

## 시클라멘(*Cyclamen persicum* Mill.)의 자엽과 엽병배양에 의한 식물체 재분화

은종선\* · 고정애 · 김영선<sup>1</sup>

전북대학교 원예학과 · <sup>1</sup>전북대학교 농촌사회발전연구소

### Plantlet Regeneration by Cotyledon and Petiole Cultures of *Cyclamen persicum* Mill.

Jong Seon EUN\*, Jeong Ae KO, and Young Seon KIM<sup>1</sup>

Department of Horticulture, Chonbuk National University, Chonju, 560-756; and

<sup>1</sup>Institute of Rural Development, Chonbuk National University, Chonju, 560-756. \*Corresponding author.

These experiments were carried out to examine the effect of explant sources and plant growth regulators on callus induction and plantlet differentiation. Cotyledon and petiole explants of *Cyclamen persicum* were cultured on MS medium supplemented with different concentrations of auxins and cytokinins. Cotyledon cultured on medium containing 2,4-D and kinetin did not form callus or shoots. But when calli induced from petiole explants on medium with 1.0 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L kinetin were subcultured on the same medium, the formation of shoots from calli occurred after 150 days of culture. The combination of NAA and BA were more effective than that of 2,4-D and kinetin in the formation of shoots from calli, cotyledon culture was most effective on medium with 0.2 mg/L NAA and 0.5 mg/L BA. Shoots excised from calli were rooted on medium with 1.0 mg/L NAA. The plantlets were subsequently transplanted to potting soil.

**Key words:** callus induction, plantlet differentiation

시클라멘은 분식식물로서 경제적 가치가 높은 구근 화훼류이지만 다른 괴경식물과는 달리 분구나 목자형성을 하지 않기 때문에 자연분구에 의한 번식은 어려우며 영양번식 수단으로서 괴경분할법에 의한 실험이 행해진 바 있으나 (Nakayama, 1980) 주로 종자번식에 의존하고 있는 실정이다. 그러나 종자번식은 유전적으로 heter성이 강하기 때문에 변이체가 발생하여 우량한 개체를 생산하여도 당대에 한정되어 있고, 또한 발아기간이 길어 개화까지 소요기간이 너무 긴 것이 문제점으로 되고 있다.

이러한 문제점을 해결하기 위하여 영양번식에 의한 증식 수단으로서 괴경조직편을 이용한 조직배양이 시작된 후 (Mayar, 1956) 괴경이외의 조직으로 엽병과 화경을 배양하여 shoot를 분화시키거나 (Schwenkel and Grunewaldt, 1987) 접합자배, 자방, 약 등을 배양재료로 하여 체세포배 유도에 적합한 배양절편을 구명하기 위한 실험이 수행되었다 (Kiviharju et al, 1992). 현재 우리나라는 대부분의 종자를 외국에서 수입하여 재배하고 있으며 종자의 가격이 대단히 비싸게 공급되고 있다. 따라서 본 실험은 시클라멘의 기내

급속증식체계를 확립하여 우량종묘의 생산에 필요한 기초 실험으로 캘러스 발생 및 기관분화에 미치는 치상절편 부위별로 생장조절제의 효과를 조사하였다.

#### 재료 및 방법

시클라멘(*Cyclamen persicum* Mill. 'Scarlet')의 종자를 pot에 파종한 후 자엽이 약 1 cm<sup>2</sup>, 엽병의 길이가 1.5-2 cm 정도인 어린 식물체를 95% 에탄올에 수초간 침지한 다음 7% calcium hypochlorite 수용액에 10분간 소독하고 멸균수로 4-5회 수세한 후 자엽은 1 cm<sup>2</sup> 크기의 것을 선별하고 엽병은 0.5 cm의 크기로 절취하여 치상재료로 사용하였다. 배지는 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 auxin류와 cytokinin류를 혼용처리한 후 30 g/L sucrose를 첨가하여 pH 5.8이 되도록 조정하였으며 8 g/L의 한천을 첨가하여 121°C의 고압증기멸균기에서 15분간 멸균하였다. 치상절편은 처음에는 25 ± 2°C에서 암배양하였고 캘러스가 유도된

다음에는 20°C에서 배양하였으며 발생된 shoot는 뿌리를 분화시키기 위하여 NAA와 IAA 단용처리구에 계대배양한 후 2,000 lx의 형광등 조명하에서 배양하였다. 발생된 캘러스는 Carnoy액에 고정한 후 상법에 따라 paraffin 포매한 다음 8-10 μm의 절편을 만들어 hematoxylin으로 염색·검경하였다.

