

액체진탕배양에 의한 글라디올러스 'Topaz' 캘러스의 증식

최정두 · 김규원 *

영남대학교 자연자원대학 원예학과

Proliferation of *Gladiolus* 'Topaz' Callus by Liquid Shaking Culture

CHOI, Jeong Doo · KIM, Kiu Weon*

Department of Horticultural Science, College of Natural Resources, Yeungnam University, Kyongsan, 712-749, Korea.

ABSTRACT This study was performed to enhance the proliferation rate of *Gladiolus* 'Topaz' callus. The callus was induced from the cormel tissue explants on MS solid medium with 10 mg/L 2,4-D. In the case of liquid shaking culture, proliferation of the callus was effective in MS medium with 0.05 mg/L 2,4-D at 20°C under 16 hours daylength and in a 100 mL Erlenmeyer flask containing 20 mL of the liquid medium and at 75 rpm in rotation speed of the horizontal shaking culture. Furthermore the callus was also able to be subcultured in the same liquid medium.

Key words: Daylength, 2,4-D, *in vitro* breeding, rotation speed

서 론

글라디올러스의 바이러스 무병주 생산, 급속대량증식 및 기내 육종을 위해서는 캘러스 배양 시스템의 확립이 필요하다 (Kim and De Hertogh 1997). 글라디올러스 캘러스 배양은 Ziv 등 (1970)에 의해 최초로 보고된 이래 캘러스의 유도, 증식 및 재분화에 관한 연구는 최근 국내에서 활발히 수행되고 있다 (Choi and Kim 1997; Kang et al. 1995; Kim et al. 1988; 1991; Kim and Goo 1991; Kim and Kang 1992; Kim and Lee 1993). 그러나, 글라디올러스 캘러스 배양에 관한 지금까지의 연구는 주로 고체배양 위주로 진행되어 왔다. 급속배양 효율성의 향상과 관련하여 액체배양 조건의 구명과 배양 각 단계별 최적 배양환경 및 배지의 선발 등에 관한 연구가 보완된다면 글라디올러스 구근의 국내 생산은 조만간 실현될 수 있을 것으로 전망된다. 특히, 최근에 Kamo (1995)는 글라디올러스 캘러스와 현탁세포에 유전자총을 이용하여 외부 유전자를 도입함으로써 100개 이상의 형질전환체를 선발할 수 있었으며, 이때 형질전환체의 수율은 캘러스에 비해 현

탁세포에서 더욱 높다고 하였다. 따라서 글라디올러스 기내 육종법 확립을 위해서도 액체진탕배양 또는 세포현탁배양법의 개발이 선행되어야 할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 글라디올러스 캘러스의 증식속도 및 작업 효율의 향상을 목적으로 액체진탕배양 조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

식물 재료는 영남대학교 원예학과 실험포장에서 수확된 글라디올러스 (*Gladiolus gandavensis* Van Houtte) 'Topaz'의 목자를 사용하였다. 목자의 소독과 목자 조직으로부터의 캘러스 유도, 유지 및 증식 그리고 캘러스로부터의 재분화는 Choi와 Kim (1997), 획득된 유식물체의 증식은 Kim과 Han (1993) 그리고 유식물체로부터의 소구경 유도는 Goo 등 (1998)의 방법에 따라 각각 수행하였다. 액체진탕배양시의 실험재료는 고체배지에서 계대배양 중인 캘러스를 사용하였다. 캘러스 배양을 위한 기본배지는 sucrose 30 g/L가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962)배지를 사용하였으며 pH는 5.7로 하였다. 고체배양의 경우에는 여기에 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 0.5 mg/L와 한천 7 g/L를 첨가

*Corresponding author. Tel 053-810-2944
E-mail kwkim@ynuucc.yeungnam.ac.kr

하였다. 액체배양의 경우에는 배지를 100 mL 삼각플라스크에 30 mL씩 분주하고 플라스크당 100 mg의 캘러스를 치상하였으며, 각 처리별 플라스크의 수를 5개로 하였다. 기본적인 액체진탕배양을 위해 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 조절된 1,700 lux의 조명하에서 일장은 16시간으로, 회전속도는 100 rpm으로 유지시켰다. 이상을 기본 조건으로 하여 액체진탕배양시 캘러스의 증식 속도에 미치는 각 요인들의 최적조건을 선발하고자 하였다. 이를 위해 MS배지의 무기염 (1/8, 1/4, 1/2, 1배)과 2,4-D의

