과제구분	기본연구	수행시기		전반기		
연구과제 및 세부과제명		연구분야	수행 기간	연구실	책임자	
1	원보존 및 대량생산을 배양 체계 확립	· 화훼 '16~'18		농업기술원 선인장다육식물연구소	김윤희	
난번식성 기술 개발	하월시아 기내번식	화훼	화훼 '17~'18 농업기술원 선인장다육식물연구소		김윤희	
색인용어	색인용어 하월시아, 생장조정제, 대량생산, 재분화, 순화					

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the suitable parts for callus induction and optimal concentrations of growth regulators contained in the medium affecting shooting and rooting for *in vitro* the mass production of *Haworthia truncata and Haworthia maughanii*. The leaves and flower bloom showed 100% callus formation rate at NAA 1mgL⁻¹ treatment and NAA 1mgL⁻¹ and TDZ 2mgL⁻¹ treatment and the flower stalks showed 75% callus formation rate at NAA 2mgL⁻¹ and TDZ 2mgL⁻¹ treatment in *H. truncata*, respectively. The leaves and flower bloom showed 100% callus formation rate at NAA 1mgL⁻¹ and TDZ 1mgL⁻¹ treatment, NAA 2mgL⁻¹ and TDZ 2mgL⁻¹ treatment and the flower stalks showed 100% callus formation rate at NAA 1mgL⁻¹ treatment in *H. maughanii*, respectively. While the rate of callus formation was high in leaves and flower bloom, the leaves were the most efficient to obtain most culture parts. NAA 0.1mgL⁻¹ treatment was the most effective in shoot formation with 24.2, 22.0 shoots in *H. truncata* and *H. maughanii*, respectively. In addition, multiple shoot propagation showed 66.3 shoots in NAA 1mgL⁻¹ and BA 0.1mgL⁻¹ treatments in *H. truncata* and NAA 0.1mgL⁻¹ and BA 0.1mgL⁻¹ treatments were the most effective in multiple shoot propagation with 16.3 shoots in *H. maughanii*. In the case of acclimatization of regenerated plant, growth characteristics did not show significantly difference 95% shading according to the different ratio of substrate mixture, and it was determined that would be appropriate considered the survival rate and appearance preference. The results led us to speculate that the optimization of culture was responsible for the mass propagation in vitro cultures of H. truncata and H. maughanii.

Key words: Haworthia, Growth regulators, Mass Propagation, Regenerated shoot, Acclimatization

1. 연구목표

하월시아(Haworthia)는 내음성이 강하여 실내식물로 적합한 식물로 최근 국내외에서 소비가 증가되고 있는 다육식물이다. 대부분은 로제트형으로 잎의 경도가 단단하고 다양한 색상을 가지고 있으며 잎의 위쪽에 무늬가 있는 종, 투명한 내부의 조직을 형성하여 광합성 조직에 빛이 도달할 수 있는 종 등 다양한 종이 있다. 하월시아의 원산지는 남아프리카이며 카루(Karroo)고원을 중심으로 많은 종이 분포되어 있다. 또한 직사광선보다는 밝은 그늘을 좋아하는 식물로 비교적 선선한 시기에 생장을 보이는 동형식물(冬形植物)이며, 독특한 무늬가 있어 관상가치가 높은 편이나 생장속도가 느리고 영양번식이 어려운 식물이다. 특히 '옥선'(H. truncata)은 종자에서 성체까지 7~8년 정도의 기간이 소요되고, 창의 형태가 긴 직사각형을 이루고 엽형이 독특한 품종이다. '만상'(H. maughanii)은 1년에 1cm정도 자라고 종자에서 성체 까지 5년 이상의 기간이 소요되는 식물로 하월시아 중 옥선과 만상은 증식률이 낮고 번식이 어려운 대표적인 다육식물 중 하나이다(Lee, 2015). 증식속도가 빠르고 대량증식이 가능한 종묘생산기술(Guadalupe et al., 1999)로서 조직배양이 하나의 대안으로 주목 받고 있으나 하월시아에 관한 조직배양 연구는 미미한 실정이다. 따라서 '옥선'과 '만상'의 조직배양을 이용하여 균일 묘의 효율적인 대량생산을 위한 기내 증식 체계를 확립하고 기외 순화조건을 구명하고자 본 연구를 수행한 결과는 다음과 같다.

