

네리네 (*Nerine bowdenii*)의 기내 인편배양시 자구형성에 미치는 생장조절제와 Sucrose 농도의 영향

이승엽*, 안정호, 박윤점
원광대학교 식물자원과학부 생명자원과학연구소

Effects of Growth Regulators and Sucrose Concentrations on the Bulblet Formation through In Vitro Culture of Scale Segment in *Nerine bowdenii*

Seung Yeob Lee*, Jeong Ho Ahn, Yun Jum Park

Institute of Life Science and Natural Resources, Division of Plant Resources Science, Wonkwang University,
Iksan 570-749, Korea

ABSTRACT The twin-scale segments of nerine (*Nerine bowdenii*) were cultured to investigate the influence of NAA, BA and sucrose concentrations on in vitro bulblet formation. The formation of bulblets from twin-scale segments showed a good response both the percentage of bulblet formation and the number of bulblets per explant on MS medium supplemented with 1 mg/L NAA and 2 mg/L BA. Formation of bulblet showed the highest efficiency on medium containing 30 g/L, and the formation of bulblets was strongly inhibited on medium containing over 90 g/L. When the twin-scale segments formed bulblets were subcultured three times to the same medium by 60 day subculture interval, the number of bulblets per explant was 6.5, 7.3 and 8.2 in order of first, second and third. The bulblets over 3 mm in diameter were hypertrophied and rooted after transferring to the hormone-free MS medium. The plantlets over 50 mm in height were successfully acclimatized in the soil mixed with the same volume of vermiculite and perlite, and the survival rate was over 95%.

Key words: Bulblet formation, growth regulator, *Nerine bowdenii*, sucrose, twin scales

서 론

네리네 (*Nerine bowdenii*)는 남아프리카 원산의 수선화과 식물로 *Nerine*란 꽃이름은 그리스 신화 ‘바다의 여신 (Nereid)’에서 유래되었다. 꽃이 아름답고 색채가 다양할 뿐 만 아니라, 개화기간이 길어 유럽, 미국, 일본 등지에서 화단, 분식 및 절화용으로 많이 이용되고 있다. 9월 하순~11월에 5~6개의 가늘고 긴 잎과 30~40 cm의 꽃줄기가 자라며, 끝에 6~8개의 꽃이 달린다. 꽃잎은 6개이고

가장자리가 물결 모양으로 주름이 있으며, 꽃색은 백색, 황백색, 황색, 분홍색, 홍색, 자홍색 등으로 다양하지만 향기는 거의 없다.

네리네의 번식은 종자번식도 가능하지만 개화까지의 기간이 길어 일반적으로 인편을 이용한 영양번식을 한다. 우리나라에서도 일부 연구기관에서 네리네 알뿌리를 수입하여 시험재배하고 있는데, 최근 백합과 같은 수입 구근류의 수입대체를 위한 일환으로 조직배양을 통한 대량번식 체계가 연구되고 있다. *Nerine*의 조직배양은 Grootaarts 등 (1981)에 의하여 처음 보고된 이래, Ziv 등 (1994)은 네리네 성장점 유래 조직을 액체배지에서 바이오리액터를 이용한 대량증식 및 유지에 성공하였다. 국내에서도 구근 화

*Corresponding author Tel 063-850-6665 Fax 063-850-7308

E-mail sylee@wonkwang.ac.kr

해류의 조직배양을 이용한 대량번식 기술이 오래전부터 연구되고 있으나, 네리네의 번식에 관한 연구는 거의 없다. 구근류의 기내번식에 이용되는 치상재료는 인편, 지방, 화탁, 소화경 등이 이용되며, 식물체의 분화과정도 부정아 형성과 체세포 배발생을 통한 번식이 모두 가능하다 (Hussey 1975; Ziv and Lilien-Kipnis 2000). 특히 기내 조직배양을 이용한 대량번식은 자연환경의 제약을 받지 않고 기내의 최적환경에서 원하는 시기에 대량생산이 가능하므로 상업적 이용이 가능한 장점이 있다. 그러나 기내증식된 자구는 개화까지 걸리는 기간이 오래 소요되기 때문에 절화용 구근류의 기내대량증식에 문제가 되었으나, 최근 액체배양을 통한 기내 인편번식에서 개화기간을 단축시킬 수 있다는 연구결과가 보고되어 (Vishnevetsky et al. 2000), 금후 백합, 네리네 등과 같은 수입 구근류의 기내번식 전망을 밝게 하였다.