농도 (0, 0.01, 0.05, 0.5 mg/L), 배양 온도 (15, 20, 25, 30°C), 회전속도 (50, 75, 100 rpm), 일장 (0, 8, 16, 24 시간) 및 배지 양 (100 mL 삼각플라스크에 5, 10, 20, 30, 40, 50 mL)의 영향을 조사하였으며, 아울러 액체진탕배양에 의한 계대배양의 가능성도 조사하였다. 각 처리별 배양 기간은 1개월로 하였으며, 생체중을 측정된 후 최초무게에 대한 배수로써 증식속도를 비교하였다.

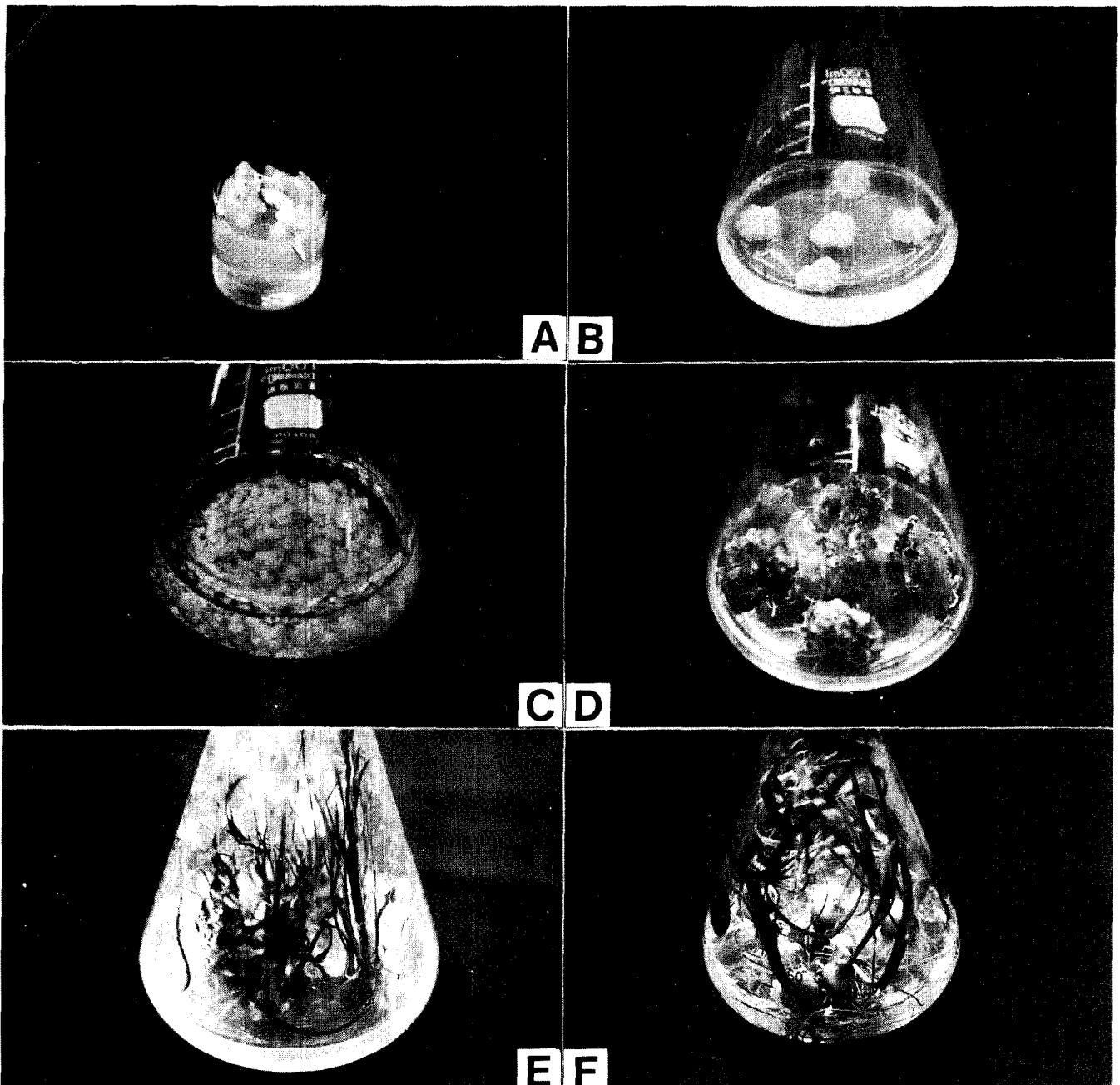


Figure 1. The process of *in vitro* cormlet regeneration through callus culture in *Gladiolus*. (A) Callus induced from the cormlet tissue ($3 \sim 4 \text{ mm}^3$) cultured on MS solid medium with 10 mg/L 2,4-D; (B) Callus subcultured on the MS solid medium with 0.5 mg/L 2,4-D for a month; (C) Callus proliferated in MS liquid medium with 0.05 mg/L 2,4-D for a month; (D) Callus was redifferentiated on the MS solid medium without 2,4-D; (E) Callus-derived plantlets subcultured on MS solid medium with 0.01 mg/L BA for a month; (F) *In vitro* cormlet was formed from shoot base of subcultured plantlet after 3 months.

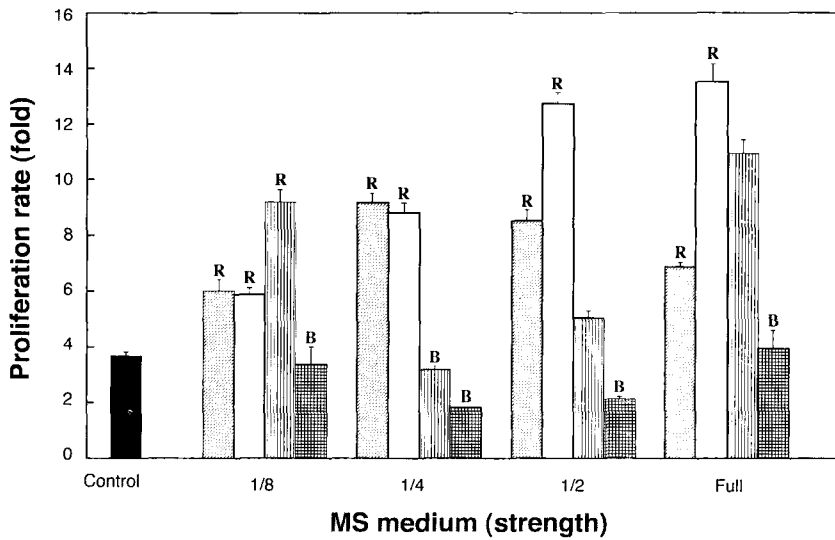