2. 재료 및 방법

가. 시험 재료 및 배양조건

시험에 사용한 하월시아 '옥선'과 '만상'은 경기도 고양시 지역의 농가 수집종으로 경기도농업기술원 선인장다육식물연구소에서 재배 관리하면서 식물재료로 사용하였다. 잎을 흐르는 수돗물에 2~3회 수세한 후 70% EtOH에서 30초간 소독과 증류수 수세를 3회 반복한 후 Tween-20을 첨가한 0.3% NaOCl 용액에 침지하여 15분간 교반하였다. 전처리가 완료된 시료는 클릭벤치 내에서 멸균된 증류수로 3회 세척하고 물기를 제거한 후 생장조정제가 처리된 배양배지에 치상하였고 광주기 16/8시간(광/암), 광도 60±0.2µmol/m²/s, 온도 25±2℃로 유지되는 조건에서 배양하였다.

나. 배지

MS(Murashige & Skoog, 1962)기본 배지에 3% sucrose와 0.7% agar를 첨가한 후 옥신류인 NAA(Naphthaleneacetic acid), 사이토키닌류인 BA(6-Benzylaminopurine) 및 TDZ(Thidiazuron)를 단용 또는 혼용 첨가하여 시험배지를 조제하였고, pH는 5.7±0.1로 조정하였다. 실험에 사용한 모든 배지는 121℃, 1.5기압으로 15분간 멸균하였고 배양용기(100 X 40mm)에 분주하여 사용하였다.

다. 캘러스 유도

캘러스 유도를 위한 시험재료로 잎, 화경, 화뢰를 사용하였고, 잎은 0.5~1.0cm, 화경은 0.5~2.0cm, 화뢰는 2cm 길이로 절단하여 NAA와 TDZ를 각각 0, 1, 2mgL⁻¹ 수준으로 조합 처리하였다. 잎 절편, 화경, 화뢰는 각 처리 당 15개씩 4반복하여 배양하였고 16주간 배양 후 캘러스 형성율을 조사하였다.

라. 신초유도

식물체 재분화에 미치는 생장조정제의 농도를 구명하기 위해 잎에서 형성된 캘러스를 0.5 X 0.5cm 크기로 절단하여 0, 0.01, 0.1, 0.2mgL⁻¹의 NAA와 0, 0.5, 1, 1.5, 3mgL⁻¹의 BA를 각각의 농도별로 조합처리한 배지에서 신초분화를 유도하였다. 각 처리별 15개씩 4반복하여 치상하였으며 배양 16주 후 신초 발생율을 조사하였다.

마. 신초증식 및 발근유도

신초의 증식 및 발근을 유도하기에 적합한 생장조정제의 종류와 적정 농도를 구명하기 위해 약 2cm의 길이로 자른 신초를 NAA 0, 0.1, 1mgL⁻¹와 BA 0, 0.1, 1, 2, 4mgL⁻¹를 각각의 농도 별로 치상하여 신초증식과 발근을 유도하였다. 각각 배양용기(100 X 40mm)에 15주씩 4반복하여 신초의 증식 개체수와 발근율을 조사하였다.

바. 식물체 순화

기내 식물체의 순화에 적합한 방법을 구명하기 위하여 혼합용토는 질석:펄라이트=1:1, 질석:펄라 이트:피트모스=1:1:1,마사:펄라이트=1:1, 마사:펄라이트:피트모스=1:1:1를 이용하고 차광정도는 차광막 35, 55, 75, 95%를 4수준으로 처리하였다. 순화된 5cm 정도의 식물체를 7cm 사각포트에 20주씩 5반복하여 습도 72±2%, 온도 23±2℃ 환경조건에서 정식 3주 후에 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

