

정단 분열 조직배양에 의한 후리지아의 미세번식

고정애¹⁾ · 김명준¹⁾ · 김현순²⁾ · 이진재³⁾ · 김영숙*

¹⁾전북대 원예과 · ²⁾호남농업시험장 · ³⁾전북농업기술원 · *유전공학연구소

Micropropagation from Corm Apical Meristems Culture of *Freesia refracta* Hybrida

Jeong-Ae Ko¹⁾, Myoung-Jun Kim¹⁾, Jin-Jae Lee²⁾, Hyun-Soon Kim²⁾, Young-Sook Kim³⁾
Institute for Molecular Biology and Genetics, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea
¹⁾Department of Horticulture, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea
²⁾National Honam Agricultural Expt. Station, RDA, Iksan 570-080, Korea
³⁾Jeollabuk-Do Agriculture Research & Extension Service, Iksan 570-704, Korea

ABSTRACT

Corm apical meristem cultures of thirteen glasshouse freesia cultivars were tested to investigate the possibility of micropropagation using MS basal medium supplemented with 2,4-D, NAA(0.1, 0.5, 1.0mg/L, respectively) and BA (0.5~2.0mg/L). The majority of the tested cultivars could be induced callus and shoot buds in all culture condition. The combinations of NAA and BA appeared superior to that of 2,4-D and BA depending on cultivars for callus induction and shoot formation.

Among the cultivars, 'Golden Yellow' showed the highest regeneration capacity on MS media with 0.5mg/L NAA and 1.0 mg/L BA. The highest percentage of regeneration and the greatest number of shoot from calli were obtained through successive subculture on MS medium supplemented with 0.5mg/L BA. In that condition, more than 60% shoot regeneration and average of 25.1 shoots per explant was achieved. Transformed shoots on half-strength MS medium without plant growth regulators rooted easily.

Key words : freesia refracta, micropropagation, plant growth regulators, shoot regeneration.

서언

후리지아는 은은한 향기를 가지고 있는 화훼식물로 최근에는 화색이 다양한 품종이 개량되어 절화로서 많이 이용되고 있다. 그러나 그 번식방법은 일부 품

종을 제외하고 일반적으로 자구의 영양번식에 의해서 증식되고 있으므로 종자번식에 의한 것보다 증식 속도가 매우 느린 편이다. 또한 영양번식을 이용하여 증식시키려고 할 경우에 대부분의 구근류가 지니고 있는 바이러스 감염문제가 대두되고 있다. 이러

* 교신저자 : E-mail : kimys722@hanmir.com

한 문제점을 해결하기 위해서는 바이러스감염이 덜 된 정단분열조직을 배양하여 바이러스에 무독화한 식물체를 획득하는 배양기술의 적용이 필요하리라고 본다.

식물의 정단분열조직에 바이러스가 아직 감염되지 않았거나 그 밀도가 극히 낮은 이유는 바이러스는 유관속계를 통하여 식물체내에 쉽게 전이될 수 있는데 정단분열조직은 이동속도가 매우 느리기 때문에 바이러스로부터 보호될 수 있다. 따라서 정단분열조직을 배양하면 바이러스에 감염될 확률이 적으며 또한 multiple shoot 유도를 통한 미세증식의 효과가 있기 때문에 여러 식물에서 정단 분열 조직을 이용한 미세증식에 관하여 연구되고 있다. 그러나 후리지아의 조직배양에 관한 연구는 아직 미미한 편이며 대부분의 구근류처럼 인편조직 (Yoshio, 1979; Paek et al, 1983; Chung et al, 1984)이나 화뢰조직 (Paek and Choi, 1982), 화경조직 (Hosoki and Tadashi, 1980; Chung et al, 1983)을 이용하여 기내 증식을 시킨 보고는 있으나 정단 분열 조직을 이용한 미세증식에 관한 연구가 거의 이루어지지 못한 실정이다. 본 실험에서는 후리지아의 정단 분열 조직을 이용하여 미세증식의 효과에 미치는 식물생장조절물질의 효과를 조사하여 미세증식의 가능성을 조사하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료는 남원화훼시험장에서 분양 받은 13 품종의 후리지아 구근을 4℃로 30일간 휴면타파 시킨 후 실험에 이용하였다. 재료의 소독은 70% 알코올에 30초간 표면 살균한 후 7% calcium hypochlorite 수용액에 20분 동안 침지 시켰으며 멸균수로 4-5회 수세하였다. 멸균처리한 구근은 품종별로 해부현미경하에서 정단분열조직을 적출하여 기내배양에 사용하였다. 후리지아의 품종간의 캘러스 형성율 및 신초 분화율을 조사하기 위하여 13종의 구근의 정단 분열 조직을 적출하여 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 0.5mg/L NAA 와 1.0mg/L BA를 조합한 배