Figure 2. Effects of MS medium strength and 2,4-D concentration on proliferation of *Gladiolus* 'Topaz' callus cultured in a 100 mL Erlenmeyer flask containing 30 mL of medium for a month with horizontal shaking culture. The culture condition was under a fluorescent light (1,700 lux) for 16 hrs at 22±1°C with 100 rpm of rotation speed. The control was cultured on MS solid medium with 2,4-D 0.5 mg/L. The concentrations of 2,4-D were 0 (□), 0.01 (▤), 0.05 (▥), 0.5 mg/L (▧). R: Rooting, B: Browning. Bars indicate standard deviation.

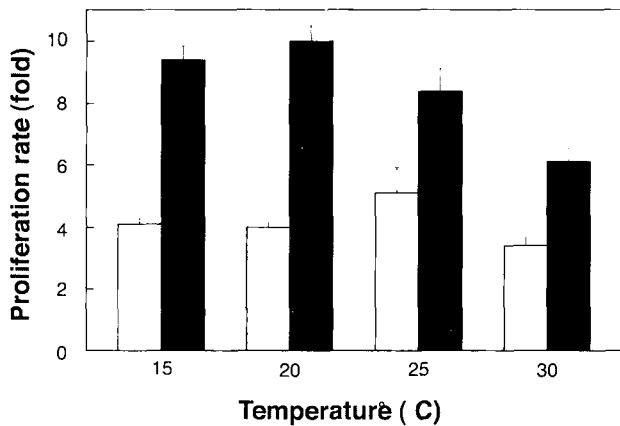


Figure 3. Effect of culture temperature on proliferation rate of *Gladiolus* 'Topaz' callus cultured in a 100 mL Erlenmeyer flask containing 30 mL of medium for a month with horizontal shaking culture. The culture condition was under a fluorescent light (1,700 lux) for 16 hrs with 100 rpm of rotation speed. □ 1/2 MS + 0.05 mg/L 2,4-D (1/2MS 0.05D), ■ Full MS + 0.05 mg/L 2,4-D (FMS 0.05D). Bars indicate standard deviation.