### 결과 및 고찰

#### 캘러스 유도 및 Shoot의 재분화

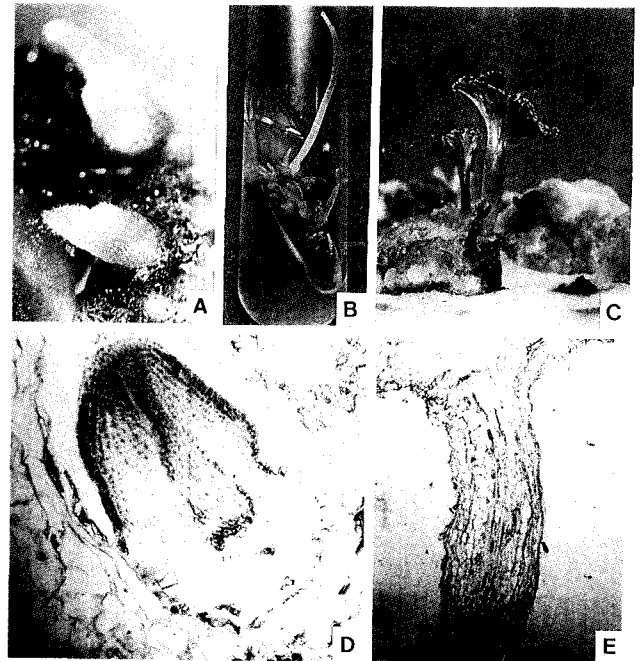
시클라멘의 발아된 자엽과 엽병을 분리, 절취하여 MS 기본배지에 성장조절제의 종류와 농도를 달리하여 치상한 후 절편부위별로 캘러스 유도과 캘러스로부터 shoot 분화에 미치는 성장조절제의 효과를 조사하였다(Table 1). 성장조절제 종류 및 농도에 따라 캘러스 유도 및 shoot 분화에는 많은 차이를 보였는데 2,4-D와 kinetin 혼용배지의 경우 치상한 자엽의 대부분은 치상당시의 상태에서 그다지 변화하지 않은 채 배양 30일까지는 치상 당시의 녹색을 유지하였으나 시일이 경과되면서 차츰 갈변되었다. 이러한 현상은 본 실험 이전에 실시한 예비실험에서도 나타났기 때문에 성장조절제의 농도별 혼용배지는 NAA와 BA 혼용배지에 비하여 갈변된 조직에서 배양기일이 경과되어도 캘러스는 발생하지 않았다.

**Table 1.** Effect of growth regulators on callus induction and shoot differentiation from cotyledon and petiole culture of *Cyclamen persicum* after 180 days of culture.

Growth regulators (mg/L)		Cotyledon			Petiole				
2,4-D	Kinetin	NAA	BA	Explants	Callus	Shoots	Explants	Callus	Shoots
0	0			24	-	-	20	-	-
0.2	0.5			20	-	-	21	7(33.3)	-
1.0	1.0			20	-	-	25	12(48.0)	2(8.0)
2.0	2.0			25	-	-	26	7(26.9)	-
		0.2	0.5	28	21 (75.0) <sup>a</sup>	23 (82.1)	20	-	-
		0.5	0.5	26	21 (80.7)	10 (38.5)	20	-	-
		0.5	1.0	24	20 (83.3)	18 (75.0)	20	-	-
		0.5	2.0	28	18 (64.3)	8 (28.6)	24	12 (50.0)	8 (33.3)
		1.0	0.5	20	8 (40.0)	-	12	1 (8.3)	-
		1.0	1.0	23	6 (26.1)	-	12	-	-
		1.0	2.0	30	8 (26.7)	-	26	15 (57.7)	10 (38.5)
		2.0	0.5	26	10 (38.5)	-	20	5 (25.0)	-
		2.0	1.0	19	8 (42.1)	-	23	4 (17.4)	-
		2.0	2.0	17	6 (35.3)	-	18	5 (27.8)	-

<sup>a</sup>Parentheses indicate percentage to number of explants cultured.