지와 0.1mg/L 2,4-D와 1.0mg/L BA를 조합한 배지에 배양하였으며, 배양 30일 후 캘러스 유도 및 신초형성율을 조사하였다. 한편, 후리지아 정단 분열 조직으로부터 캘러스 형성 및 신초분화에 미치는 식물생장조절제의 영향을 조사하고자 품종간 실험에서 비교적 반응이 좋았던 Golden yellow 품종의 정단 분열 조직을 MS 배지에 2,4-D, NAA 및 BA의 농도를 0.1~2.0 mg/L의 농도로 조합처리 한 배지에 배양하였다. 또한 유도된 캘러스로부터 미세증식에 적당한 시토키닌의 종류와 농도를 조사하고자 MS 배지에 BA와 kinetine을 각각 0.5~3.0 mg/L의 농도로 단용 처리한 배지에 배양하였으며 배양 60일 후 치상체 당 신초 분화수를 조사하였다. 배양에 이용한 모든 배지는 당을 30g/L을 첨가하여 pH를 5.8로 조정한 후 한천을 8g/L 첨가하였으며 25℃의 성장상에서 27μmol · m⁻² · s⁻¹의 조도로 배양하였다.

결과 및 고찰

캘러스 유도 및 신초분화에 미치는 성장조절제의 효과

13종의 후리지아의 구근을 저온 처리하여 휴면을 타파시킨 후 정단 분열 조직을 적출하여 품종간의 캘러스 및 신초 형성율을 조사하고자 MS 기본배지에 0.5mg/L NAA와 1.0mg/L BA를 조합한 배지와 0.1mg/L 2,4-D와 1.0mg/L BA를 조합한 배지에 배양하여 30일 후에 조사한 결과는 Fig. 1, 2와 같다. 0.5mg/L NAA와 1.0mg/L BA를 조합한 배지에서는 대부분 품종에서 캘러스 유도율은 11.1% 이상 60%로 다양하게 나타났으며 신초 형성율은 33.3%에서 60%로 나타났다. 특히 Golden yellow 품종은 캘러스 유도율과 신초 분화율이 각각 60%로 가장 양호한 것으로 나타났다. 또한 0.1mg/L 2,4-D와 1.0mg/L BA를 조합한 배지에서도 비슷한 결과로 Golden yellow 품종이 캘러스 및 shoot 형성율이 각각 44.4%와 50%로 가장 양호하였으나 공시한 품종이 대부분 0.5 mg/L NAA와 1.0mg/L BA를 조합한 배지에서보다 저조한 결과로 나타났다. 따라서 캘러스 유도와 신초분화에는 2,4-D와 BA를 조합하는 것 보다 NAA와

Table 1. Effects of plant growth regulators on callus induction from corm meristem tissue after 60 days of culture in freesia (*Freesia refracta* cv. Golden Yellow)^a

Growth regulators(mg/L)			Callus induction(%)	Shoot formation(%)	No. of shoot/explant
2,4-D	NAA	BA			
0.1		0.5	11.7	8.9	0.7
0.5		1.0	17.8	4.8	0.4
1.0		2.0	20.5	11.2	1.2
	0.1	0.5	35.1	34.7	4.2
	0.5	1.0	60.0	60.0	5.8
	1.0	2.0	44.7	29.8	2.6

^aMS medium was used.

