

## 글라디올러스 'Topaz' 캘러스의 기관형성에 미치는 배양 조건의 영향

최정두 · 변미순 · 김규원\*  
영남대학교 자연자원대학 원예학과

### Effects of Culture Conditions on Organogenesis in *Gladiolus* 'Topaz' Callus

CHOI, Jeong Doo · BYUN, Mi Soon · KIM, Kiu Weon\*

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

**ABSTRACT** This study was carried out to establish improved techniques on organogenesis from callus culture of *Gladiolus*. Organogenesis from the callus was effective in the half strength of MS solid medium without 2,4-D at 15 °C under 24 hours of daylength. Formation of adventitious root was most effective in the liquid shaking culture, and adventitious shoot induction was effective in the liquid stationary culture. From these results, we could find optimal culture conditions for redifferentiation from callus, in addition, liquid shaking culture revealed as more useful when compared with that of solid culture method for the redifferentiation of callus in *Gladiolus* 'Topaz'.

**Key words:** Culture conditions, liquid shaking culture, liquid stationary culture, solid culture, 2,4-D

#### 서 론

Ziv 등 (1970)이 글라디올러스 조직배양에 관해 최초로 보고한 이래 유식물체의 재생경로는 크게 두 가지로 요약되어 왔다 (Kim and De Hertogh 1997). 그 가운데 첫 번째는 시료로부터 바로 부정아를 형성시키거나 정아의 생장을 유도하는 직접적인 방법이며 (Hussey 1975), 두 번째는 시료로부터 캘러스를 경유하여 부정아를 유도하는 간접적인 방법이다 (Kim et al. 1988; Kim and Lee 1993; Choi and Kim 1997; 1999). 이들 두 방법간에는 각각 장단점이 공존하지만 후자의 경우에는 대량증식뿐만 아니라 바이러스 무병주의 획득 (Aminuddin and Singh 1985; Simonsen and Hildebrandt 1971) 및 기내 육종 (Kamo 1995; Remotti et al. 1997)을 위한 매우 유용한 기술로 보고되고 있다. 간접적인 방법에 의해 유식물체를 생산하기 위해서는 무엇보다도 캘러스의 유도과 유지 및 증식, 그리고 캘러스로부터의 유식물체 재분화 등 일련의 과정에 대한 최적 배양조건이 확립되어야 한다. 글라디올러스 캘러스로부터의 유식물체 획득 과정은 체세포 배

성을 유도하거나 (Kim and Kang 1992; Remotti 1995; Stefaniak 1994), 아니면 부정근 및 부정아의 형성을 유도한 후 유식물체로 발달시키는 방법이 있다 (Kim et al. 1988; Choi and Kim 1997). 글라디올러스 캘러스로부터의 기관형성 순서는 먼저 부정근이 형성된 다음 부정아가 형성되어 하나의 유식물체로 발달한다 (Kim et al. 1991). 이와 관련하여 Kang 등 (1998)은 글라디올러스 캘러스의 부정아 형성에 미치는 배양조건들을 구명한 바 있다. 그러나, 현재까지 부정아 형성에 앞서 캘러스로부터의 부정근 형성에 관한 배양 조건은 충분히 구명되지 않았다.

본 연구는 글라디올러스 캘러스로부터의 부정근 형성에 미치는 배양 환경 및 방법의 효과에 관해 검토하고자 하였다.

#### 재료 및 방법

식물 재료는 영남대학교 원예학과 실험포장에서 수확된 글라디올러스 (*Gladiolus gandavensis* Van Houtte) 'Topaz'의 목자를 사용하였다. 목자 시료의 소독과 시료로부터의 캘러스 유도, 유지 및 증식은 Choi와 Kim (1997)이 행한 방법에 따라 수행하였다. 기본 배지는 sucrose 30 g/L가 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962)배지를 사용하였으며, 고체배양