<시험 1> 캘러스 유도를 위한 치상부위 및 생장조정제 농도 구명

'옥선'과 '만상'의 캘러스 유도에 적합한 생장조정제의 적정 농도를 구명하기 위하여 잎, 화뢰, 화경을 재료로 NAA와 TDZ의 농도를 달리하여 배양한 결과는 표 1과 같다. '옥선'은 잎 절편을 배양하였을 때 NAA 1mgL^{-1} 단용배지에서 캘러스가 100% 형성 되었다. 화뢰를 배양하였을 때는 초기에 캘러스 형성율은 높았으나, 시간이 경과하여도 캘러스가 증식되지 않았다. 이 중 NAA $1 mgL^{-1} + TDZ 2 mgL^{-1}$ 혼용 처리구에서 100%의 캘러스가 형성되었다. 화경을 배양 하였을 경우에는 NAA 2mgL⁻¹ + TDZ 2mgL⁻¹를 혼용 배지에서 75%의 녹색 캘러스가 형성되었다.

'만상'의 경우 잎 절편을 배양하였을 때 NAA 1mgL⁻¹ + TDZ 1~2mgL⁻¹ 혼용배지에서 캘러스가 100% 형성되었다. 화뢰는 NAA $2mgL^{-1} + TDZ$ $2mgL^{-1}$ 조합 처리구에서 캘러스 생육이 기장 양호하여 화뢰로부터 캘러스 유도에 적합한 것으로 판단되었다. 화경의 경우 NAA 단용배지에서는 배양초기에는 캘러스가 형성되지 않았으나 8주 경과 후부터 100%의 녹색 캘러스가 형성되었으며, NAA와 TDZ를 혼용한 배지에서는 100%의 캘러스 형성을 보였으나 유백색의 캘러스로 증식됨을 관찰할 수 있었다. 따라서, 옥선은 잎에서 NAA 1mgL^{-1} 단용배지, 만상은 NAA 1mgL^{-1} + TDZ 1mgL⁻¹ 혼용배지에서 캘러스 형성이 높아 적합한 배지로 판단되었다. 또한 '옥선'과 '만상'의 잎, 화뢰, 화경을 배양한 경우, 모든 부위에서 캘러스 형성은 되었으나, 기장 많은 배양절편 확보가 가능한 잎 절편이 캘러스 형성에 기장 효율적으로 판단되었다.

표 1. 생장조정제 종류 및 농도 따른 잎 치상 부위별 캘러스 형성 비교

<u></u>		생장조정제 (mgL ⁻¹)	잎절	잎절편		화뢰		화경	
품 종	NAA	TDZ		캘러스 형성정도 ^z	캘러스 형성율(%)	캘러스 형성정도		캘러스 형성정도	
오	선	0	0	20.3e	+	55.6c	+	19.4c	+
			1	20.3e	+	61.1bc	+	2.8c	+
			2	20.3e	+	47.2c	+	4.2c	+
		1	0	100a	+++	93.1ab	+	41.7bc	++
			1	72.5d	++	100a	+++	4.2c	+
			2	80.2c	++	100ab	+++	40.3bc	++
		2	0	100a	+++	100ab	+	15.3c	+
			1	100a	++	100ab	++	52.5b	++
			2	90.5b	++	100a	++	75.0a	++
만	상	0	0	37.1d	++	58.3e	++	0с	+
			1	59.0b	++	59.7e	+	8.3bc	+
			2	37.1d	+	50.0f	+	37.5b	+
		1	0	14.8f	++	80.6c	++	100a	+++
			1	100a	+++	72.2d	++	100a	++
			2	100a	+++	83.3b	++	100a	++
		2	0	19.5e	++	100a	++	100a	+++
			1	58.0b	+	83.3b	++	100a	++
			2	42.4c	+	100a	+++	100a	++

^{**} 치상 16주 후 조사, z + : poor, ++: moderate and +++: good ^yMean seperation within columns by DMRT at 5% level

<시험 2> 신초 재분화 배지 선발

캘러스로부터 신초 유도에 적합한 NAA 및 BA 농도를 선발하고자 MS배지에 23주간 처리한 결과는 표 2와 같다. '옥선'의 경우 NAA 0.1mgL⁻¹이상의 단용배지에서 신초가 발생하였으며, 특히 NAA 0.1mgL⁻¹ 단용배지에서 신초가 24.2개로 가장 많이 발생하였다.

