

라벤다의 기내증식과 RAPD에 의한 체세포 변이체 분석

이현일 · 성은수 · 김일섭 · 유창연

강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부

Micropropagation and RAPD Analysis of Somaclonal Variants in *Lavandula spica* cv. Marino

Xian Ri Li, Eun Soo Seong, Il Seop Kim and Chang Yeon Yu

ABSTRACT : To establish the mass propagation system of *Lavandula spica* cv. Marino, shoot tip, node, internode and leaf segment cultures were carried out. RAPD was applied to detect the somaclonal variation. Callus induction was very high in the medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D, 2 mg/l NAA especially and combined with 0.05 mg/l BAP from leaves. Shoot formation was high with 2~4 mg/l BAP or 4 mg/l BAP + 0.2 mg/l NAA from shoot tip. Shoot proliferation was 9.1 times in the B₅ medium with 0.5 mg/l BAP and 0.01 mg/l NAA. Root formation was improved in NAA, which was the concentration of 0.1 to 1 mg/l and 1 mg/l IAA. Nursery survival rate was enhanced over 90% and growth was looked good in the acclimation soil consisting of peatmoss : vermiculite : perlite (1:1:1, v:v:v). Randomly amplified polymorphic DNA banding patterns based on polymerase chain reaction (PCR) were used to assess the genetic variation in plants regenerated from *in vitro* culture.

Key words : *Lavandula spica* cv. Marino, Embryogenic callus, Direct shoot regeneration, PAPP analysis.

서 언

라벤다 (*Lavandula spp.*)는 꿀풀과에 속하는 다년생 초본식물로서 향수, 화장품, 비누 등의 부항제로 널리 쓰이고 있으며, 신경 안정효과와 살균 방부작용이 뛰어나 차, 식초, 목욕제 및 방부제로도 사용되고 있다. 국내에서는 90년대 초부터 재배

가 이루어 지기 시작하였으나, 아직 재배 기술이 확립되지 않아 번식에 많은 어려움이 있다. 라벤다는 주로 종자번식과 삽목번식을 하고 있으나, 종자 번식시 발아율이 낮고 변종이 출현하여 우량 모본의 대량증식에는 여러 가지 문제점을 내포하고 있다. 또한 대량생산시 우량종묘의 삽목번식이 권장되고 있으나, 번식율이 한정되고 시간과 노력이 많이 소요되기 때문에 기내번식을 통한 대량번식 체

* 강원대학교 농업생명과학 대학 식물응용과학부 (Division of Applied Plant Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea) < '99. 2. 24 접수 >

계 확립이 요구되고 있다.

라벤다의 기내배양에 관한 연구는 80년대 초부터 활발히 진행되어, *L. angustifolia*, *L. latifolia*, 및 *L. stoechas*에서 배주, 자엽, 엽다 및 뿌리절편을 이용한 캘러스 유도 및 배양, 그리고, 식물체 재분화에 관한 연구가 많이 이루어졌으며 (Calvo et al., 1988; Calvo and Segura, 1988, 1989a, b; Jordan, 1988; Quazi, 1980), 원형질체의 분리와 배양, 캘러스 배양을 통한 2차 대사산물(색소)의 형성, 형질전환 그리고, 캘러스 조직의 저온 보존의 가능성에 대한 연구도 보고된 바 있다 (Banthorpe, 1985; Lappin et al., 1987; Watanabe et al., 1985; Webb et al., 1984). 그러나 대량증식을 위한 식물체 재분화 및 계대배양 조건에 대한 연구는 체계적으로 이루어진 바 없다.

본 연구는 마리노라벤다의 조직배양을 통한 우량 종묘의 대량증식과 안정적인 묘생산 체계의 확립을 목표로, 절편으로부터 캘러스 형성 및 식물체 재분화에 미치는 배지와 성장 조절물질의 효과를 구명하고, 재분화 식물체의 변이성을 검증하기 위하여 PCR (polymerase chain reaction)을 이용한 RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) 분석을 수행하였다.

재료 및 방법

공시 재료는 마리노라벤다 (*Lavandula spica*. cv. Marino)를 사용하였으며, 6월경에 온실에서 분재 중인 식물체로 부터 경정, 마디, 절간, 잎절편을 채취하여 수세한 후, 70% 에탄올에 10초간 담근 다음 멸균수로 세척하여 0.3-0.5%의 Sodium hypochlorite 용액에 15분간 표면 살균하고 다시 멸균수로 4회 세척한 다음, 0.3-0.5 cm 크기로 절단하여 배지에 치상하였다.