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

의 경우에는 여기에 한천 7 g/L를 첨가하였다. 배양 용기는 실험 목적에 따라 2×10 cm 시험관 또는 100 mL 삼각플라스크를 사용하였다. 배지는 시험관의 경우 8 mL씩 분주하여 각각의 시험관에 25 mg의 캘러스를 치상하였으며 처리당 개체 수는 20개로 하였다. 그리고, 삼각플라스크의 경우에는 30 mL씩 분주하였으며, 플라스크당 100 mg의 캘러스를 배양하여 10 반복하였다. 캘러스로부터의 재분화 실험은 계대배양 20일째의 캘러스를 재료로 하여 캘러스로부터의 재분화에 미치는 MS배지의 농도 (1/8, 1/4, 1/2, 1), 배양 온도 (15, 20, 25, 30°C), 일장 (0, 8, 16, 24시간) 및 배양방법 (고체, 액체정지 및 진탕 배양)의 영향을 조사하였다. 기본적인 배양 환경은 온도 22±2°C, 일장 16시간, 광도 1,700 lux로 하였다. 한편, 액체진탕배양에 의한 캘러스로부터의 유식물체 획득 가능성을 검토하기 위하여 MS배지 (1/8, 1/4, 1/2, 1), BA (N6-benzyladenine) 및 2,4-D (2,4-dichloroacetic acid)의 농도 (0, 0.01, 0.05, 0.1 mg/L)와 재분화와의 관계를 조사하였다. 액체진탕배양시의 회전속도는 100 rpm으로 하였다. 배양기간은 실험 목적에 따라 1~2 개월로 하였다. 실험 결과는 기관형성 일수와 율 그리고 평균기관형성수±표준오차 등으로 나타내었다. 평균기관형성수는 최초 캘러스 25 mg을 치상한 것으로 환산하여 표시하였다.