따라서 본 연구는 네리네의 기내 대량번식을 위하여, 쌍인편 배양에 미치는 성장조절제 및 sucrose 농도의 영향과 1차 배양한 인편의 계대배양에 따른 자구형성능 등을 조사하였다.

재료 및 방법

쌍인편 배양

배양재료는 원광대학교 온실에 재식한 네리네를 12월 중순에 직경 약 3 cm 크기의 인경을 수확하여 사용하였다. 인경의 뿌리와 표피를 제거하고, 70% 에틸알콜에 30초간 표면살균 후 1% sodium hypochlorite 용액에 15분간 침지후, 0.5% sodium hypochlorite 다시 20분간 살균하여 멸균수로 4회 수세하였다. 멸균된 여지로 표면의 수분을 제거한 다음, 뿌리쪽 하부 단축경의 1/2을 제거하고, 메스로 5 mm 높이로 횡단하여 길이 5 mm 크기의 쌍인편을 잘라서 배양하였다. 자구형성 배지는 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 NAA 0, 0.5, 1 mg/L와 BA를 0, 1, 2, 3 mg/L를 각각 혼합한 12종의 배지를 조제하여, 처리당 40절편을 치상하였다. 치상이 끝난 샤레는 랩으로 밀봉하여, 25°C에서 30일간 암배양한 다음, 계대배양 없이 2,000 lux, 25°C 배양실에서 명배양실로 옮겨, 배양 80일째에 자구 형성수를 조사하였다.

또한 쌍인편으로부터 자구형성에 미치는 적정 sucrose 농도를 조사하기 위하여, 균일한 자구가 형성되었던 0.5 mg/L NAA와 1 mg/L BA를 혼합한 MS 배지에 30, 60, 90, 120 g/L sucrose를 첨가하여, 처리당 40절편을 치상하였다. 치상이 끝난 샤레는 같은 조건으로 배양하여 80일째에 자구형성수를 조사하였다.

배지의 멸균은 3% sucrose와 0.3% Gelrite (Sigma chemical Ltd.)를 넣은 후 pH는 autoclave전 5.8로 조절하여 Φ 87×15

mm 샤레에 20 mL씩 분주하였다. 치상 절편수는 샤레당 8 절편×5반복으로 배양하였다.

계대배양

배양 60일 후 쌍인편으로부터 지속적으로 기내 자구를 생산하기 위하여 3 mm 이상의 자구는 hormone-free MS배지로 옮겨 shoot 및 식물체 발달을 유도하였으며, 3 mm 미만의 자구는 비대해진 쌍인편에 붙인 채로 5-7 mm 크기로 다시 잘라 자구형성 효율이 가장 높았던 1 mg/L NAA와 2 mg/L BA를 혼합한 MS배지에 치상하였다. 배양 60일 후에 같은 방법으로 다시 2회 계대배양하였다. 배양은 2,000 lux, 25°C로 명배양하여, 배양 60일째에 각각 계대배양 횟수에 따른 자구 형성율을 조사하였다.

식물체 순화 및 이식

분화된 자구중 3 mm 이상 자란 자구는 성장조절제를 첨가하지 않은 MS배지로 옮긴 다음, 2,000 lux, 25°C에서 명배양하여 초장 5 cm 이상 자란 식물체는 버미큐라이트와 펄라이트를 1:1로 혼합한 상토를 채운 소형 포트에 이식하였다. 포트는 플라스틱 상자 (60×40×20 cm) 에 넣어 저면 관수후, 처음 2일간은 비닐을 덮어 습도를 유지하였고, 3일째부터 공기순환을 위하여 비닐에 직경 50 mm 구멍을 150 mm 간격으로 뚫어 주었으며, 6일째에는 비닐을 제거하여 직사광선이 닿지 않는 그늘에서 2주간 순화시켜 생존율을 조사한 다음 정식하였다.