'만상'의 경우 배양 8주 후 캘러스로부터 신초가 발생하였으며, 특히 $NAA 0.1 mgL^{-1}$ 단용배지에서 신초가 22.0개로 가장 많이 발생하고 생장이 양호하여 신초유도에 적합한 처리로 판단되었다. 따라서 '옥선'과 '만상'의 경우 캘러스에서 신초 재분화 효율을 높이는데 NAA 0.1mgL⁻¹ 단용배지가 효과가 있었으며, 사이토키닌은 신초분화에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다.

<시험 3> 신초증식 및 발근유도 배지 선발

신초의 증식과 발근 유도를 위해 NAA와 BA를 MS배지에 16주간 배양한 결과는 표 3과 같다. '옥선'은 배양 4주 후부터, 일부 혼용 처리에서 신초가 형성되기 시작하였고, 만상은 배양 6주후부터 신초형성이 관찰되었다. '옥선'은 NAA 1mgL⁻¹ + BA 0.1mgL⁻¹ 혼용처리에서 66.3 개의 신초가 발생하여 가장 우수하였으며 100% 발근을 보였다.

'만상'은 NAA 0.1mgL⁻¹ + BA 0.1mgL⁻¹ 혼용처리에서 신초가 16.3개 발생하여 신초증식이 가장 우수하였다. 반면 NAA 농도와는 상관없이 BA 1mgL⁻¹ 이상의 배지에서는 신초가 기형 으로 변화되어 정상적인 개체로 증식되지 못하였다.

따라서 '옥선'은 신초증식이 가장 많고 100% 발근을 보인 NAA 1mgL⁻¹ + BA 0.1mgL⁻¹ 혼용 배지와 '만상'에서는 NAA $0.1 \text{mgL}^{-1} + \text{BA} 0.1 \text{mgL}^{-1}$ 혼용배지가 신초증식 및 발근유도에 적합한 것으로 판단되었다.

표 2. 생장조정제 종류 및 농도에 따른 신초 형성 비교

표 조	생장조정제	∦(mg·L ⁻¹)	 _ 신초발생수	신초길이	발근율
품 종	NAA	BA	(개/캘러스)	(cm)	(%)
옥 선	0	0	0с	0b	0
		0.5	0c	0b	0
		1	0c	0b	0
		1.5	0c	0b	0
		3	0c	0b	0
	0.01	0	0c	0b	0
		0.5	0c	0b	0
		1	0c	0b	0
		1.5	0c	0b	0
		3	0c	0b	0
	0.1	0	24.2a	0.5a	8
		0.5	0c	0b	0
		1	0c	0b	0
		1.5	0c	0b	0
		3	0c	0b	0
	0.2	0	17.1b	0.4a	5
		0.5	0c	0b	0
		1	0c	0b	0
		1.5	0c	0b	0
		3	0c	0b	0
만 상	0	0	4.1d	0.6d	0
		0.5	Of	0e	0
		1	Of	0e	0
		1.5	Of	0e	0
		3	Of	0e	0
	0.01	0	6.2b	0.6d	8
		0.5	Of	0e	0
		1	Of	0e	0
		1.5	Of	0e	0
		3	Of	0e	0
	0.1	0	22.0a	0.8c	12
		0.5	5.3c	0.9b	0
		1	Of	0e	0
		1.5	Of	0e	0
		3	3.1e	1.2a	0
	0.2	0	Of	0e	0
		0.5	Of	0e	0
		1	Of	0e	0
		1.5	Of	0e	0
		3	Of	0e	0
		<u> </u>	UI	UE	U