엽병절편에서는 배양 30일 후부터 절단면에서 캘러스가



**Figure 1.** Callus induction and shoot redifferentiation from cotyledon culture. A: after 50 days of culture, B: after 90 days of culture, C: after 120 days of culture, shoot (D) and root (E) redifferentiation from callus.

유도되기 시작하였는데 2,4-D와 kinetin 혼용배지 모두에서 캘러스가 유도되었고 각각 1.0 mg/L씩 첨가배지에서 가장 양호하였으나 shoot는 배양 150일이 경과된 후에야 2개의 절편에서 재분화되어 그 결과는 극히 미미하였다. 그러나 NAA와 BA 혼용배지의 경우 모든 배지에서 캘러스가 유도되었으며 2,4-D와 kinetin 혼용배지에 비하여 초기 배양상태부터 비교적 양호하였는데 치상된 자엽은 배양 14일 후부터 부풀고 약간 신장되면서 엽병이 절단된 부분에서 캘러스가 발생되기 시작하였으며 0.2-0.5 mg/L NAA와 BA가 혼용배지에서 양호한 반응을 보였다. 배양 30일 후부터 이들 캘러스상에서 shoot가 분화되기 시작하였는데, 0.2 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA 혼용배지에서 발생된 캘러스는 비교적 빠른 속도로 증식이 이루어졌고 배양 50일 후에는 1개의 자엽배양에서 multiple shoot가 분화되어 배양 120일 후에는 완전한 자엽과 엽병으로 발달하였는데(Fig. 1A, B, C), 자엽유래의 캘러스로부터 shoot와 뿌리가 분화되는 것을 조직학적으로 관찰할 수 있었다(Fig. 1D, E). 그러나 이들 shoot로부터 신장된 자엽과 엽병은 배양 180일이 경과되어도 뿌리분화는 관찰되지 않았으며 치상절편에서 직접 shoot 분화가 이루어지지 않고 캘러스로부터 shoot가 분화되었는데 비교적 많은 배양기일이 요구되었다. 엽병절편에서 NAA와 BA 혼용배지의 경우 자엽에 비해 약간 저조하였으나 배양 7일 후부터 절단면이 캘러스화되면서 조직이 부풀기 시작한 후 점차 절편 전체가 캘러스화되었으며 배양 90일까지 계속 캘러스

Table 2. Effect of NAA and IAA on root formation from shoots of *Cyclamen persicum* after 90 days of culture.

Growth regulators		No. of shoot subcultured	No. of shoot producing root
NAA	IAA (mg/L)		
0		15	-
0.2		15	-
0.5		15	8 (53.3) <sup>a</sup>
1.0		15	10 (66.7)
2.0		15	8 (53.3)
5.0		15	-
	0.2	15	5 (33.3)
	0.5	15	7 (46.7)
	1.0	15	-
	2.0	15	-
	5.0	15	-

<sup>a</sup>Parentheses indicate percentage to number of shoots subcultured.

만 증식되었는데(Fig. 2A, B), 0.5 mg/L NAA와 2.0 mg/L BA 혼용처리구에서 가장 양호하였다. 캘러스로부터 shoot 분화는 배양 90일 후부터 분화되기 시작하여 신장되었으며(Fig. 2C, D) 자엽에 비하여 shoot분화수와 증식속도가 비교적 느린 편이었다.

### Shoot로부터 뿌리분화

Auxin과 cytokinin의 혼용배지에서 엽병을 배양한 결과 단 몇개체에서만 뿌리가 배양 180일 후에 발생되었고 shoot의 재분화 후 계속 multiple shoot만 이루어졌기 때문에 재분화된 shoot로부터 뿌리가 형성된 완전한 식물체를 얻기 위하여 NAA와 IAA 단용처리구에 shoot를 계대배양한 후 뿌리형성률 및 뿌리형 후 shoot의 생장을 관찰하였다(Table 2). 계대배양 20일경에 1.0 mg/L NAA 처리구에서 처음으로 뿌리의 형성이 관찰되었으나 0.5-2.0 mg/L NAA 첨가구에서의 뿌리형성률 및 성장속도는 거의 비슷한 양상이었는데 특히 1.0 mg/L 첨가구에서 가장 좋은 반응이었다. 그러나 2.0, 5.0 mg/L NAA가 첨가된 고농도구에서는 재분화율이 저조하였고 생육도 더딘 편이었다. IAA 첨가구의 경우 뿌리발생 시기는 비교적 느린 편으로 0.2-0.5 mg/L 첨가배지에서 배양 50일이 경과된 후에야 발생되었고 나머지 처리구에서는 전혀 분화되지 않아 NAA 첨가배지가 효과적이었다.