결과 및 고찰

기내 자구형성에 미치는 성장조절제의 영향

네리네의 쌍인편 배양에 의한 기내 자구의 형성에 미치는 성장조절제의 영향을 조사한 결과 (Table 1), NAA의 농도에 따라 자구형성 반응이 현저한 차이를 보였다. 네리네 쌍인편조직으로부터 기내자구 형성은 auxin과 cytokinin이 첨가되지 않은 배지에서도 가능하였으나, 그 효율은 아주 낮았다. BA 단독첨가 배지에서의 기내자구 형성은 성장조절제를 첨가하지 않은 경우보다 양호하였으나, NAA 단독첨가배지보다는 자구형성이 저조하였다. BA 단독 첨가배지의 경우 2.0 mg/L BA 첨가배지에서 2.8개의 자구가 형성되어 가장 양호하였다. 이러한 결과로 보아 네리네의 자구형성에는 BA보다 NAA첨가가 필수적이었으며, 0.5 mg/L와 1.0 mg/L 첨가에서 자구형성을 및 절편당 자구수 모두 양호하였다. 또한 NAA 단독배지보다는 BA와 혼합배지에서 자구 형성율이 높았는데, 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L

BA, 1.0 mg/L NAA와 2.0 mg/L BA 혼합배지에서 자구형성율이 95.0%와 97.5%, 절편당 자구수는 5.6개와 6.8개로 가장 높게 나타났다. 구근식물의 기내 인편배양에서 기내 자구형성에 미치는 성장조절제의 영향은 식물종 및 품종에 따라서도 상이한 결과를 보이는데 (Lim et al. 1998), *Hippeastrum hybridum*에서는 1~2 mg/L BA 단독 첨가만으로도 자구형성이 잘 이루어지며 (Han et al. 1991), *Lilium longiflorum*에서는 NAA와 BA 혼합배지보다 0.2 또는 2.0 mg/L NAA 단독처리가 효과적이다 (Lee et al. 1995). 또한 *Nerine sarniensis*의 기내 인편배양에서는 0.1 M NAA와 0.5 M BA, 또는 1.0 M NAA와 1.0 M BA 첨가배지에서 싹 및 자구형성이 효과적인 것으로 나타나 (Vishnevetsky et al. 2003), 같은 *Nerine* 속 식물간에도 성장조절 물질의 요구도가 서로 다르다.

한편 본 실험에서 네리네의 자구형성을 위한 NAA와 BA의 첨가비율은 1:2 혼합배지에서 효과적이었다. 이에 따라

NAA와 BA 농도를 달리한 3종류의 1:2 혼합배지에 쌍인편 배양을 한 결과 (Figure 1), 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 혼합배지에서는 자구형성이 비교적 빠른 경향을 보였으나, 1.0 mg/L NAA와 2.0 mg/L BA 혼합배지에서 6.8개로 가장 많은 자구가 형성되었다. 반면 2.0 mg/L NAA와 4.0 mg/L BA 혼합배지에서는 치상된 인편의 비대로 인하여 자구형성이 낮고, 자구의 수도 3.8개로 가장 적었다. *Amaryllis belladonna*의 쌍인편 배양에서는 저농도의 NAA (0.54 μM)와 고농도의 BA (22.2 μM) 첨가배지에서 가장 높은 자구형성율이 보고되었으나(De Bruyn et al. 1992), 대부분 저농도의 NAA와 BA가 효과적이다 (Han et al. 1991; Lee et al. 1995; Lim et al. 1998; Vishnevetsky et al. 2003). 따라서 본 실험의 결과, 네리네의 기내 자구형성에 가장 적합한 성장조절제의 종류와 농도는 1.0 mg/L NAA와 2.0 mg/L BA를 첨가한 배지였다 (Figure 4A).

기내 자구형성에 미치는 sucrose 농도의 영향

네리네의 기내 자구형성에 미치는 sucrose 농도의 영향을 조사한 결과, 30 g/L 이상의 농도에서는 자구수가 감소하는 경향을 보였다 (Figure 2). 120 g/L sucrose 첨가배지에서는 전혀 자구가 형성되지 않았으며, 90 g/L sucrose 첨가배지에서도 평균 0.8개의 낮은 자구형성을 보였다. 일반적으로 기내 자구형성에서 고농도의 sucrose는 자구형성을 억제하지만 형성된 자구의 비대에는 효과적인데 (Niimi and Onozawa 1979; Han et al. 1999), 본 실험에서도 같은 경향을 보여, 네리네의 기내 자구형성을 위한 적정 sucrose 농도는 30 g/L로 판단되었다.

계대배양 횟수에 따른 기내 자구형성 효율

네리네의 기내 자구를 지속적으로 생산하기 위하여, 초기

Table 1. Effect of growth regulators on the formation of bulblet from the twin-scale segments of *Nerine bowdenii*.

