

## 인편의 Thidiazuron처리에 의한 나팔수선의 기내증식

이병기 · 김영숙\* · 박병모  
전북대학교 원예학과

### In Vitro Propagation of *Narcissus pseudonarcissus* by Scale Cultures Using Thidiazuron

Byung Ki LEE, Young Sook KIM\*, and Byung Mo PARK

Department of Horticulture, Chonbuk National University, Chonju, 560-756. \*Corresponding author.

This study was carried out to investigate the effect of TDZ (thidiazuron) treatment on propagation in vitro through scale cultures of *Narcissus pseudonarcissus*. Scales with disk (5 to 7 mm in size) were cultured on MS medium containing NAA, BA, and TDZ. Bulbs and shoots were directly formed when scales were cultured on medium containing 5 mg/L NAA and 1 mg/L BA. In addition, combination of 3 mg/L NAA and 0.02 mg/L TDZ promoted effectively the direct formation of bulbs and shoots. The shoots were rooted when cultured on medium containing 5 mg/L NAA and 0.02 mg/L TDZ. When scales obtained from regenerants were cultured on medium containing 1.0 mg/L NAA and 0.5 mg/L TDZ, they gave rise to numerous bulbs and shoots. The overall results suggest that TDZ is an effective plant growth regulator in vitro propagation of *N. pseudonarcissus*.

**Key words:** bulb formation, scale culture

수선화는 동부 유럽, 지중해연안과 중국, 한국, 일본 등지에 분포되나 원예상 재배되고 있는 것은 주로 유럽원산의 것이 대부분이고 그 종류도 20-30종에 달한다. 수선화의 번식은 분구법으로 하고 있고 특별한 품종에서만 종자번식으로 한다. 또한 분구에 의한 번식률은 낮은 편이며 기내배양에 의해서도 번식이 가능한 것으로 보고된 바 있다 (Seabrook et al., 1976).

TDZ(Thidiazuron)은 식물에 처리하면 에틸렌이 방출되어 잎의 노화를 촉진시키는 diphenylurea (DPU)형의 시토키닌과 유사한 식물생장조절제로서 1976년에 목화의 고엽제로 등록되었으며 조직배양시 배지에 첨가하면 캘러스의 생장을 증진시키고 기관분화를 유도하는 것으로 알려져 왔다. 그 후 목본식물, 초본식물 및 화훼식물의 기내배양배지에 첨가하면 신초증식 및 기관분화에도 효과가 있음이 알려졌는데 고무나무(Fiola et al., 1990)에서는 기관분화에 TDZ이 BA나 zeatin보다 효과적이라고 하였고 Fasolo 등(1989)도 사과나무의 기관분화를 위한 실험에서 신초유기에 같은 결과를 보고하였다. 최근에는 종자의 자엽으로부터 체세포배를 유기하기 위하여 TDZ을 처리하였으며(Gray et al., 1993)

Pecan의 자엽과 배축(embryonic axe)으로부터 캘러스유도에 촉진적인 역할을 한다고 하였고(Obeidy and Smith, 1993) 또한 약배양에도 TDZ을 처리하여 그 결과를 보고한 바가 있으며(Lee et al., 1992) 최근들어 기내배양에 TDZ을 사용하는 예가 늘어가고 있는 추세이다. 그러나 아직까지는 구근류의 기내증식에 TDZ을 처리한 보고가 없어 수선화의 TDZ처리에 의한 기내증식의 가능성을 조사하고자 본 실험을 수행하였다.

### 재료 및 방법

본 실험에 사용된 재료는 중앙종묘에서 구입한 대배수선(*Narcissus pseudonarcissus*)계인 Ice Follies품종의 구근을 사용하였다. 재료의 멸균은 구근의 외측인편을 2-4매를 제거한 다음 뿌리부분을 잘라내고 95% 에탄올에 수초간 침지한 후 7% calcium hypochlorite 수용액(W/V)에 10분간 표면살균시켜 멸균수로 3-5회 수세하였다. 접종할 재료는 인편에 disk를 붙여 5-7 mm 길이로 조제하였다. 인편배양배지는