결과 및 고찰

캘러스 배양에 의한 글라디올러스의 기내 소구경 유도 과정은 Figure 1과 같다. 약 3~4 mm³ 크기의 목자 외식체 (explant)를 2,4-D가 10 mg/L 첨가된 MS 고체배지에 치상한 후 2개월간 배양하여 적당량의 캘러스를 유도하였고 (Figure 1A), 유도된 캘러스는 2,4-D 0.5 mg/L가 첨가된 MS 고체배

지에서 4주 간격으로 계대배양하여 유지 및 증식시켰다 (Figure 1B). 캘러스로부터의 재분화는 계대배양 20일째 된 캘러스를 2,4-D가 첨가되지 않은 MS 배지로 이식하므로써 가능하였다 (Figure 1D). 또한, 캘러스로부터 획득된 유식물체는 BA 0.01 mg/L가 첨가된 MS 배지에서 계대배양하여 증식시킬 수 있었으며 (Figure 1E), 계대배양 중인 유식물체를 생장조절물질이 첨가되지 않은 sucrose 9% 배지로 옮기므로써 기내에서 직접 소구경을 형성시킬 수가 있었다 (Figure 1F). 본 실험은 이러한 캘러스 배양과정 중에 액체진탕배양을 이용함으로써 캘러스의 증식 속도를 향상시키고자 하였다 (Figure 1C).

액체진탕배양시 캘러스의 증식속도에 미치는 MS배지 및 2,4-D 농도의 영향을 검토한 결과 (Figure 2), 생체중은 1/2 MS배지+0.01 mg/L 2,4-D 처리구와 기본 MS배지+0.01 mg/L 2,4-D 처리구에서 가장 높았으나 이들 처리구에서는 부정근의 형성이 많아 순수한 캘러스의 증식에는 부적합하였다. 전반적으로 MS배지의 농도에 관계없이 2,4-D가 0.5 mg/L 첨가되었을 때에는 갈변현상이 일어났고, 2,4-D 무첨가구와 0.01 mg/L 첨가구에서는 캘러스의 유지가 어려웠으며 대부분의 캘러스로부터 부정근이 형성되었다. 그러나 1/2 MS배지와 기본 MS배지에 2,4-D를 0.05 mg/L 첨가하였을 때에는 발근 또는 갈변이 일어나지 않고 순수한 캘러스의 증식이 가능하였다. 따라서, 글라디올러스 캘러스의 대량증식을 위한 액체진탕배양은 이와 같이 발근이나 갈변이 일어나지 않으면서 증식속도가 빠른 배지가 효과적일 것으로 판단되었으므로 이후의 실험에서는 1/2 MS배지+0.05 mg/L 2,4-D 처리구 (1/2MS 0.05D)와 기본 MS배지+0.05 mg/L 2,4-D 처리구 (FMS 0.05D)를 선발하여 사용하였다. 선발된 2종의 배지 중 FMS 0.05D에서 1개월 배양된 캘러스는 생체중이 11 g 으로 1/2 MS 0.05D 처리구 5 g에 비해 더 무거웠으며, 이는 최초 생체중의 11배로 1개월 배양 후 최초 캘러스 생체중의 약 4배가 증가한 고체배양법과 비교해 볼 때 증식속도가 3배 정도 향상된 것으로 확인되었다. 또한, 본 실험 결과 액체진탕배양에 의한 캘러스 계대배양시 2,4-D의 적정 농도는 0.05 mg/L로써 0.5 mg/L인 고체배양에 비해 1/10 수준으로 낮다는 것이 확인되었다. 이는 액체진탕배양이 고체배양에 비해 상대적으로 2,4-D의 흡수가 더 잘되었기 때문인 것으로 추정되었다.