Growth regulators ^y		Bulblet formation (%) ^z	No. of bulblet /explant
NAA	BA		
0.0	0.0	70.0±10.5	1.0±0.7
0.0	1.0	37.5± 8.8	1.6±1.1
0.0	2.0	65.0± 5.6	2.8±1.9
0.0	3.0	27.5±16.3	1.0±1.2
0.5	0.0	82.5± 6.8	4.2±1.3
0.5	1.0	95.0± 6.8	5.6±2.1
0.5	2.0	80.0±11.2	3.8±1.3
0.5	3.0	70.0±14.3	3.6±1.1
1.0	0.0	97.5± 5.6	4.8±1.5
1.0	1.0	95.0± 6.8	5.4±1.1
1.0	2.0	97.5± 5.6	6.8±2.2
1.0	3.0	70.0±11.2	4.0±0.7

^yBasal medium was MS medium.

^zPercentage to 40 explants per medium.

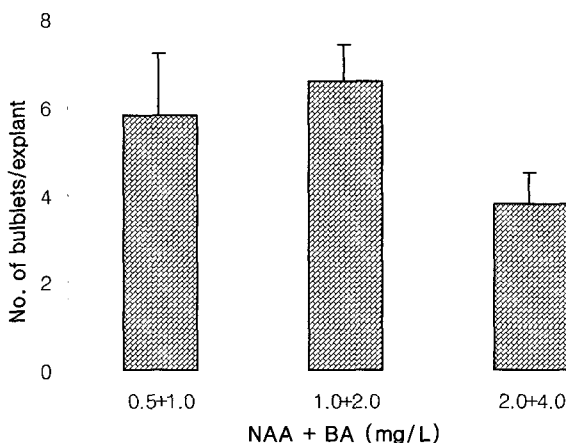


Figure 1. Effect of NAA and BA concentration on the formation of bulblet from the twin-scale segments of *Nerine bowdenii*.

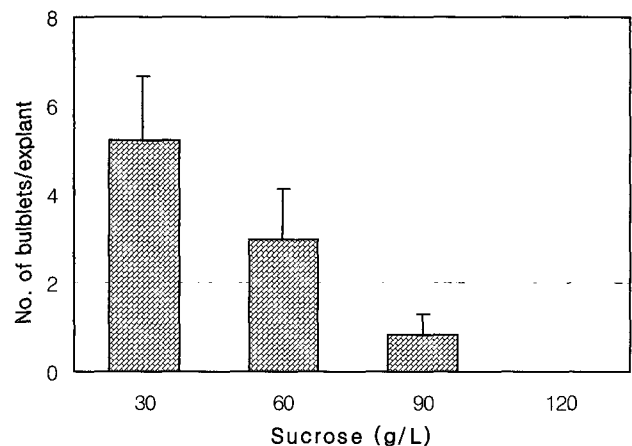


Figure 2. Effect of sucrose concentration on the formation of bulblet from the twin-scale segments of *Nerine bowdenii*.

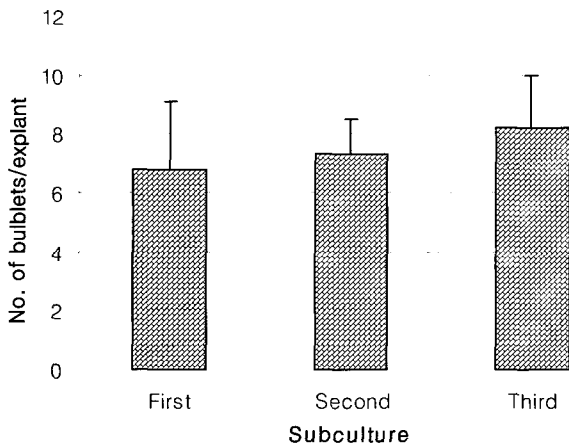


Figure 3. Effect of the number of subculture times (sixty-day intervals) on the formation of bulblet from the twin-scale segments of *Nerine bowdenii*.