BA를 조합하는 것이 효율적일 것으로 생각된다. 한편, 품종간 실험에서 캘러스 및 신초 형성율이 가장 양호했던 Golden yellow 품종을 공시하여 미세증식에 미치는 식물생장조절제의 종류 및 농도를 조사하고자 MS 배지에 2,4-D, NAA 및 BA의 농도를 0.1~2.0mg/L의 농도로 조합처리 한 배지에 60일간 배양한 결과는 표 1과 같다.

2,4-D와 BA를 조합한 배지에서는 비교적 부서지기 쉬운 캘러스가 유도되었으며 배지면에 닿은 치상체 부분에서 주로 캘러스가 형성되었다. 또한 초기의 신초가 분화되는 경향도 보였으나 생장은 저조한 편이었다. 한편 NAA와 BA를 조합처리한 배지에서는 비교적 단단한 모양의 기관분화성 캘러스가 유도되었으며 2,4-D와 BA를 조합처리한 배지에서보다 캘러스 유도가 양호하였고 신초분화율도 비교적 높은 편이었다.

특히 0.5mg/L NAA와 1.0mg/L BA를 조합한 배지에서는 가장 높은 캘러스 유도율을 보였으며 치상체당 신초 분화수도 5.8개로 나타나서 캘러스를 통한 multiple shoots 유도에 적당한 배지라고 생각되었다. 튜립의 기내배양에서도 NAA와 BA를 조합 처리하여 캘러스 증식과 부정아 유도에 효과적임을 보고하였는데 (Kim et al., 1989) 이는 본 실험과 유사한 결과라고 생각되었다.

일반적으로 정단분열조직을 배양할 때 식물 생장 조절제를 첨가하지 않으면 multiple shoots형성보다는 완전한 한 개체로의 발달이 비교적 양호하다. 생

강의 생장점배양에서도 MS 배지에 생장조절제를 첨가하지 않고 배양했을 때 캘러스 형태를 거치지 않고 바로 shoot로 분화되는 개체가 많았다고 하였다 (Hosoki and Sogawa, 1977). 반면 적절한 생장 조절제를 첨가하면 정단분열조직에서 직접 multiple shoot가 형성되거나 캘러스화 하면서 캘러스로부터 multiple shoot가 형성되는 경우가 있다. 따라서 정단분열조직을 이용한 식물체의 대량증식을 목표로 할 때는 배지에 첨가하는 적당한 생장조절제의 종류와 농도를 구명할 필요가 있다. 본 실험의 경우 후리지아의 미세증식을 위해서 일차적으로 구근의 정단분열조직을 배양하여 캘러스 유도에 적당한 농도를 조사한 결과 0.5mg/L NAA와 1.0mg/L BA를 조합처리한 배지에서 양호한 반응이 보여졌다.

캘러스로부터 multiple shoot 형성에 미치는 시토키닌의 효과

유도된 캘러스로부터 multiple shoot에 미치는 시토키닌의 효과를 조사하기 위하여 BA와 kinetin을 0.5mg/L에서 3.0mg/L의 농도로 각각 단용 처리한 배지에 캘러스를 치상하여 조사한 결과는 표 2와 같다. BA의 농도가 높아질수록 신초의 재분화율이 낮아지는 경향으로 3.0mg/L의 농도에서는 0.9%의 재분화율을 나타냈고 가장 저농도인 0.5mg/L 처리구에서 62.4%로 가장 효과적이었으며 치상체 당 25.1개의 신초가 정상적으로 분화되어 (Fig. 3 left) 후리지아의 정단분열 조직배양에 의한 미세증식에 적절한

Table 2. Effect of cytokinins on multiple shoots formation from callus derived from apical meristem tissue of freesia (*Freesia refracta* cv. Golden Yellow)^a

Cytokinin Conc (mg/L)		Shoot formation(%)	No. of shoot /explant
BA	0.5	62.4	25.1
	1.0	34.2	17.5
	2.0	10.4	4.5
	3.0	0.9	0.1
Kinetin	0.5	22.4	2.5
	1.0	35.7	12.4
	2.0	11.0	5.6
	3.0	1.3	0.8

^aMS medium was used.