앞서의 실험에서 선발된 2 종류의 배지를 사용하여 액체진탕배양시 캘러스의 증식속도에 미치는 배양온도, 회전속도, 일장 및 배지량의 영향을 조사하는 한편, 계대배양의 가능성을

조사하는 한편, 계대배양의 가능성을

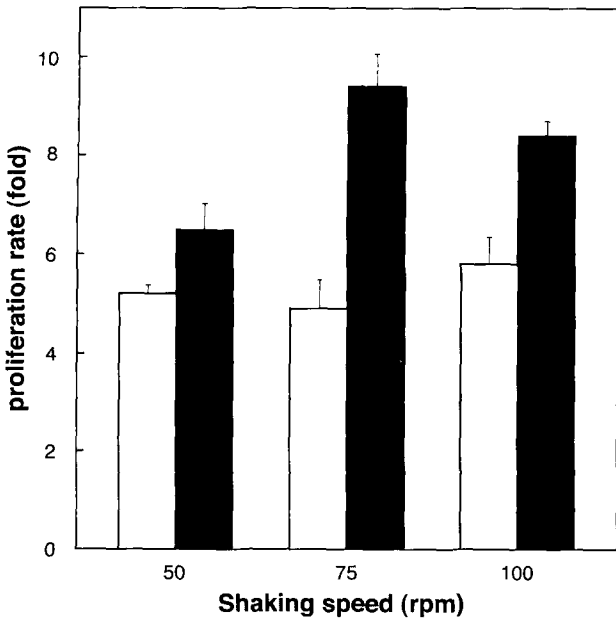


Figure 4. Effect of shaking speed on proliferation rate of *Gladiolus* 'Topaz' callus cultured in a 100 mL Erlenmeyer flask containing 30 mL of medium for a month with horizontal shaking culture. The culture condition was under a fluorescent light (1,700 lux) for 16 hrs at $22 \pm 1^\circ\text{C}$. □ 1/2MS 0.05D, ■ FMS 0.05D. Bars indicate standard deviation.

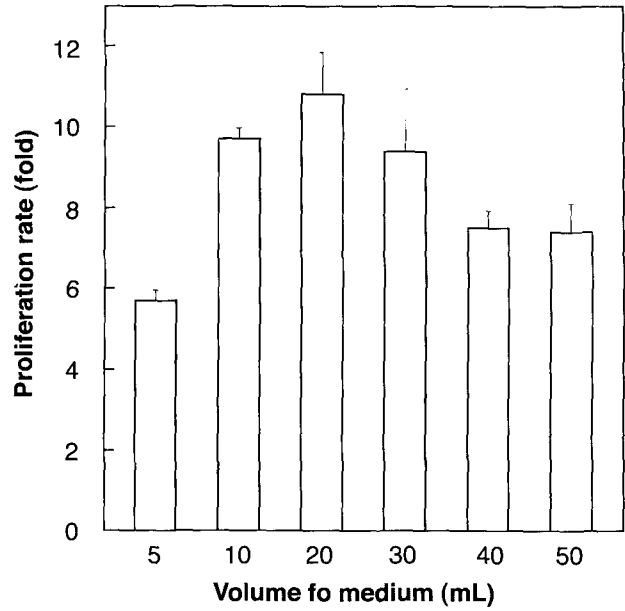


Figure 6. Effect of medium volume on proliferation rate of *Gladiolus* 'Topaz' callus cultured in a 100 mL Erlenmeyer flask containing the medium (FMS 0.05D) for a month with horizontal shaking culture. The culture condition was under a fluorescent light (1,700 lux) for 16 hrs at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ with 100 rpm of rotation speed. Bars indicate standard deviation.