[※] 치상 23주 후 조사, ^zMean seperation within columns by DMRT at 5% level

표 3. 생장조정제 종류 및 농도에 따른 신초 증식 비교

エ ス	생장조정기	데(mg·L ⁻¹)	 초장	 초 폭	신초발생수	발근율
품 종	NAA	BA	(cm)	(cm)	신초발생수 (개신초)	발 근 율 (%)
옥 선	0	0	1.6	2.1	Of	100
		0.1	1.6	2.2	22.3e	50
		1	1.7	1.8	37.6cd	35
		2	1.8	1.6	Of	0
		4	0.9	1.0	Of	0
	0.1	0	2.7	3.1	40.0c	100
		0.1	2.4	3.6	51.5b	100
		1	2.2	3.9	35.6cd	80
		2	1.8	2.9	Of	0
		4	1.2	1.3	Of	0
	1	0	2.2	2.5	32.1d	100
		0.1	2.7	2.4	66.3a	100
		1	2.6	2.4	Of	0
		2	1.8	1.7	Of	0
		4	2.2	3.6	Of	0
만 상	0	0	2.1	2.6	1.3c	100
		0.1	2.3	3.6	4.3bc	100
		1	1.6	2.6	0d	0
		2	1.5	1.2	0d	0
		4	1.1	0.6	0d	0
	0.1	0	2.4	2.8	2.0bc	100
		0.1	2.5	4.0	16.3a	100
		1	1.4	2.7	0d	0
		2	1.8	2.6	0d	0
		4	1.3	1.0	0d	0
	1	0	1.3	1.6	0d	100
		0.1	2.1	2.3	0d	100
		1	1.2	1.3	0d	0
		2	1.3	1.7	0d	0
		4	1.3	1.9	0d	0

※ 치상 16주 후 조사, ,²Mean seperation within columns by DMRT at 5% level





그림 1. 신초 증식 및 발근유도 배지 선발 (좌 : 옥선, 우: 만상)

<시험 4> 재분화체 기외 순화조건 구명

정상적인 식물체로 증식된 신초를 분리하여 재분화 식물체의 기외 순화조건을 구명하기 위해 피트 모스 등 혼합 용토 4수준과 차광정도 35, 55, 75, 95% 4처리하여 정식 3주 후 조사한 결과는 표 4와 같다. '옥선'의 순화시 용토에 따라 초장, 엽장, 엽두께 등의 생육은 큰 차이를 보이지 않았으며, 차광 정도에 따라서는 생육의 유의한 차이를 보였다. 차광막 95%에서 품종 고유의 엽색이 유지되고 생 존율이 100%로 가장 우수하였다. 일반적으로 하월시아 재배시 한여름에는 50% 차광을 유지하는데 반해, 기내 순화묘의 경우 재분화 식물체의 정상적인 생육과 생존율, 고유의 엽색유지를 위해서는 차광막 95%정도에서 순화하는 것이 적합할 것으로 판단된다.

표 4. 하월시아 '옥선'의 차광정도 및 용토에 따른 생육비교

	처리내용	초장	엽장	엽두께	1	생존율	관상
차광막 (%)	용토 (v:v:v)	(cm)	(cm)	(mm)	엽색 ^丿	(%)	7内
35	질석 : 펄라이트=1:1	2.1	2.1	3.2	200A	0	1
	질석: 펄라이트:피트모스=1:1:1	2.2	2.3	2.1	200A	0	1
	마사 : 펄라이트=1:1	2.0	2.0	3.0	200A	0	1
	마사: 팔아트:피트모스=1:1:1	2.4	2.6	2.8	200A	0	1
55	질석 : 펄라이트=1:1	2.3	2.3	3.1	200A	0	1
	질석: 팔라이트:피트모스=1:1:1	2.1	2.2	3.3	200A	0	1
	마사 : 펄라이트=1:1	2.6	2.6	3.1	200A	0	1
	마사: 팔아트:피트모스=1:1:1	2.4	2.4	3.6	200A	0	1
75	질석 : 펄라이트=1:1	2.1	2.2	3.5	N189A	30	3
	질석: 펄라이트:피트모스=1:1:1	2.3	2.3	3.7	N189A	30	3
	마사 : 펄라이트=1:1	2.3	2.3	3.6	N189A	30	3
	마사: 팔아트:피트모스=1:1:1	2.3	2.2	2.9	N189A	30	3
95	질석 : 펄라이트=1:1	2.4	2.5	4.4	139A	100	5
	질석: 팔라이트:피트모스=1:1:1	2.7	2.6	4.3	139A	100	5
	마사 : 펄라이트=1:1	2.5	2.6	4.5	139A	100	5
	마사: 팔아트:피트모스=1:1:1	2.5	2.7	4.1	139A	100	5
차광정도		**	**	**	-	_	-
용토	3			ns	-	_	-
_ 차광정도	E× 상 토	ns	ns	ns		_	_