농도라고 생각된다. 또한 kinetin도 BA와 비슷한 경향으로 농도가 높을수록 신초분화율이 낮은 경향을 보였으나 1.0mg/L의 농도에서는 비교적 BA처리구와 유사한 반응을 보였지만 전체적으로 후리지아의 미세증식에는 BA가 적당할 것으로 생각된다.

시토키닌은 일반적으로 지하부의 발육을 억제하고 지상부의 생육을 촉진시킨다고 알려져 있어 (Pennazio, 1975) 식물체의 다량증식을 위한 실험에서 신초를 유도 증식시키는데 많이 이용되고 있다. Cherry의 대량번식에 관한 시토키닌의 효과를 조사한 실험에서 BA 2.0mg/L에서 평균신초수가 6.6개로 가장 좋은 반응을 보였으며 (Han et. al., 1998), 또한 수선화의 기내증식에 관한 실험에서 BA는 부정아의 수를 증가시키고 부정아 형성에 필수적이라고 하여 (Hosoki and Tadashi, 1980) 본 실험의 결과와 유사한 경향을 보고한 반면, 인편조직을 이용한 튜립의 영양번식에 관한 연구에서 기내 부정아 형성에는 kinetin의 첨가가 필수적이며 가장 효과적인 농도는 3.0mg/L이라고 하였다 (Yoshio, 1979). 그러나 히아신스의 인편과 엽육조직을 배양하였을 때 오옥신류인 IAA나 IBA를 각각 1.0mg/L 씩 첨가하였을 때 자구 분화율이 높다고 하였는데 (Chung et al, 1983) 이러한 결과들은 구근류의 종류와 치상부위에 따라 반응하는 농도가 다르기 때문인 것으로 생각된다.

본 실험의 결과 비교적 저농도인 BA 0.5mg/L 처

리구에서 한 치상체당 가장 많은 신초가 분화되어서 기 보고된 다른 구근류보다 저농도의 cytokinin 첨가시에 미세증식의 효과가 있는 것으로 나타났다.

정단분열조직으로부터 유도된 신초는 성장조절제를 첨가하지 않은 1/2 MS기본배지에 이식하였을 때 뿌리가 정상적으로 형성되어 완전한 식물체로 발달하였다 (Fig. 3 right).

적요

후리지아 13품종의 정단 분열조직을 MS 기본배지에 2,4-D, NAA (0.1, 0.5, 1.0mg/L), BA (0.5~2.0 mg/L)를 첨가한 배지에 배양하여 미세증식의 가능성을 조사하였다. 정단분열조직으로부터 캘러스 및 신초분화는 2,4-D와 BA를 조합한 배지보다 NAA와 BA를 조합한 배지가 양호하였으며 MS 기본배지에 0.5mg/L NAA와 1.0mg/L BA를 첨가한 배지에서 가장 양호하였다. 공시한 13 품종 중 Golden yellow 품종이 캘러스 형성을 및 신초분화율이 양호하였고 캘러스로부터 multiple shoot 형성에는 BA 0.5mg/L를 첨가하였을 때 절편체 당 25.1개로 가장 많은 수의 신초가 분화되어 미세증식의 효과가 있었다. 유도된 신초는 1/2 MS 기본배지에서 정상적으로 뿌리가 분화되었으며 완전한 식물체로 발달하였다

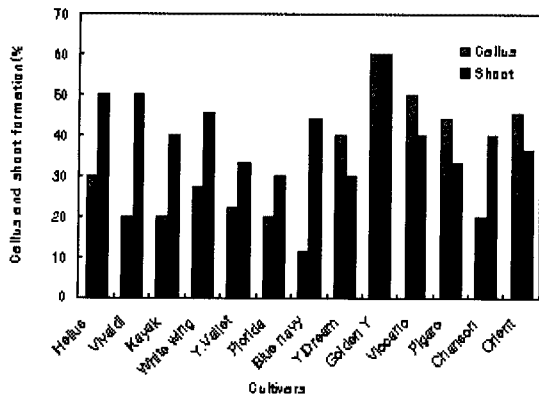


Fig. 1. Different response of cultivars on callus and shoot formation. The cultures were maintained on MS medium with 0.5mg/L NAA and 1.0mg/L BA for 30 days.