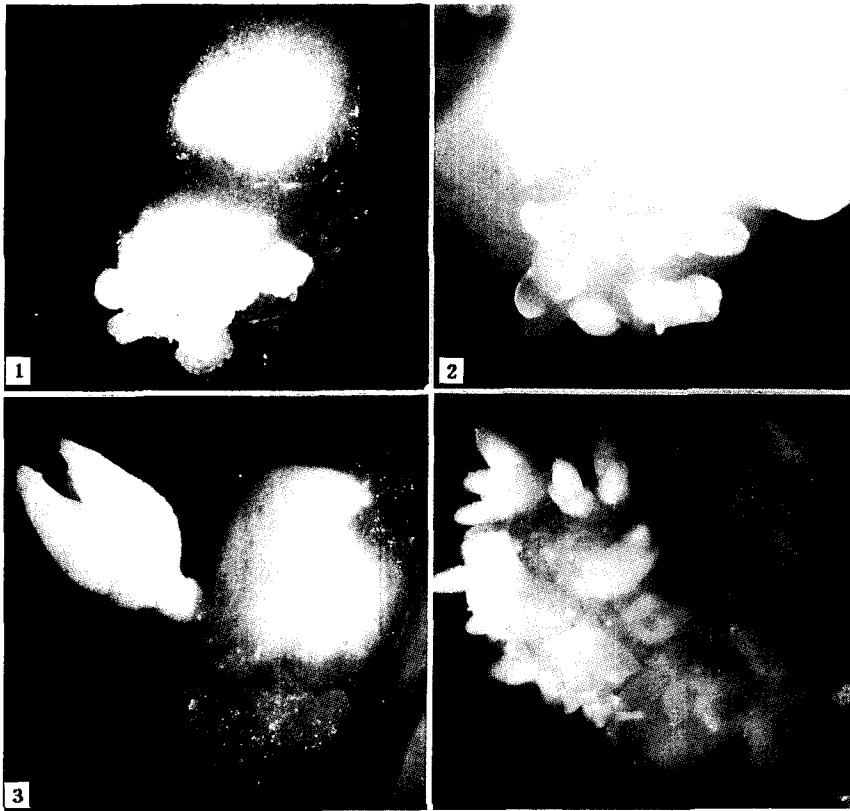


Figure 1. Callus formation on surface of disk after 5 weeks in culture.

Figure 2. Nodular early bulblet formation on surface of disk.

Figure 3. Bulblet formation through scale culture.

Figure 4. Multiple bulblet formation.

MS 기본배지에 성장조절제로서 NAA와 BA는 각각 0, 1, 3, 5 mg/L의 농도로, TDZ는 0.002, 0.02, 0.2 mg/L의 농도로 조합하여 scrose를 30 g/L 첨가하고 한천은 8 g/L 넣은 배지를 10 ml씩 분주한 시험관에 조제한 재료를 3개씩 10반복으로 접종하였으며 접종 후 1600 lx의 형광등하에서 명배양하였다. 배양 5개월 후에 자구의 형성 및 직접 형성된 신초수를 조사하였으며 형성된 자구와 신초의 기관 재분화를 위하여는 NAA(0.1, 0.5, 1, 5 mg/L), BA(0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/L), kinetin(0, 0.1, 0.5, 1 mg/L) 및 TDZ(0, 0.002, 0.02 mg/L)을 조합한 배지에 계대배양하였고 배양 4개월 후에 기관 재분화 양상을 조사하였다. 한편 다량증식에 미치는 시토키닌의 영향을 조사하고자 기내배양에 의해 유기된 수선화의 인편, 신초 및 자구를 이용하여 NAA를 1 mg/L로 고정하고 BA, kinetin 및 TDZ을 0, 0.5, 1 mg/L의 농도로 조합한 배지에 접종하여 신초 및 자구형성을 조사하였다.

### 결 과

#### 인편배양에 미치는 성장조절제의 영향

기부를 붙인 인편을 배양하여 5개월 후에 자구의 형성 및 직접 형성된 신초수를 조사한 결과는 Table 1과 같다. 기부

를 붙인 인편은 배양 일주일경부터 인편부분이 조금씩 팽대하기 시작하였으며 배양기간이 경과함에 따라 disk부분도 팽대하면서 배양 4주일경에는 disk의 표면에서 비교적 단단한 모양의 캘러스가 생기기도 하였다(Figure 1). 배양 2개월 후 자구는 비대한 disk부분에 작은 돌기모양으로 형성되어(Figure 2) 점차 커가는 양상으로 한 치상체 당 한개 혹은 여러 개의 자구가 형성되기도 하였으며(Figure 3, 4) 신초의 분화도 자구와 비슷한 양상으로 치상체의 disk부분에서 한

Table 1. Effects of growth regulators on direct bulb formation through scale culture of *Narcissus pseudonarcissus* after 5 months in culture.

