkel and Grunewaldt 1988), 시클라멘의 엽병절편에서 분화된 shoot를 0.1 mg/L NAA에 배양하여 뿌리형성을 유도하였고 (Murasaki and Tsurushima 1988), *Meconopsis simplicifolia*의 자엽과 배측배양에서 유도된 shoot를 10 μ M NAA가 첨가된 배지에서 계대배양했을 때 뿌리 형성률이 가장 양호하다고 하였다 (Sulaiman and Babu 1993).

본 실험에서도 IBA와 NAA가 단용처리된 배지에서 절편체로부터 shoot를 분할하여 계대배양한 결과 계대배양 15일 경부터 0.5 mg/L IBA처리구에서 뿌리가 발생되기 시작하여, 배양 30일 후에는 pot이식이 가능할 정도로 뿌리가 발생되어 완전한 재분화식물체를 획득할 수가 있었다.

적 요

시클라멘의 급속증식체계를 확립하기 위하여 발아 후 자엽이 전개된 어린 식물체의 괴경, 자엽, 엽병 등의 절편을 분리하여 절편부위별로 캘러스 및 기관분화에 미치는 생장조절제의 종류와 농도에 따른 식물체의 성장반응을 조사하였다. 절편부위별 캘러스 형성 및 shoot분화에 있어서 auxin류 단용처리의 경우 괴경절편의 NAA처리구에서 절편으로부터 캘러스 없이 shoot가 직접 발생하여 가장 양호하였으며, 1개의 절편체에서 10개 이상의 다아체가 분화되었다. 자엽이나 엽병절편은 캘러스만 유도되었고 대부분 치상당시의 상태로 shoot 발생에 auxin류의 처리는 부적합하였다. Cytokinin류 단용처리는 1.0 mg/L TDZ처리구에서 괴경의 경우 100% shoot분

화율을 보였고, 자엽절편 역시 배양 40일경부터 다수의 shoot가 발생되어 양호하였다. NAA와 BA혼용처리는 0.5 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA 혼용첨가된 배지에서 괴경, 자엽, 엽병절편 모두 shoot 분화가 양호하였으며, auxin류와 cytokinin류 단용처리보다 NAA와 BA혼용처리가 모든 절편에서 양호한 결과를 보였다. 뿌리발생을 유도하기 위해 NAA와 IBA 단용처리에 shoot를 배양한 결과 배양 15일경부터 0.5 mg/L IBA처리구에서 뿌리가 발생되기 시작하여 배양 30일 후에는 pot이식이 가능할 정도로 뿌리가 발생되어 가장 양호한 결과를 보였다.

인용문헌

- Eun JS, Ko JA, Kim YS (1995) Plantlet regeneration by cotyledon and petiole cultures of *Cyclamen persicum* Mill. Korean J. Plant Tissue Cult. **22**(4):213-216.
- Fersing JA, Mouras A, Lutz A (1982) Première étape vers unemultiplication végétative industrielle du *Cyclamen* par la culture in vitro. PHM Revue Horticole **224**:27-30.
- Geier T (1977) Morphogenesis and plant regeneration from cultured organ fragments of *Cyclamen persicum*. Acta Hort. **78**:167-174.
- Kiviharju E, Tuominen U, Törmälä T (1992) The effect of explant material on somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. Plant Cell, Tissue & Organ Culture **28**:187-194.
- Marashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. **15**:473-479.
- Mayer L (1956) Wachstum und organbildung an in vitro kultivierten segmenten von *Pelargonium zonale* und *Cyclamen persicum*. Planta **47**:401-446.
- Morel G (1975) La multiplication végétative du cyclamen a partir de pétiole foliaire permettra-telle une nouvelle application de la culture "in vitro" horticulture. Pepiieristes; Horticulteurs. Maraichers **158**:25-28.
- Murasaki K, Tsurushima H (1988) Improvement on clonal propagation of cyclamen in vitro by the use of etiolated petioles. Acta Hort. **226**:721-724.
- Nakayama M (1980) Vegetative propagation of cyclamen by notching of tuber. II. Effect of scooping site and notching size on the regeneration of cyclamen tuber. J. Japan Soc. Hort. Sci. **49**:228-234.
- Okumoto H, Takabayashi S (1969) Aseptic culture of cyclamen tuber tissue. J. Japan Soc. Hort. Sci. **38**:68-77.
- Schwenkel HG, Grunewaldt J (1987) In vitro propagation of *Cyclamen persicum* Mill. International Symposium on Propagation of Ornamental Plant. pp. 659-662.
- Schwenkel HG, Grunewaldt J (1988) In vitro propagation of *Cyclamen persicum* Mill. Acta Hort. **226**:659-662.

Stichel E (1959) Gleichzeitige Induktion von Sprossen und Wurzeln an in vitro Kultivierten Gewebestücken von *Cyclamen persicum*. *Planta* **53**:293-317.

Sulaiman IM, Babu CR (1993) In vitro regeneration through

organogenesis of *Meconopsis simplicifolia* - an endangered ornamental species. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture* **34**:295-298.

(접수일자 2000년 11월 16일)