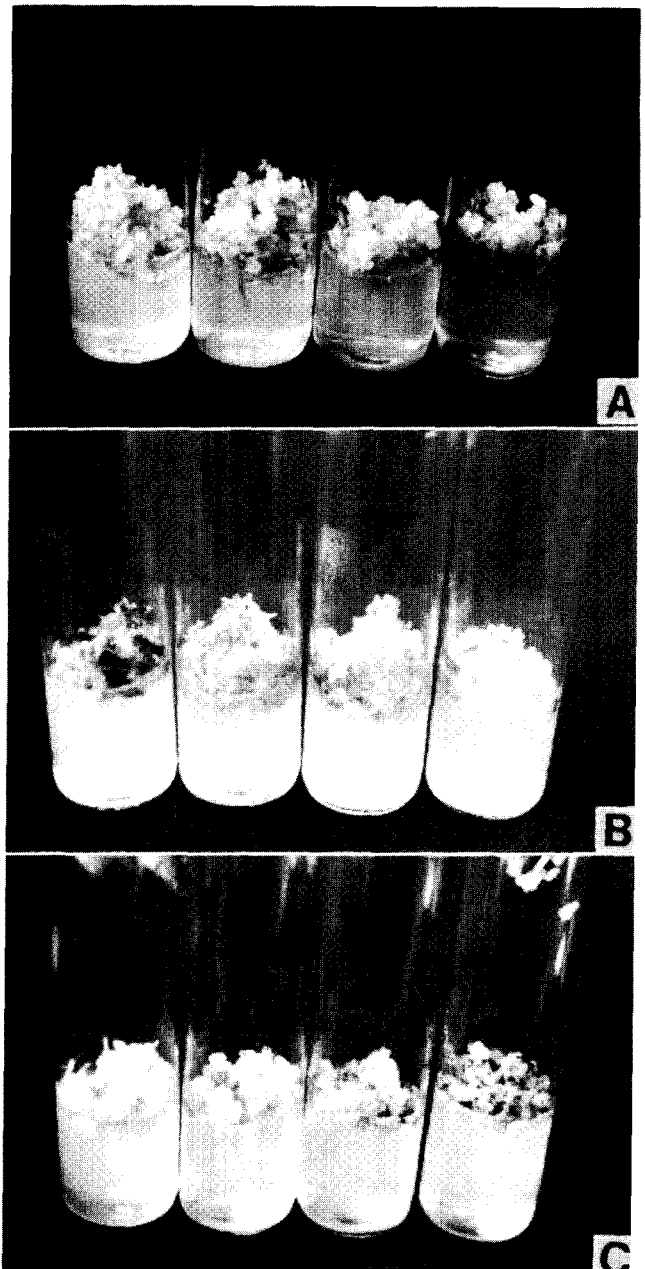
## 결과 및 고찰

글라디올러스 'Topaz' 캘러스로부터의 재분화에 미치는 MS배지 농도의 효과를 검토한 결과 (Table 1, Figure 1-A) MS배지의 농도가 1/2일 때 부정아의 형성율이 90% 그리고 부정근 형성율이 100%로 가장 우수하였으며, 부정근 및 부정아의 형성 정도도 가장 양호하였다. 그러나 1/4과 1/8의 저농도 MS배지에서는 갈변현상이 일어났으며, 이는 배지내의 양분이 조기에 고갈되었기 때문이었던 것으로 추정되었다. 한편, 부정근의 형성이 잘 이루어지는 캘러스는 부정아의 형성도 양호하였다. 캘러스로부터의 기관형성에 미치는 배양온도의 영향을 조사한 결과 (Table 2, Figure 1-B) 부정아의 형성은 온도가 낮을수록 부정아의 형성율이 높았으며, 15°C에서는 형성율이 95%로 가장 높았고, 형성정도도 우수하였다. 그러나, 30°C의 고온에서는 부정아의 형성이 완전히 억제되었다. 글라디올러스 캘러스로부터의 기관형성시에는 배양온도를 20~25°C로 하는 것이 지금까지의 관행이었으나 (Choi and Kim 1997; Kang et al. 1998; Kim et al. 1988), 본 실험 결과 캘러스로부터의 기관형성을 위해서는 배양 온도를 낮추어 줄 필요가 있는 것으로 확인되었다. 금후에는 글라디올러스 이외의 작물에 대해서도 캘러스의 기관형성과 배양 온도와의 관계를 구명해 볼 필요가 있을 것으로 생각되었다. 기관형성에 미치는 일장의 영향은 (Table 3, Figure 1-C) 일장이 길어질수록 부정아 형성이 촉진되는 경향이 있었으며 24시간의 장일

**Table 1.** Effect of MS medium strength on organogenesis from *Gladiolus* 'Topaz' callus cultured for 60 days on solid medium.

MS medium (strength)	Adventitious bud formation		Adventitious root formation		Remark
	%	Numbers	%	Numbers	
Full	70	2.4±0.2 <sup>a</sup>	92	9.5±0.8	-
Half	90	5.1±0.6	100	14.7±2.4	-
Quarter	60	1.3±0.1	100	7.3±0.8	Browning
Eighth	0	0	80	6.2±0.6	Browning

<sup>a</sup> Mean ± standard error.



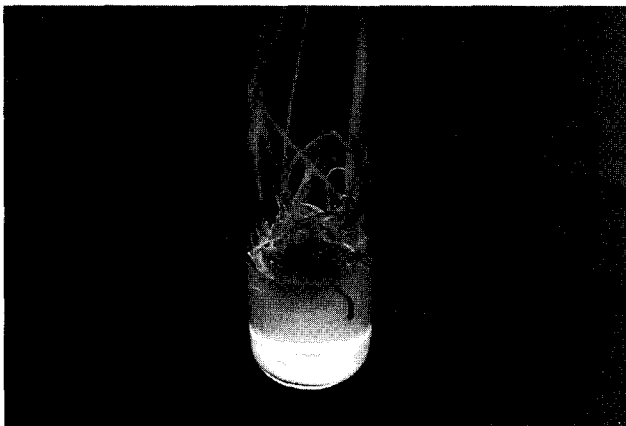
**Figure 1.** Redifferentiation of the adventitious buds and roots from callus as affected by levels of MS medium (A) left→right: full, half, quarter, and eighth strength, culture temperatures; (B) left→right: 15, 20, 25 and 30°C, and daylength; (C) left→right: 0, 8, 16 and 24 hours in *Gladiolus* 'Topaz' cultured for 30 days.