Growth regulators (mg/L)			No. of bulb /explant	Callus formation	No. of shoots /explant
NAA	BA	TDZ			
0	0	0	0.10 ± 0.02 <sup>a</sup>	-. <sup>b</sup>	-
1	0	0	0.26 ± 0.01	+	0.23 ± 0.02
1	5	0	0.21 ± 0.01	-	-
3	3	0	0.63 ± 0.02	++	0.13 ± 0.01
5	1	0	1.11 ± 0.23	-	1.39 ± 0.03
1	0	0.2	0.69 ± 0.04	+	0.07 ± 0.01
3	0	0.02	0.74 ± 0.03	-	0.58 ± 0.01
5	0	0.002	0.64 ± 0.20	+	0.03 ± 0.01

<sup>a</sup>Mean value ± SE for 10 replicates.

<sup>b</sup>-.: No response, +: poor, ++: moderate.

개 혹은 다수의 신초가 직접 형성되었는데(Figure 5) 자구의 형성 및 신초의 분화는 5.0 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA를 첨가했을 때가 가장 양호한 것으로 나타났다. Takashi와 Tadashi (1980)는 수선화의 기내배양 시 1.0 mg/L NAA와 5.0 mg/L를 첨가한 배지에서 화경과 자방을 집중했을 때는 가장 양호한 반응을 보였지만 disk를 배양한 것은 전혀 반응이 없음을 보고하였다. 본 실험의 disk를 붙인 인편배양에서는 1.0 mg/L NAA와 5.0 mg/L BA를 첨가한 배지에서보다 NAA를 5.0 mg/L의 고농도로 첨가했을 때가 양호한 반응을 보여 서로 다른 결과를 나타냈는데 이러한 결과는 배양한 치상체의 조직에 따라 반응이 서로 다르게 나타난 것이라고 사료된다. 한편 5.0 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA를 첨가한 배지를 제외하고는 NAA 단독이나 NAA와 BA를 여러 농도로 조합한 다른 배지에서는 NAA와 TDZ을 조합한 배지에서보다도 비교적 빈약한 반응으로 자구형성 및 신초분화가 저조한 편이었는데 전반적으로 자구의 형성 및 직접적인 신초유기는 NAA와 BA를 조합했을 때 보다도 NAA와 TDZ을 조합했을 때가 비교적 양호한 반응을 보였다.

식물조직배양에서 식물체의 기관분화에 미치는 가장 결정적인 요소는 생장조절제인 시토키닌과 옥옥신이며 이 물질의 농도 비율에 의해서 기관형성의 정도가 달라진다. 일반적으로 뿌리형성을 유도하거나 캘러스 증식을 하고자할 때는 고농도의 옥옥신과 저농도의 시토키닌을 조합하고 신초의 유기 및 성장에는 저농도의 옥옥신과 고농도의 시토키닌을 첨가하는 것이 효과가 있는 것으로 알려져 왔는데 본 실험에서는 비교적 고농도의 옥옥신과 저농도의 시토키닌을 조합했을 때가 옥옥신 단독처리나 저농도의 옥옥신과 고농도의 시토키닌을 첨가했을 때보다 신초 및 자구의 형성에 양호한 반응을 보였는데 이는 배양할 재료나 식물의 조직편에 따라서 생장조절제의 효과가 다르기 때문인 것으로 생각된다.

TDZ은 시토키닌과 유사한 생장조절제로서 BA나 kinetin보다 신초증식 및 기관분화에 효과적이라고 하여 최근에 많이 사용되고 있다. 본 실험에서도 시토키닌 중 BA와 TDZ을 NAA와 혼용처리한 결과 NAA와 TDZ을 조합처리하였을 때 비교적 양호한 반응을 보였는데 다른 구근류에 TDZ을 처리한 보고가 없어 구근류의 기관분화에 대한 TDZ처리의 결과를 서로 비교할 수는 없었다. 그러나 다른 조직을 이용하여 TDZ의 효과를 보고한 경우와 비교하여 볼 때 TDZ이 수선화의 기관분화에도 효과가 있음을 알 수 있다. 그 예로 배나무에서는 엽조직으로부터 신초유기를 위한 실험에서 NAA와 TDZ을 조합했을 때가 신초유기에 가장 효과가 있다(Shevreau et al., 1989)고 하였으며 토마토속(Lim et al., 1994)의 배축절편을 이용한 실험에서는 T-7계통의 경우 0.5 mg/L NAA와 0.5 mg/L TDZ을 첨가했을 때 100%의 줄기분화율을 보였고 두릅(Jhang et al., 1994)의 엽병조직을 이용한 배발생 캘러스의 유도 및 체세포배발생에