기본배지에 sucrose는 3%, pH는 5.7-5.8로 조절하고 agar는 0.8%를 첨가하였다. 각각의 배지는 50 ml의 시험관에 10 ml씩 분주하여 사용하였으며, 조직절편은 23°C, 16시간 광조건에서 배양하였다.

캘러스 형성에 미치는 성장 조절물질의 효과

MS배지 (Murashige and Skoog, 1962)를 기본

으로 NAA와 BAP, TDZ를 각각 0.01, 0.1, 1, 2 mg/l의 농도로 단독 또는 NAA, 2,4-D를 BAP와 각 농도별로 조합 처리한 배지에서 캘러스를 유도하여 배양 60일째에 캘러스 형성을 조사하였다.

신초 분화에 미치는 성장조절물질의 효과

MS배지에 NAA와 BAP, TDZ를 각각 0.01, 0.1, 1, 2 mg/l의 농도로 단독 또는 BAP와 NAA를 각 농도별로 조합 처리한 배지에서 배양 60일째에 신초의 형성을 조사하였다.

재분화 식물체의 기내증식에 있어서 성장조절물질 및 배지의 효과

증식용 배지는 B₅ (Gamborg et al., 1968), SH (Schenk and Hildebrandt, 1972), MS 및 1/2 MS 배지에 BAP 0.5, 1, 2 mg/l 와 NAA 0.01 mg/l를 각각 조합, 첨가하여 배양 60일째에 신초의 형성과 증식율을 조사하였다.

뿌리 형성에 미치는 성장조절물질의 효과

B₅ 기본배지에 NAA, IAA, IBA를 각각 0.01, 0.1, 1 mg/l 첨가하여 배양 30일 후에 뿌리 형성을 조사하였다.

재분화 식물체의 순화

Vermiculite: perlite: peatmoss를 1:1:1(v/v/v)로 혼합한 상토에 재분화 식물체를 이식한 후, 비커를 거꾸로 세워 습도를 유지시켜 주었으며, 광은 55% 차광하였고, 하우스 내의 온도는 30°C 이상 올라가지 않게 관리하였다. 재분화 식물체의 활착율은 순화 30일 후에 조사하였다.

재분화 식물체의 RAPD 분석

마리노라벤다의 모본과 재분화 식물체의 어린잎을 시험 재료로 사용하였다. DNA 추출은 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)법을 사용하였고 (Fourney et al., 1989), DNA 정량은 spectrophotometer (U-2001, Hitach)를 이용하였다. PCR 반응액은 10 ng template DNA, 2.5 μM의 primer 4 μl, 1.25 μM의 dNTP 4 μl, 10×buffer 2.5 μl, MgCl₂ 3 μl, 2.5U Taq polymerase 0.5 μl

(Promega)를 포함하는 반응액 25 μ l를 사용하였다. Primer는 4가지의 OPA-02 (TGCCGAGCTG), OPA-04 (AATCGGGCTG), OPA-14 (TCTGTGCTGG), OPB-07 (GGTGACGCAG) 10-mer random primer를 사용하였다. DNA 증폭은 94 $^{\circ}$ C 5분, 94 $^{\circ}$ C 1분, 35 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 2분 (45 cycle), 72 $^{\circ}$ C 10분으로 실시하였으며, PCR 산물은 1.4% agarose gel에 전기영동하여 DNA band를 관찰하였다. 실험은 2회 반복으로 실시하였고 major band와 minor band 중 재현성의 문제가 되는 minor band는 제외시킨 후 변이성 여부를 조사하였다.

결과 및 고찰

캘러스 형성 및 식물체 재분화

NAA, BAP 및 TDZ의 단독 또는 조합 처리가 경정, 마디, 절간, 잎 절편으로부터 캘러스 형성에 미치는 성장 조절물질의 영향을 조사한 결과는 Table 1, Table 2 및 그림 1과 같다.

캘러스 형성은 절편의 종류에 관계없이 NAA 2 mg/l 단독 처리구 및 NAA 2 mg/l 또는 2,4-D 1 mg/l 와 BAP 0.05 mg/l 의 조합 처리구에서 모두 양호하였다. 그러나 경정과 절간으로부터 형성

된 캘러스는 배양 기간이 길어짐에 따라 색깔이 짙어지고 간헐적으로 뿌리가 형성되어, 잎 절편으로부터 캘러스를 유도하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다. 따라서 성장조절물질의 처리 효과는 2,4-D가 NAA에 비해, 조합처리가 단독처리에 비해 양호하였다. 이는 Calvo 등 (1988)이 *Lavandula latifolia*의 배측 절편으로부터 캘러스 형성에 2,4-D 0.1 mg/l 처리가 효과적이었다는 결과와 유사하였다.

