

솔나리 기내배양 및 재분화 식물체의 RAPD 분석

김희규, 천고영, 이헌중, 성은수, 유창연

강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부

솔나리는 식물분류학상 백합과 나리속에 속하는 식물로서 주로 강원도 이북의 깊은 산에서 자라는 다년초로서 화형과 화색이 아름다워 관상용 소재로서 유망한 식물이고, 약용식물로서 자양, 강장, 종기, 건위 등에 약재로 사용하고 있다.

솔나리 인편배양에 사용되는 인편은 강원도 평창군 진부면 야생화 농장에서 채취하여 사용하였다. 인편을 각각 인편조각으로 분리하여 24시간 동안 흐르는 물에 수세한 후 70% 에탄올에 2분간 담가 두었다. 멸균수로 세척한 후 무균상에서 NaOCl 5%용액에 15분 동안 소독하였고 소독한 재료는 다시 멸균수에 5회 세척한 후 5mm × 5mm 크기로 절단하여 각 실험에 사용되는 배지에 치상하였다. 각 배지는 생장조절물질 첨가 후 pH를 5.7로 조절하였으며 agar를 0.8% 첨가하였다. 각각의 배지는 10ml씩 시험관에 분주하였으며 이를 121℃, 1.5기압 이상의 조건으로 15분간 고압 멸균하고 고체 배지로 응고시켜 사용하였다. 위의 배지에 준비된 솔나리 인편을 치상하여 25℃, 16시간 광조건하에서 배양하였고 30일 후 캘러스 생성율과 분화된 식물체의 줄기수, 줄기 길이, 잎수, 뿌리수, 뿌리길이 등을 조사하였다. 배지는 MS(Murashige and Skoog), B₅(Gamborg), MG(MS salts + B₅ vitamins) 배지를 기본으로 하여 3%의 sucrose를 첨가한 후 완전히 용해시켰다. 각각의 배지에 auxin류인 2,4-D 0.1, 1, 2mg/l, IAA 0.1, 1, 2mg/l, NAA 0.1, 1, 2mg/l, cytokinin류인 TDZ 0.1, 1, 2mg/l, BAP 0.1, 1, 2mg/l의 농도로 단독처리하였고 각각의 식물생장조절물질을 조합처리하였다.

분화된 식물체의 DNA의 추출은 CTAB(cetyltrimethyl ammonium bromide)방법을 이용하여 솔나리의 DNA를 추출하였다. DNA 증폭을 위하여 Primer는 oligonucleotide primer(10-mer) 5개를 사용하였고, PCR 반응조건은 10ng template DNA, 2.5μM의 primer 4μl (Operon), 1.25mM의 dNTP 4μl, 10×buffer 2.5μl, MgCl₂ 3μl, 2.5U Taq polymerase 0.5μl(Promega)를 포함하는 반응액 25μl를 이용하여 실시하였다. 증폭은 pre-denature 94℃ 5분; denaturation 94℃ 1분, annealing 35℃ 1분, extension 72℃ 2분(45cycle); post-elongation 72℃ 10분으로 실시하였으며 PCR 산물의 확인은 1.5% agarose gel에 전기영동한 후 ethidium bromide (0.5μg/ml)로 염색한 후 UV하에서 관찰하였다.

1. 캘러스 형성에 있어서 배지 및 식물생장조절제에 대한 연구에서 MS 배지

(Murashige and Skoog medium)에서는 2,4-D 1, 2mg/l, NAA 1, 2mg/l, TDZ 0.1mg/l, BAP 2mg/l, Gamborg B₅배지에서는 2,4-D 2mg/l, NAA 0.1mg/l, TDZ 1, 2mg/l, MSB₅배지 (MS salts + B₅ vitamins)에서는 2,4-D 1mg/l, NAA 0.1mg/l, TDZ 2mg/l, BAP 2mg/l 에서 100%의 캘러스 형성을 보였다.

2. 캘러스 형성시 성장조절물질 조합처리(2,4-D + TDZ, 2,4-D +BAP)는 단독처리보다 캘러스 형성이 상당히 양호하게 나타났다. MS배지와 MSB₅배지에서 캘러스 형성이 모든 조합처리에서 양호하게 나타났다.
3. 지상부 기관(줄기, 잎) 분화와 생장에 관한 배지 및 식물생장조절제 효과를 알아보기 위한 연구에서, 단독처리시에는 IAA, NAA, BAP 처리시에 양호한 줄기 분화를 보였고, 특히 이들 처리에서 multiple shoot가 형성되었다. 조합처리시에는 2,4-D 첨가에 의한 분화 억제효과가 나타났다. 각 배지별로 지상부 분화의 정도에 차이가 심하게 나타났다.
4. NAA 처리에서 가장 양호한 뿌리 분화를 보였고, 뿌리 성장 역시 NAA 처리에서 가장 양호하였다. 성장조절제 조합처리에서는 뿌리의 분화 및 생장이 거의 일어나지 않았다.
5. 솔나리 인편조직의 기내배양을 통해서 얻어진 재분화된 식물체의 변이성 여부를 알아보기 위해 5가지의 random primer를 이용하였다. 재분화된 식물체 중 12개체의 DNA를 사용하여 PCR 기술을 이용한 RAPD 검증을 실시한 결과 5가지의 primer에서 37개의 RAPD marker bands가 관찰되었고 그 중 3개의 somaclonal polymorphisms이 관찰되었다.