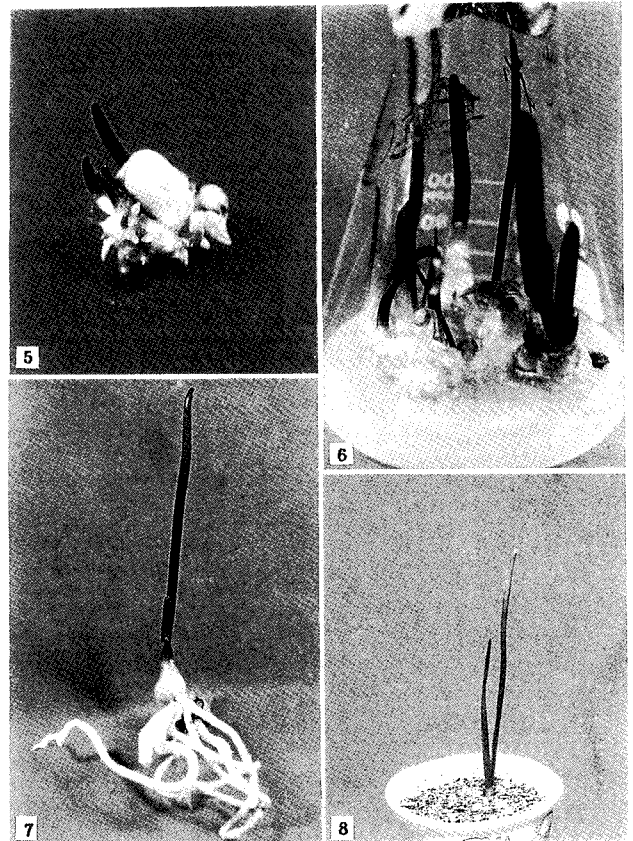


Figure 5. Direct multiple shoot formation.

Figure 6. Differentiated many leaves after subculture in medium containing 0.5 mg/L NAA and 0.002 mg/L TDZ.

Figure 7. Root formation of shoot in medium containing 5.0 mg/L NAA and 0.02 mg/L TDZ.

Figure 8. Acclimated plantlet after 10 months in culture.

Table 2. Effect of growth regulators on organ differentiation in *Narcissus pseudonarcissus* after 4 months in subculture.

Growth regulators (mg/L)				No. of leaves /explant	No. of rooted plants /explant
NAA	BA	Kin	TDZ		
0.1	0	0	0.002	2.36 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.01
0.5	0	0	0.002	1.70 ± 0.01	0.10 ± 0.01
1.0	0	0	0.002	0.75 ± 0.02	0.25 ± 0.02
5.0	0	0	0.002	0.83 ± 0.03	-
0.1	0	0	0.02	1.50 ± 0.04	0.25 ± 0.01
0.5	0	0	0.02	0.33 ± 0.01	0.22 ± 0.03
1.0	0	0	0.02	-	-
5.0	0	0	0.02	1.38 ± 0.04	0.88 ± 0.02
0.1	1.0	0	0	1.29 ± 0.03	0.21 ± 0.01
0.5	0.5	0	0	2.00 ± 0.03	0.13 ± 0.02
1.0	0.1	0	0	1.60 ± 0.02	0.40 ± 0.01
5.0	0.1	0	0	3.00 ± 0.07	-
0.5	0	0.1	0	0.80 ± 0.02	0.20 ± 0.01
1.0	0	0.5	0	0.75 ± 0.03	0.25 ± 0.02
5.0	0	1.0	0	1.33 ± 0.03	0.33 ± 0.01

<sup>a</sup>Mean value ± SE for 10 replicates.