배양 쌍인편의 갈변부분을 제거한 다음, 다시 5 mm 크기의 2~4조각으로 분리한 쌍인편을 동일조성의 배지에 계대배양하여 자구형성에 미치는 영향을 조사한 결과, 최초 치상한 쌍인편으로부터 형성된 자구수보다도 2차 및 3차 계대배양한 조직에서 오히려 증가하는 경향을 보였다 (Figure 3). 이러한 결과는 최초 치상한 쌍인편으로부터 형성된 자구의 단축경 부분이 비대하면서 지속적으로 자구가 형성되기 때문이다. 따라서 한번 네리네의 쌍인편을 배양하면, 이를 재료로 지속적으로 기내 자구를 생산할 수 있을 것으로 기대되었다. 네리네의 경우 자구형성은 인편기부의 단축경과 접한 부위의 인편 사이에서 신초가 먼저 형성되고, 이 신초가 자라면서 기부에 인편이 형성되어 소자구로 발달되는데 (Figure 4B), 본 연구에서는 이를 자구로 표현하였다. Grootaarts et al. (1981)은 네리네의 쌍인편 배양에서 신생 자구의 발생 기원은 인편과 단축경의 연결부위라고 하였으며, 백합에서도 기내자구의 분화는 단축경과 접한 부위에서 주로 분화되는 것으로 보고되었다 (Stimart and Ascher 1978). 또한 소자구가 발달된 단축경은 계대배양후 계속 비대해지면서 새로운 자구가 지속적으로 발생되었다 (Figure 4B). 따라서 네리네의 기내에서 비대된 단축경 부분은 기내 자구생산을 위한 배양조직으로 계속 활용할 수 있었으며, 3회 계대배양에 의한 자구 형성능도 양호하였다 (Figure 4C). 특히 네리네 조직배양시 동계 (12월-2월)를 제외한 봄부터 가을에 재료를 채취하여 배양하면 90% 이상 오염이 되는데, 이를 1회 치상으로 해결할 수 있었으며, 또한 *Amaryllis belladonna* (De Bruyn et al. 1992), *Crinum macowanii* (Slabbert et al. 1993), *Lilium longiflorum* (Chung et al. 1995) 몇몇 식물에서와 같이 신생 자구의 인편을 절단하여 배양재료로 이용한다면 기내번식효율을 높일 수 있을 것으로 보인다. 따라서 앞으로 본 연구에서 얻어진 자구들을 이용하여 대량 액체배양 시스템을 확립한다면, 국내에서도 해외에서 네리네 인편을 수입하지 않고도 자체 증식하여

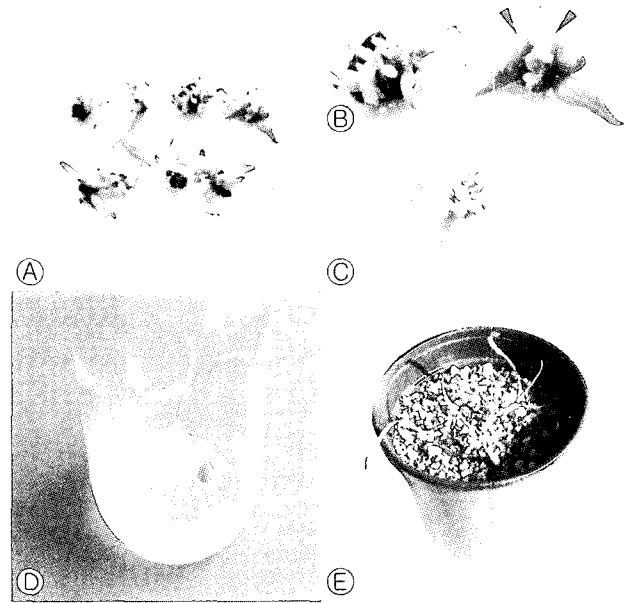


Figure 4. Formation of in vitro bulblets from the twin-scale segments of *Nerine bowdenii*.

- A. Bulblet formation from twin-scale segment in MS medium supplemented with 1 mg/L NAA and 2 mg/L BA.
- B. Adventitious bulblets formed on the basal side of the inner of twin scales (▼).
- C. Explant formed Multi-bulblet in third subculture.
- D. Plantlets growing on the hormone-free MS medium.
- E. Young plants survived in pot after acclimatization.

생산할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 이렇게 생산된 자구는 액체배지를 이용한 최적화 배양을 통하여 최단기간에 기내에서 대량생산할 수 있는 연구를 통하여 (Vishnevetsky et al. 2000; Ziv et al. 1994), 네리네의 기내증식에 의한 개화 소요기간을 실생묘보다 앞당길 수 있을 것이다.

식물체 분화 및 순화

계대배양 과정에서 생산된 3 mm 이상의 자구는 생장조절제를 첨가하지 않은 MS배지로 옮겨 (Figure 4D), 초장 5 cm 이상 자란 식물체들을 버미큐라이트와 펠라이트를 1:1로 혼합한 상토를 넣은 소형 포트에 이식후 순화재배하여 생존율을 조사한 결과, 95% 이상의 생존율을 보였다 (Figure 4E). 이들 생존 식물체들은 토양에 정식후 개화소요 기간을 실생묘와 비교할 계획이다.