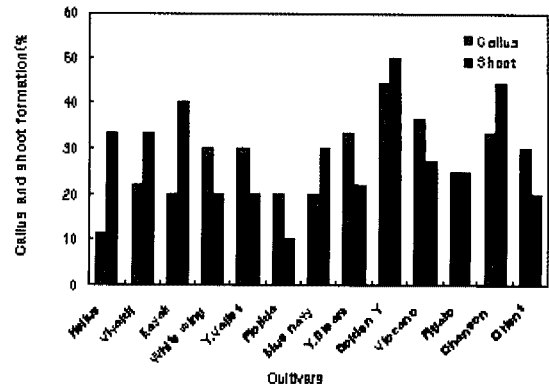


Fig. 2. Different response on callus and shoot formation by individual cultivars. The cultures were maintained on MS medium with 0.1mg/L 2,4-D and 1.0mg/L BA for 30 days.

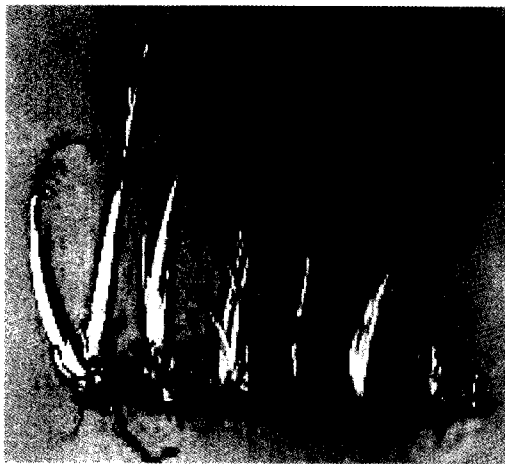


Fig. 3. Plant regeneration from corm apical meristem cultures of *Freesia refracta* 'Golden Yellow': left; Dissected multiple shoots from one corm apical meristem after 60 days of culture on MS with 0.5mg/L NAA and 1.0mg/L BA: right; Rooted shoots showing well developed root system. The rooting was carried out on 1/2 MS medium without plant growth regulators.

인용문헌

Chung JD, CK Chun, YK Suh, EM Rhee. 1983. In vitro propagation of *Hyacinthus orientalis* L. J. Kor. Soc Hort. Sci. 24(2): 162-168

Chung JD, CK. Chun, EM Rhee. 1984. In vitro propagation of *Hyacinthus orientalis* L. J. Kor. Soc Hort. Sci. 25(1): 72-79

Han BH, SL Choi, HY Jong. 1998. In vitro propagation of *Guzmania* cv. Cherry by axillashoot culture. Kor.

J. Plant Tiss. Cult. 25: 33-36

Hosoki T, Sogawa. 1977. Clonal propagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) through tissue culture. HortSci. 12: 451-452

Hosoki T, A Tadashi. 1980. In vitro propagation of narcissus. HortSci. 15:602-603

Kim KW, YS Kim, CH Woo, OH Kim, JS Kim. 1989. Formation of adventitious bud from *Tulipa gesneriana* 'Red Matador' callus. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 30: 157-162

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

Paek KY, CK Chun, JD Chung. 1983. Factors influencing regeneration of bulblets and effect of chilling treatment of parent bulblets on scale segments of Hyacinth in vitro. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 24(1): 68-75

Paek KY, SL Choi. 1982. Studies of clonal propagation

by the culture of bulb scale segments, inflorescence stem and flower-bud in Hyacinth. *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* 9: 47-55

Pennazio S. 1975. Effect of adenine and kinetin on development of carnation tips cultured in vitro. *J. Hort. Sci.* 50: 161-164

Yoshio N. 1979. Studies on vegetative propagation tulip. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 48: 99-105