**Table 2.** Effect of culture temperature on organogenesis from *Gladiolus* 'Topaz' callus cultured for 60 days on solid medium.

Temperature (°C)	Adventitious bud formation		Adventitious root formation	
	%	Numbers	%	Numbers
15	95	7.2±0.7 <sup>a</sup>	100	7.8±0.7
20	85	4.5±0.5	100	7.1±0.6
25	60	2.3±0.3	100	9.3±0.9
30	0	0	92	3.6±0.4

<sup>a</sup>Mean ± standard error.**Table 3.** Effect of daylength on organogenesis from *Gladiolus* 'Topaz' callus cultured for 60 days on solid medium.

Daylength (hrs)	Adventitious bud formation		Adventitious root formation	
	%	Numbers	%	Numbers
0	0	0	100	10.5±1.2 <sup>a</sup>
8	50	2.3±0.3	100	7.7±0.7
16	70	4.5±0.5	100	8.1±0.9
24	75	7.1±0.6	80	7.3±0.6

<sup>a</sup>Mean ± standard error.**Figure 2.** Multiple shoots induced from callus of *Gladiolus* 'Topaz' cultured on MS solid medium without 2,4-D for 2 months.

조건하에서 부정아의 형성과 형성정도가 가장 우수하였다. 그러나, 이 처리구에서는 부정근의 형성이 다소 억제적이었다. 한편, 캘러스로부터 형성된 부정아는 일정기간이 경과하면 신초로 발달하였으며 (Figure 2), 일반적으로 캘러스로부터의 부정근 형성이 빨리 이루어질수록 신초 재생 기간도 짧은 경향이였다. 캘러스의 기관형성에 미치는 배양 조건에 관한 이상의 결과들은 앞서 본 실험실에서 보고한 바 있는 연구 결과 (Kang et al. 1998; Kim et al. 1988)와 더불어 글라디올러스 캘러스로부터 유식물체 획득 체계를 확립하는데 기여할 수 있을 것으로 생각되었다.

**Table 4.** Effect of culture methods on organogenesis from *Gladiolus* 'Topaz' callus cultured for 30 days.

Culture type	Adventitious bud formation		Adventitious root formation	
	%	No./25 mg callus	%	No./25 mg callus
Solid	70	1.2±0.1 <sup>a</sup>	100	7.3±0.8
Liquid stationary	80	5.0±0.6	100	8.8±0.8
Liquid shaking	0	0	100	54.4±5.7

<sup>a</sup>Mean ± standard error.**Table 5.** Effect of MS medium strength on adventitious root formation from *Gladiolus* 'Topaz' callus cultured for 30 days with horizontal shaking culture.

MS medium (strength)	Adventitious root formation		
	Days	%	No./25 mg callus
Full	7.0	100	62.2±7.5 <sup>a</sup>
Half	8.0	100	65.1±6.4
Quarter	11.0	100	34.7±4.3
Eighth	16.0	67	29.5±3.6

<sup>a</sup>Mean ± standard error.