한편 발근된 shoot의 성장상태를 관찰하였는데 발근되지 않은 shoot에 비하여 신초의 생장이 빨랐고 줄기나 잎의 투명화 현상도 일어나지 않았으며 유식물들은 대부분 정상적인 생육을 보여 pot에 이식, 순화시킬 수 있었다(Fig. 2E). 시클라멘을 영양번식에 의해 대량증식시키려는 시도는 처음에 괴경에서 부정아와 뿌리를 유도하는 방법이 주로 이용되었는데 괴경의 윗부분을 수평방향으로 절취하고 상처

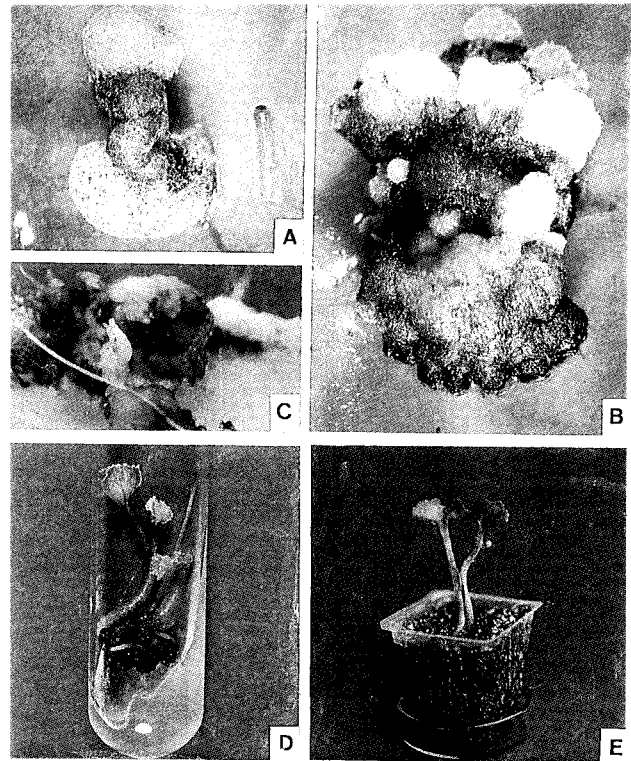


Figure 2. Callus (A: after 50 days of culture, B: after 90 days of culture), shoot redifferentiation(C, D) from callus and plantlet transplanted in pot (E) on petiole explant culture.

를 내어 부정아 형성을 촉진하는 방법을 개발하여 실용기술로서 생산자에게 이용되어왔으나(Nakayama, 1980) 증식효율은 그다지 높지 않다. 조직배양에 의한 연구는 주로 괴경절편을 이용하여 식물체 재분화를 유도하였는데 배지 조성, 생장조절제의 종류와 농도 및 배양온도 등의 최적조건이 여러 실험결과에서 밝혀졌는데(Mayer, 1956; Okumoto and Takabayashi, 1969; Stichel, 1959) adenine은 경엽의 재분화에, NAA는 뿌리형성에 효과적이었으며 배양온도는 20°C가 최적이라 하였다. 본 실험에서도 25°C에서 배양해서 유도된 캘러스를 20°C에서 배양했을 때 shoot의 재분화가 이루어졌으나 일부 25°C에서 계속 배양한 경우에는 전혀 shoot 분화가 없었던 점에서 배양조건은 20°C가 양호하였다. 이것은 시클라멘이 비교적 서늘한 기온에서 잘 재배되는 특성과 일치된다고 생각한다.