**Table 3.** Effect of cytokinin on organ regeneration from explant of *Narcissus pseudonarcissus* cultured in vitro.

Growth regulators (mg/L)				Explant <sup>a</sup>		
NAA	BA	Kin	TDZ	Shoot (A)	Scale (A / B)	Bulb (B / C)
1.0	0	0	0	-	-	0.15 / 1.0
1.0	0.5	0	0	-	0.85 / 0.31	0.14 / 0.0
1.0	1.0	0	0	0.17	0.75 / 0.0	0.33 / 0.3
1.0	0	0.5	0	0.06	0.67 / 0.0	0.50 / 0.3
1.0	0	1.0	0	0.11	1.00 / 0.2	0.67 / 0.3
1.0	0	0	0.5	0.17	1.54 / 0.4	0.71 / 0.1
1.0	0	0	1.0	-	0.92 / 0.2	0.57 / 0.2

<sup>a</sup>A: No. of bulbs/explant, B: No. of shoots/explant, C: No. of rooted explants.

2,4-D와 TDZ을 혼용처리했을 때가 캘러스유도량과 배발생 캘러스의 빈도가 가장 양호하였다고 하여 여러 조직편을 이용한 실험에서 TDZ의 효과를 인정하여 본 실험과 유사한 경향이였다.

### 신초증식 및 발근유도

인편배양을 통하여 얻어진 자구와 직접 형성된 신초를 완전한 식물체로 성장시키기 위하여 NAA와 여러 종류의 시토키닌을 조합한 배지에 계대배양하여 배양 4개월 후에 신초의 증식 및 발근양상을 조사한 결과는 Table 2와 같다.

계대배양 4주일 후 접종한 자구에서 신초가 성장하기 시작하였으며 하나의 자구에서 신초가 분화되어 여러 개의 잎이 형성되기도 하였고(Figure 6) 신초만 형성된 것을 계대배양했을 때는 배양기일이 지남에 따라 신초가 더욱 성장하면서 자구가 비대되는 경향을 나타냈다. 이러한 경향은 5.0 mg/L NAA와 0.1 mg/L BA를 조합한 배지에서 가장 양호했지만 분화된 유식물체의 발근에는 반응이 나타나지 않아 발근한 식물체가 한 개도 없었는데 0.1 mg/L NAA와 0.002 mg/L TDZ을 조합했을 때에는 신초형성 및 발근에 비교적 양호한 반응을 보였다. 한편 자구가 형성된 신초는 계대배양 45일 후부터 뿌리가 형성되기 시작하였는데 대부분의 뿌리는 비교적 굵고 길게 분화되는 양상이었으며(Figure 7) BA, kinetin보다 0.02 mg/L의 TDZ을 5.0 mg/L NAA와 조합하였을 때가 가장 많은 수의 식물체가 발근하였고 발근된 식물체는 pot에 이식하여 정상적인 식물체로 순화시킬 수 있었다(Figure 8). 이와같이 수선화의 기내배양 시 발근이 되는 양상은 대부분의 식물과 마찬가지로 오옥신:시토키닌의 비율이 높을 경우에는 부정근이 형성되고 그 비율이 낮을 때는 부정아가 생긴다(Skoog and Miller, 1957)는 것과 같은 결과이었다. 한편 토마토속에서 줄기가 분화된 식물체의 발근에는 0.5 mg/L NAA와 0.5 mg/L TDZ이 조합된 배지에서만 가능하였다고 하여 오옥신과 시토키

닌의 비율이 같을 때 발근이 되었다고 하였는데 이것은 식물에 따라 발근에 미치는 성장조절제의 농도가 다르기 때문이라고 생각한다.

한편 기내배양한 식물체의 조직편을 이용하여 기내증식에 미치는 cytokinin의 영향을 조사하고자 NAA와 여러 가지의 cytokinin류를 혼용한 배지에 초기 배양에서 얻어진 식물체의 인편, 신초 및 자구를 접종하였다. 5-7 mm 크기로 접종한 신초절편은 대부분 갈변한 경향이였으나 극히 일부에서만 갈변이 되지 않은 신장한 절편체의 끝부분에서 자구가 형성되었으며 절편체 당 형성된 자구수는 0.06-0.17개로 저조한 반응을 보였다.