배양 방법에 따른 캘러스로부터의 기관형성 정도를 배양 1 개월 후 조사한 결과 (Table 4), 부정아의 형성은 액체정지배양이 고체 또는 액체진탕배양에 비해 우수한 것으로 나타났다. 그러나, 부정근의 형성은 액체진탕배양이 다른 배양법에 비해 월등히 우수하였다. 이상의 실험 결과 액체진탕배양의 경우에는 다른 배양법에 비해 부정근과 엽록소의 형성이 촉진적이었고 부정근 형성일수 및 증식속도도 월등히 빨랐으며 기관-캘러스 혼합체의 생산량도 많았으므로 이에 대한 배양 조건들을 좀 더 보완한다면 유식물체를 대량생산할 수 있을 것으로 판단되었다. 따라서, 이후의 실험에서는 액체진탕배양시 캘러스로부터의 부정근 형성에 미치는 MS배지의 농도 및 생장조절물질의 종류와 농도의 효과를 검토하고자 하였다. 액체진탕배양시 부정근의 형성에 미치는 MS배지의 농도 효과를 비교한 결과 (Table 5, Figure 3-A), MS배지의 농도가 ×1 및 ×1/2일 때 부정근 형성일수가 단축되었고 형성율과 형성정도도 우수하였다. 액체진탕배양시 캘러스로부터의 부정근 형성에 미치는 BA와 2,4-D의 효과를 검토한 결과 (Table 6, Figure 3-B, 3-C), 전반적으로 생장조절물질 무첨가 또는 BA 첨가구에서 부정근 형성이 양호하였다. 특히 BA는 부정근의 생육 및 엽록소 형성에 촉진적이였다. 그러나, 2,4-D는 고체 배양의 경우와 마찬가지로 부정근 형성에 억제적이였다. 이상의 실험을 통해서 글라디올러스 캘러스로부터의 유식물체 획득 조건을 구명하는 한편, 액체진탕배양에 의해 유식물체의 증식 속도를 향상시킬 수 있는 가능성을 발견할 수 있었다. 현재까지 글라디올러스 캘러스로부터의 유식물체 획득은 주

**Table 6.** Effect of BA and 2,4-D on adventitious root formation from *Gladiolus* 'Topaz' callus cultured for 30 days with horizontal shaking culture.

Concentration (mg/L)	Adventitious root formation		
	Days	%	No./25 mg callus
Control (without PGRs)	7.0	100	62.2±7.5 <sup>a</sup>
BA	0.01	7.0	59.4±6.3
	0.05	7.0	54.7±6.1
	0.1	5.7	55.5±6.6
2,4-D	0.01	9.0	52.3±5.8
	0.05	13.0	21.5±3.3
	0.1	-	0

<sup>a</sup> Mean ± standard error.

로 고체배양법에 의존해 왔으며 (Kim et al. 1988; 1991; Remotti 1995; Stefaniak 1994), 액체진탕배양법을 이용한 유식물체 획득에 관한 보고의 예는 전무한 실정이다. 액체진탕배양법은 치상 작업시에 소요되는 노동력을 크게 경감시킬 수 있으며 배양체의 취급이 간편하고 증식속도를 향상시킬 수 있는 기관-캘러스 혼합체를 유도할 수 있으므로 금후 이들 기관-캘러스 혼합체로부터 유식물체의 획득 조건을 구명한다면 캘러스 배양에 의한 글라디올러스의 대량증식을 통해 기내 육종에 크게 기여할 수 있을 것으로 생각되었다.