[※] 정식 3주 후 조사, DMRT at 5% level, J RHS Color chart

[♪] 관상가치 : 1 매우 나쁨, 2 나쁨, 3 보통, 4 좋음, 5 매우 좋음

4. 적 요

2017년에서 2018년까지 난번식성 하월시아 대량생산을 위하여 '옥선'과 '만상'의 증식 체계는 다음과 같다.

- 가. 캘러스 유도에 적합한 배양부위를 구명하기 위해 잎, 화뢰, 화경을 이용하여 캘러스 형성율을 조사한 결과, '옥선'은 잎에서는 NAA 1mgL⁻¹ 단용배지, 화뢰는 NAA 1mgL⁻¹ + TDZ 2mgL⁻¹ 혼용배지에서 100%, 화경은 NAA 2mmgL⁻¹ + TDZ 2mgL⁻¹ 혼용배지에서 75% 캘러스가 형성 되었으며, '만상'의 경우 잎은 NAA 1mgL⁻¹ + TDZ 1mgL⁻¹ 혼용배지, 화뢰는 NAA 2mgL⁻¹ + TDZ 2mgL⁻¹ 혼용배지, 화경은 NAA 1mgL⁻¹ 이상의 단용처리에서 100% 캘러스가 형성되었으나, 가장 많은 배양절편 확보가 가능한 잎 절편이 가장 효율적 으로 판단되었다.
- 나. '옥선'과 '만상'의 캘러스로부터 신초 유도에 적합한 배지를 선발한 결과, NAA 0.1mg·L⁻¹ 단용배지에서 신초수가 각각 24.2개, 22.0개로 가장 많았다.
- 다. 신초의 증식 및 발근유도에 적합한 배지를 선발한 결과 '옥선'은 NAA 1mgL⁻¹ + BA 0.1mgL⁻¹ 혼용배지에서 신초증식 개체수가 66.3개, '만상'은 NAA 0.1mgL⁻¹ + BA 0.1mgL⁻¹ 혼용배지에서 16.3개로 가장 많았으며 발근형성이 우수하였다.
- 라. '옥선' 조직배양묘의 순화 용토 종류에서 생육의 차이가 없었으며, 차광정도 95%에서 재분화 식물체가 정상적으로 생육하고 생존율이 높았으며 , 품종 고유의 엽색을 유지하였다.

5. 인용문헌

- Lee HS (2015) A study on characterization of cultivating Haworthia in Korea. Sahmyook National University
- Guadalupe M, Humberto S, Ralph B (1999) In vitro culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. Scientia Horticulturae.81: 71–87
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:473-497

6. 연구결과 활용제목

- O Establecimiento de un protocolo eficiente para la propagacion in vitro de Haworthia truncata (학술발표, 2017)
- O 생장조정제가 하월시아 '옥선' 기내 대량증식에 미치는 영향(학술발표, 2018)
- O 하월시아 '옥선' 조직배양 기내 대량증식 및 순화방법(영농활용, 2018)
- O 생장조정제가 하월시아 '만상'의 조직배양 기내 대량증식에 미치는 영향(논문게재, 2018)

7. 연구원 편성

과제	구 분	소 속	직 급	성 명	수행업무	참여년도
난번식성	책임자	선인장다육식물연구소	농업연구사	김윤희	과제수행총괄	'18
하월시아	공동연구자	"	"	이지영	시험주관	'17
기내번식 기술 개발	"	"	"	이재홍	자료분석	'17~'18
, , , , ,	"	"	"	정재홍	자료조사	'18
	"	"	농업연구관	소호섭	자료분석	'18
	"	"	"	이상덕	시험검토	'17~'18
	"	원예연구과	농업연구사	김혜형	시험관리	'17