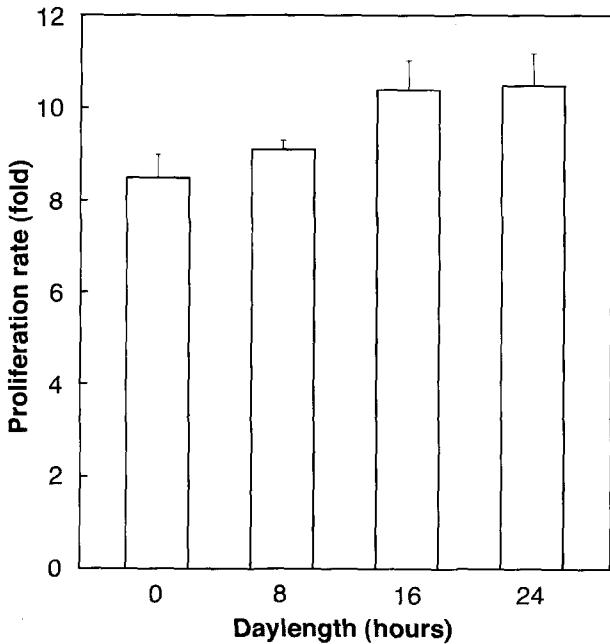


Figure 5. Effect of daylength on proliferation rate of *Gladiolus* 'Topaz' callus cultured in a 100 mL Erlenmeyer flask containing 30 mL of the medium (FMS 0.05D) for a month with horizontal shaking culture. The culture condition was under a fluorescent light (1,700 lux) at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ with 100 rpm of rotation speed. Bars indicate standard deviation.

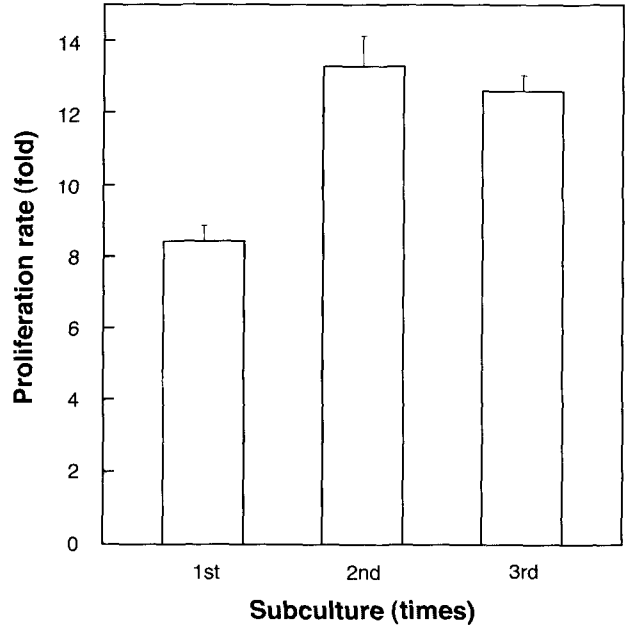


Figure 7. Effects of subculture times on proliferation rate of *Gladiolus* 'Topaz' callus cultured in a 100 mL Erlenmeyer flask containing 30 mL of the medium (FMS 0.05D) for a month with horizontal shaking culture. The culture condition was under a fluorescent light (1,700 lux) for 16 hrs at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ with 100 rpm of rotation speed. Bars indicate standard deviation.

검토하였다. 켈러스의 증식속도에 미치는 배양온도의 영향을 조사한 결과 (Figure 3), 선발된 배지 중에서는 FMS 0.05D가 전반적으로 우수하였으며 또한 배양온도가 20°C 일 때 켈러스

의 증식속도가 가장 빨랐다. 그리고 액체진탕배양시의 회전속도에 있어서도 역시 FMS 0.05D 배지에서 증식 속도가 빠른 경향이었으며 (Figure 4), 그 중에서는 75 rpm으로 배양하였

을 때 증식속도가 가장 빨랐다.