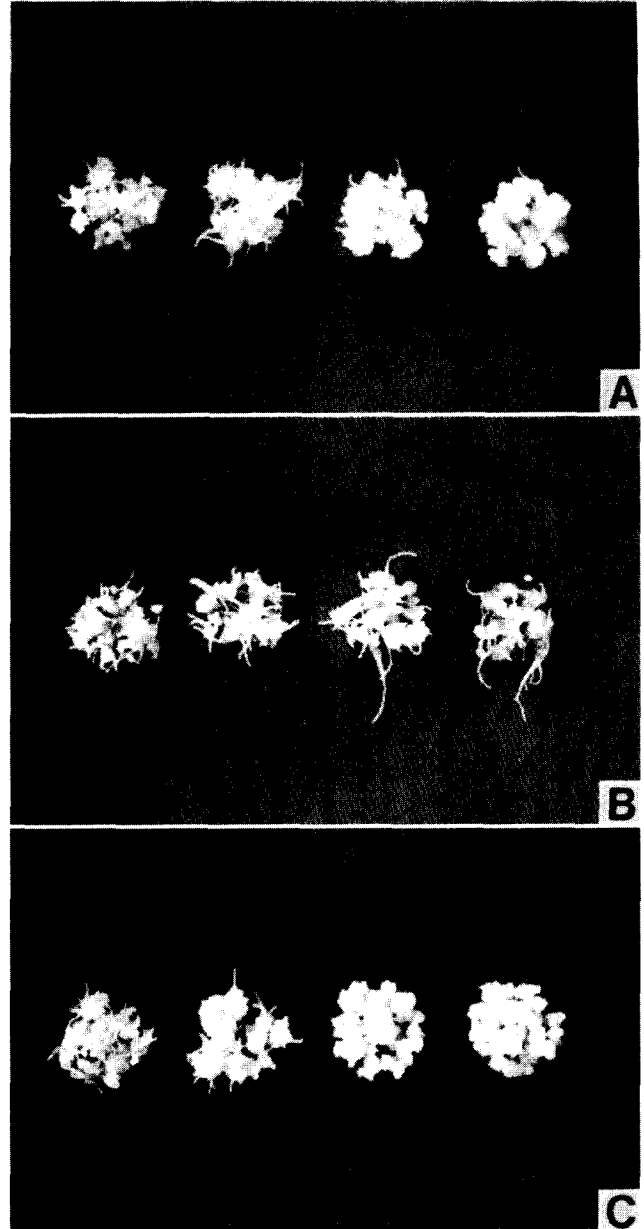
## 적 요

본 연구는 글라디올러스 캘러스로부터의 재분화 조건을 구명함으로써 캘러스 배양시스템을 확립하는데 기여하고자 하였다. 글라디올러스 캘러스로부터의 유식물체 획득은 캘러스를 2,4-D 무첨가 1/2 MS 고체배지에 치상한 후 24시간 일장하에서 15°C로 배양하였을 때 효과적이었다. 캘러스로부터의 기관형성에 미치는 배양방법의 영향을 검토한 결과, 부정근의 형성은 액체진탕배양이 그리고 부정근의 형성은 액체정치배양이 각각 우수한 것으로 확인되었다. 본 실험의 결과를 통해 글라디올러스 'Topaz' 캘러스로부터의 재분화를 위한 최적 배양 조건을 선별하는 한편, 액체진탕배양법에 의해 기관-캘러스 혼합체를 유도할 수 있었으며, 이를 이용하여 기내 유식물체를 대량생산할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

사사 - 본 연구는 농림부 특정과제 연구비 지원에 의해 수행된 연구 중 일부임.

## 인용문헌

Aminuddin M, Singh BP (1985) *In vitro* gladiolus propagation for



**Figure 3.** Effects of MS medium strength (A) left→right: full, half, quarter, and eighth, BA; (B) left→right: 0, 0.01, 0.05 and 0.1 mg/L, and 2,4-D; (C) left→right: 0, 0.01, 0.05 and 0.1 mg/L on adventitious root formation from *Gladiolus* 'Topaz' callus cultured for 30 days with horizontal shaking culture.

virus elimination through tissue culture. *Phytopathological Notes* **38**:375-377

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

Choi JD, Kim KW (1999) Proliferation of *Gladiolus* 'Topaz' callus by liquid shaking culture. *Kor J Plant Tiss Cult* **26**:157-161

Hussey G (1975) Totipotency in tissue explants and callus of some members of the *Liliaceae*, *Iridaceae*, and *Amaryllidaceae*. *J Exp Bot* **26**:253-262

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
- 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, 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** (1995) Primary and secondary embryogenesis from cell suspension cultures of *Gladiolus*. Plant Sci **107**:205-214
- 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
- Simonsen J, Hildebrandt AC** (1971) *In vitro* growth and differentiation of *Gladiolus* plants from callus cultures. Can J Bot **49**:1817-1819
- Stefaniak B** (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration of gladiolus (*Gladiolus hort.*). Plant Cell Rep **13**:386-389
- Ziv M, Halevy AH, Shilo R** (1970) Organs and plantlets regeneration of *Gladiolus* through tissue culture. Ann Bot **34**:671-676

(접수일자 1999년 6월 2일)