또한 시클라멘의 조직배양에 관한 여러 연구결과에서 많은 문제들이 나타났는데 배양재료의 높은 오염률과 낮은 재분화율, 성장점없이 single leaflet만 분화되는 것 등이 조직배양에 의해 식물체를 얻는데 장애요인이 된다고 하였다(Fersing et al., 1982; Geier, 1977). 또한 Morel (1975)은 엽병을 배양하여 캘러스를 유도한 다음 계속적인 계대배양에 의해 증식시켰을 경우 난의 배양에서 볼 수 있는 protocorm과 같은 원괴체가 다수 형성되어 이 원괴체로부터 식물체

가 분화된다고 하였는데 본 실험에서 엽병배양 결과 자엽에 비하여 캘러스 증식이 왕성하게 이루어졌지만 캘러스로부터 shoot의 재분화는 비교적 많은 배양기일이 경과된 후에 이루어졌다. 그러나 최근의 연구결과 시클라멘의 자방, 약과 접합자배를 MS배지에 1.0 mg/L 2,4-D와 10% coconut milk 첨가구에서 배양하였을 때 체세포배가 발생되어 이들 배를 성장조절제를 첨가하지 않은 배지에서 정상적인 식물체로 발아시킬 수 있었다고 하였으나 동시에 배양한 엽병이나 소화경 배양에서 체세포배는 관찰되지 않았다고 하였는데(Kiviharju et al., 1992) 본 실험에서도 자엽과 엽병절편에서 기관의 재분화만 일어났고 체세포배는 전혀 관찰되지 않았다.

조직배양에 의해 영양번식시킬 경우 괴경배양이 완전한 식물체를 얻는데 효과적이지만 괴경에 내재되어 있는 잡균에 의한 오염률이 문제가 되고 있다. 따라서 이러한 오염에 따른 여러 가지 문제점을 해결하기 위한 수단으로 여러 조직절편을 배양재료로 이용하고 있는데 유도된 캘러스에서 shoot와 잎의 재분화만 계속되었기 때문에 발근용 배지에 옮겨 배양해야만 완전한 식물체를 얻을 수 있었다. 시클라멘의 엽신, 엽병절편, 화경배양에서 auxin류와 cytokinin류의 혼용배지에서 재분화된 shoot로부터 출아한 유식물체를 분할하여 0.2 mg/L NAA에 배양할 경우 뿌리가 있는 완전한 식물체를 얻을 수 있다고 하였으며 (Schwenkel and Grunewaldt, 1988), 엽병에서 재분화된 shoot를 0.1 mg/L NAA에 배양하여 뿌리형성을 유도하였고(Murasaki and Tsurushima, 1988), *Meconopsis simplicifolia*의 자엽과 배측배양에서 유도된 shoot를 10  $\mu$ M NAA가 첨가된 배지에서 계속 배양했을 때 뿌리형성률이 가장 양호하다고 하였다(Sulaiman and Babu, 1993). 본 실험의 자엽과 엽병배양에서 재분화된 shoot는 배양기일이 경과되어도 계속 shoot만 재분화되었는데 NAA와 IAA 단용배지에 배양했을 경우 1.0 mg/L NAA 첨가배지에서 뿌리분화가 양호하였다.

## 적 요

조직배양을 이용하여 시클라멘의 급속증식체계를 확립하기 위한 기초실험으로 자엽과 엽병을 auxin류와 cytokinin류가 혼용처리된 MS배지에 배양한 후 캘러스 발생 및 기관 재분화에 미치는 치상절편, 부위별, 성장조절제의 효과를 조사하였다. 절편부위별 효과는 자엽조직이 엽병조직보다 캘러스 및 캘러스로부터 shoot 분화에 좋은 반응을 보였다. 2,4-D와 kinetin 혼용처리구에서 자엽은 전혀 반응이 없었고 엽병절편에서는 2,4-D와 kinetin이 1.0 mg/L씩 혼용배지에서만 캘러스로부터 shoot가 재분화되었다. NAA와 BA 혼용배지의 경우 자엽절편에서는 모든 배지에서 캘러스가 유도되었으며 shoot 재분화는 0.2 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA 혼용

배지에서 가장 양호하였고, 엽병조직은 0.5 mg/L NAA와 2.0 mg/L BA 혼용배지에서 다수의 shoot가 재분화되어 가장 효과적이었다. Shoot로부터 발근에 적합한 NAA와 IAA의 효과를 조사하였던 바 NAA가 IAA보다 뿌리발생에 양호하였고 특히 1.0 mg/L NAA에서 다수의 뿌리가 발생되어 효과적이었다.

## 인 용 문 헌

- Fersing JA, Mouras A, Lutz A (1982) Première étape vers une multiplication végétative industrielle du *Cyclamen* par la culture in vitro. P H M 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
- Mayar 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-t-elle une nouvelle application de la culture "in vitro" l'horticulture. Papiéristes; Horticulteurs. Maraichiers 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 Jap 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