이상의 실험 결과 액체진탕배양시의 켈러스 증식에는 앞서 선발된 두 종류의 배지 가운데에서도 FMS 0.05D 배지가 더욱 효과적이었으므로, 이후의 실험에서는 FMS 0.05D 배지만을 사용하였다. 켈러스 증식에 미치는 일장의 영향을 보면 (Figure 5), 암이나 단일조건에 비해 16시간 이상의 장일조건 일 때 켈러스의 증식이 촉진되는 경향이었다. 따라서 전기로 절감 등 경제적인 측면을 고려하면 16시간으로 배양하는 것이 유리할 것으로 판단되었다. 배지양의 경우에는 배지를 100 mL 삼각플라스크에 20 mL 분주한 후 배양하였을 때 증식속도가 가장 빨랐다 (Figure 6). 액체진탕배양에 의한 켈러스의 계대배양 가능성을 검토한 결과 (Figure 7), 계대배양 1회째에 비해 2회째에 생체중이 현저히 증가하였으며, 3회째에는 2회째에 비해 다소 감소하긴 하였으나 그 차이는 표준오차 범위를 벗어나지 않았다. 따라서 계대배양 회수가 2회 이상부터는 켈러스의 증식속도가 비슷한 수준으로 안정화됨으로써 액체진탕배양에 의해서도 켈러스의 계대배양이 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 실험들을 통해 국내에서는 처음으로 글라디올러스 켈러스의 액체진탕배양 조건을 구명할 수 있었으며, 이는 기존의 고체배양 (Kim et al. 1988; Kim and Goo 1991; Kim and Lee 1993)에 비해 증식 효율을 월등히 향상시킴으로써 글라디올러스 켈러스 배양체계 확립에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단되었다. 특히, Kamo (1995)는 글라디올러스의 켈러스와 현탁세포에 particle bombardment를 이용한 외부 유전자 도입에 성공하였으며, Remotti 등 (1997)은 글라디올러스 'Peter Pears'의 세포현탁배양을 통해 fusaric acid 저항성 cell line을 선발하는 등 기내 육종에 대한 연구가 점차 확대되고 있으므로, 본 실험 결과는 금후 글라디올러스의 기내 육종에도 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 글라디올러스 'Topaz'를 재료로 액체진탕배양에 의한 켈러스의 증식효율을 향상시키기 위하여 수행되었다. 켈러스는 2,4-D 10 mg/L가 첨가된 MS 고체배지에 목자 외식체를 배양하여 유도하였다. 액체진탕배양에 의한 켈러스의 증식은 2,4-D 0.05 mg/L가 첨가된 MS배지를 사용하여 20°C, 16시간 일장하에서 배지를 100 mL 삼각플라스크에 20 mL 분주하고, 수평회전식 진탕배양기의 회전속도를 75 rpm으로 하였을 때 증식속도가 가장 빨랐다. 또한 동일 배지에서 켈러스의 계대배양 역시 가능하였다.

사사 - 본 연구는 농림부 첨단기술개발연구과제의 연구비에 의해 수행된 것 중 일부임.

인용문헌

- Choi JD, Kim KW (1997) Peroxidase activity as a biochemical marker for organogenesis during *Gladiolus* callus culture. J Kor Soc Hort Sci 38:581-587
- Goo DH, Park IS, Kim KW (1998) Effects of low temperature and growth regulators on dormancy breaking of *Gladiolus* comlets produced *in vitro*. J Kor Soc Hort Sci 39:479-482
- Kamo K (1995) Stable transformation of *Gladiolus* using suspension cells and callus. J Amer Soc Hort Sci 120:374-352
- Kang MS, Choi JD, Kim KW (1998) Effects of culture conditions on adventitious bud formation from callus of *Gladiolus* 'Topaz'. J Kor Soc Hort Sci 39:338-342
- Kang MS, Suh SG, Maruta I, Kim KW (1995) Regulation of gene expression by 2,4-D during organogenesis in *gladiolus* cv. Topaz callus. Acta Hort 392:251-256
- Kim KW, Choi JB, Kwon KY (1988) Rapid multiplication of *Gladiolus* plants through callus culture. J Kor Soc Hort Sci 29:312-318
- Kim KW, De Hertogh AA (1997) Tissue culture of ornamental flowering bulbs (Geophytes). Hort Rev 18:87-169
- Kim KW, Goo DH (1991) Sprouting and dedifferentiation of excised *Gladiolus* comel tip *in vitro*. J Kor Soc Hort Sci 32:388-393
- Kim KW, Han, SY (1993) Comlet formation in *Gladiolus* shoot base by growth retardants *in vitro*. J Kor Soc Hort Sci 34:136-144
- Kim KW, Kang MS (1992) Somatic embryogenesis and plant regeneration from *Gladiolus* callus *in vitro*. J Kor Soc Hort Sci 33:87-94
- Kim KW, Kang MS, Goo DH (1991) External and histological characteristics of organogenesis from *Gladiolus* callus. J Kor Soc Hort Sci 32:125-130
- Kim KW, Lee JS (1993) Differences in cultivar on formation and growth of the *Gladiolus* callus *in vitro*. J Kor Soc Hort Sci 34:301-307
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco culture. Physiol Plant 15:473-497
- Remotti PC, Loffler HJM, van Vloten Doting L (1997) Selection of cell-lines and regeneration of plants resistant to fusaric acid from *Gladiolus* × *grandiflorus* cv. 'Peter Pears'. Euphytica 96:237-245
- Ziv M, Halevy AH, Shilo R (1970) Organs and plantlets regeneration of *Gladiolus* through tissue culture. Ann Bot 34:671-676