비교적 크게 형성된 자구를 메스로 잘라 disk를 붙인 인편을 배양했을 경우에는 신초절편을 배양했을 때보다는 반응이 조금 나은 편이었으며 1.0 mg/L NAA와 0.5 mg/L TDZ을 첨가했을 때 가장 양호한 반응을 보였다. 한편 형성된 자구 중 비교적 적은 크기의 자구를 배양한 것에서도 1.0 mg/L NAA와 0.5 mg/L TDZ 처리구에서 절편체 당 신초분화수가 가장 많았다. 이와같이 신초, 인편 및 자구 등 여러 절편체를 배양했을 때 NAA에 BA, kinetin을 혼용처리한 것보다도 TDZ을 혼용처리한 것이 양호한 반응을 보여 수선화의 기내배양 시 TDZ이 BA나 kinetin보다 효과가 있음이 나타났으며 사과대목의 기내증식을 위한 실험에서도 신초증식률은 0.5 mg/L NAA와 0.2 mg/L TDZ이 첨가된 배지에서 절편체 당 12.1개로 가장 높았다(Lim et al., 1994)고 하여 본 실험의 결과와 유사한 경향이였다. 이와같은 결과로 보아 수선화의 기내배양 시에도 TDZ을 처리하여 기내증식의 가능성이 있음이 인지되었기 때문에 다량증식을 위해서 더욱 세밀한 TDZ처리의 검토가 있어야 할 것으로 사료되었다.

### 적 요

수선화의 기내증식에 미치는 TDZ처리의 가능성을 조사하기 위하여 disk를 붙인 인편을 MS 기본배지에 NAA, BA 및 TDZ을 첨가한 배지에 배양하였다. 인편배양으로부터 자구의 형성 및 직접적인 신초형성에는 5.0 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA가 반응이 양호했고 3 mg/L NAA와 0.02 mg/L TDZ을 혼용처리했을 때에도 비교적 양호한 반응을 보였다. 분화된 유식물의 뿌리형성에는 5.0 mg/L NAA와 0.02 mg/L TDZ이 첨가된 배지에서 가장 양호했다. 기내배양에서 얻어진 식물체의 조직편을 이용하여 기내증식에 미치는 시토키닌의 영향을 조사했던 바 TDZ이 다른 시토키닌보다 효과가 있었고 조직은 인편을 배양했을 때가 자구형성 및 신초분화가 가장 양호했으며 1.0 mg/L NAA와 0.5 mg/L TDZ을 첨가한 배지에서 여러 조직편으로부터 자구형성 및 신초분화가 가장 양호하여서 수선화의 기내증식 시 TDZ처리의

가능성이 있음이 인지되었다.

## 인 용 문 헌

- Chevreau E, Skirvin RM, Abu-Qaoud HA, Kobran SS, Sullivan JG (1989) Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of three pear (*Pyrus spp.*) cultivars in vitro. *Plant Cell Reports* 7: 688-691
- Lee BK, Ko JA, Kim YS (1992) Studies on the thidiazuron treatment of anther culture in *Paeonia albiflora*. *J Kor Soc Hort Sci* 33: 384-395
- Fiola JA, Hassan MA, Swartz HJ, Bors RH, McNicols R (1990). Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on in vitro shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 20: 223-228
- Fasolo F, Zimmerman RH, Fordham I (1989) Adventitious shoot formation on excised leaves of in vitro grown shoots of apple cultivars. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 16: 75-87
- Gray DJ, McColley DW, Michael EC (1993) High-frequency somatic embryogenesis from quiescent seed cotyledons of *Cucumis melo* cultivars. *J Amer Soc Hort Sci* 118: 425-432
- Jhang HH, Park CH, Lee YS, Shin YB (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of *Aralia elata* S. *Kor J Plant Tissue Culture* 21: 167-171
- Lim HT, Lee KS, Yeoung YR, Song YN, Kim JH (1994) Plant regeneration from hypocotyl explants of several species of *Lycopersicon*. *Kor J Plant Tissue Culture* 21: 137-143
- Lim HT, Yeoung YR, Song YN, Han KP, Kim JH (1994) Influence of growth regulators and potassium humate on in vitro multiplication of apple rootstock M.26. *Kor J Plant Tissue Culture* 21: 131-136
- Murashige T (1974) Plant propagation through tissue culture. *Ann Rev Plant Physiol* 25: 135-166
- Obeidy AA, Smith MAL (1993) Organogenesis from mature pecan cotyledons and embryonic axes. *HortScience* 28: 213-215
- Seabrook JEA, Cumming BG, Dionne LA (1976) The in vitro induction of adventitious shoot and root apices on *Narcissus* (daffodil and narcissus) cultivar tissue. *Can J Bot* 54: 814-819
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* 11: 118-191
- Takashi H, Tadashi A (1980) In vitro propagation of *Narcissus*. *HortScience* 15: 602-603

(1994년 12월 15일 접수)