적 요

네리네의 인편 배양에 의한 기내 증식을 위하여, 쌍인편으로부터 자구형성에 미치는 NAA와 BA 및 sucrose 농도의 영향을 조사하였다. 네리네의 쌍인편으로부터 기내 자구형성에 가장 적합한 배지는 1.0 mg/L NAA와 2.0 mg/L

BA를 첨가한 MS배지였다. 적정 sucrose 농도는 30 g/L에서 가장 양호하였으며, 90 g/L 이상의 sucrose 첨가배지에 서의 자구형성은 심하게 억제되었다. 비대된 인편을 단축경과 함께 5 mm 크기로 잘라 60일 간격으로 1, 2, 3차 계대 배양한 결과, 절편당 자구수는 6.5, 7.3, 8.2개로 다수의 기내자구를 지속적으로 생산할 수 있었다. 기내 형성된 3 mm 이상의 자구는 성장조절제를 첨가하지 않은 MS배지에 옮겨 60일간 생육시킨 후, 초장 50 mm 이상 자란 식물체를 버미큐라이트와 펄라이트를 1:1 혼합한 배양토에 순화시켰을 때, 생존율은 95% 이상으로 높았다.

사사 - 본 연구는 2003년도 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Chung HJ, Lee EM, Lee YB (1995) Regeneration of bulblets from bulblet derived bulb-scales of *Lilium longiflorum*. Kor J Plant Tiss Cult 22: 89-93
- De Bruyn MH, Ferreira DI, Slabbert MM, Pretorius J (1992) In vitro propagation of *Amaryllis belladonna*. Plant Cell Tiss Org Cult 31: 179-184
- Grootaarts H, Schel JHN, Pierik RLM (1981) The origin of bulblets formed on excised twin scales of *Nerine bowdenii*. Plant Cell Tiss Org Cult 1: 39-46
- Han BH, Kim JS, Paek KY (1991) Effect of growth regulators on the bulblet formation through twin-scale segment culture in *Hippeastrum hybridum* 'Red Lion'. Kor J Plant Tiss Cult 18: 355-360
- Han BH, Yae BY, Goo DH, Go JY (1999) Effect of inorganic salts in MS medium, sucrose, and activated charcoal on bulblet formation from *in vitro* bulb scales in *Lilium oriental* Hybrid 'Casa Blanca'. Kor J Plant Tiss Cult 26: 103-107
- Hussey G (1975) Totipotency in tissue explants and callus of some members of the *Liliaceae*, *Iridaceae*, and *Amaryllidaceae*. J Exp Bot 26: 253-262
- Lee EM, Chung HJ, Min BH, Lee YB (1995) Effects of growth regulators on shoot differentiation and bulblet formation in shoot-tip and bulb-scale cultures of *Lilium longiflorum*. Kor J Plant Tiss Cult 22: 83-87
- Lim S, Seon JH, Son SH, Han BH, Paek KY (1998) Effect of explant sources and plant growth regulators on bulblet formation in *Lilium*. Kor J Hort Sci 39: 111-114
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-497
- Niimi Y, Onozawa T (1979) In vitro bulblet formation from leaf segment of lilies especially *Lilium rubellum* Barker. Sci Hort 11: 379-389
- Slabbert MM, De Bruyn MH, Ferreira DI, Pretorius J (1993) Regeneration of bulblets from twin scales of *Crinum macowanii* in vitro. Plant Cell Tiss Org Cult 33: 133-141
- Stimart DP, Ascher PD (1978) Tissue culture of bulb-scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. Amer J Hort Sci 103: 182-184
- Vishnevetsky J, Zamski E, Ziv M (2000) Carbohydrate metabolism in *Nerine samiensis* bulbs developing in liquid culture. Physiol Plant 108: 361-369
- Vishnevetsky J, Zamski E, Ziv M (2003) Enhanced bud and bulblet regeneration from bulbs of *Nerine samiensis* cultured in vitro. Plant cell rep 21: 645-650
- Ziv M, Kahany S, Lilien-Kipnis H (1994) Scaled-up proliferation and regeneration of *Nerine* in liquid cultures Part I. The induction and maintenance of proliferating meristematic clusters by paclobutrazol in bioreactors. Plant Cell Tiss Org Cult 39: 109-116
- Ziv M, Lilien-Kipnis H (2000) Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes *in vitro*. Plant Cell Rep 19: 845-850

(접수일자 2003년 11월 26일, 수리일자 2004년 6월 11일)