NAA, BAP 및 TDZ를 단독 또는 조합 처리한 MS 배지에서 각 처리별 신초의 형성을 비교한 결

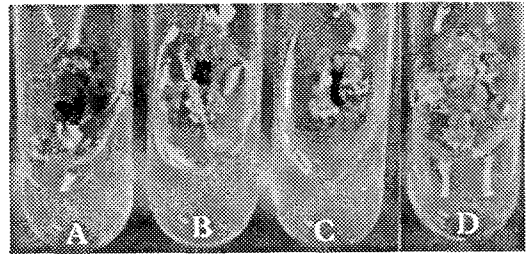


Fig. 1. Effect of NAA and 2,4-D on callus formation from explants of *Lavandula spica* cv. Marino.

A: NAA (shoot tip) ; B: NAA (inter node) ;
C: NAA (leaf) ; D: 2,4-D (leaf)

Table 1. Effect of NAA, BAP and TDZ on callus formation in MS medium from explants of *Lavandula spica* cv. Marino in 60 days.

Treatment (mg/l)	Callus form. (%)	Callus dia. (cm)	Callus form. (%)	Callus dia. (cm)	Callus form. (%)	Callus dia. (cm)	Callus form. (%)	Callus dia. (cm)	Callus form. (%)	Callus dia. (cm)
NAA	0.01	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.1	80.0	1.2b ¹⁾	0.0	0.0	100	0.5d	40.0	0.4c	
	2.0	100	1.7a	100	1.4a	100	1.7a	100	1.3a	
BAP	0.01	20.0	0.2e	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.1	20.0	0.3de	40.0	0.4c	80.0	0.4d	0.0	0.0	
	2.0	64.0	0.5de	100	0.6bc	100	0.7c	40.0	0.4c	
TDZ	0.01	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.1	70.0	0.5d	100	0.5bc	100	0.8c	0.0	0.0	
	1.0	80.0	0.9c	100	0.9 b	100	1.3b	40.0	0.7b	

¹⁾ Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

Table 2. Effect of NAA, 2,4-D and BAP on callus formation in MS medium from explants of *Lavandula spica* cv. Marino in 60 days.

Growth regulator (mg/l)		Callus form. (%)	Callus dia. (cm)	Callus form. (%)	Callus dia. (cm)	Callus form. (%)	Callus dia. (cm)
		Shoot tip		Internode		Leaf	
NAA 2 BAP	0	100	1.2e ^b	100	1.3cd	100	1.0cd
	0.05	100	1.2e	100	1.3cd	93.3	1.0cd
	0.2	100	1.3e	100	1.4c	100	1.2bcd
4	0	100	1.2e	100	1.2d	80.0	1.0d
	0.05	100	1.3de	100	1.3cd	100	1.1cd
	0.2	100	1.4d	100	1.4c	92.9	1.3bc
2,4-D 1 BAP	0	100	1.6c	100	2.0ab	75.0	0.9d
	0.05	100	1.9b	100	2.1a	100	1.7a
	0.2	100	2.0ab	100	2.1a	100	1.6a
2	0	100	1.7c	100	1.8b	71.4	1.1cd
	0.05	100	2.0ab	100	2.0ab	86.7	1.4ab
	0.2	100	2.1a	100	2.0ab	100	1.4ab

^b Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

과는 Table 3, Table 4 및 그림 2A와 같다. 신초형성은 BAP 2 mg/l 또는 TDZ 1 mg/l 단독 처리구 및 BAP 4 mg/l 와 NAA 0.2 mg/l 조합 처리구에서

Table 3. Effect of NAA, BAP and TDZ on direct shoot formation from explants of *Lavandula spica* cv. Marino in 60 days.

Treatment (mg/l)	Shoot form. (%)	No. of shoot	Shoot form. (%)	No. of shoot	Shoot form. (%)	No. of shoot
Shoot tip		Node		Internode		
NAA	0.01	0.0	0.0	80.0	2.0bc ^b	0.0
	0.1	0.0	0.0	80.0	1.5 c	0.0
	2.0	0.0	0.0	100	2.0bc	0.0
BAP	0.01	20.0	1.3c	100	1.6 c	0.0
	0.1	20.0	1.6c	100	2.4bc	0.0
	2.0	100	16.6a	100	3.1	20.0
TDZ	0.01	40.0	1.3c	40.0	1.5 c	0.0
	0.1	80.0	4.8b	100	2.0bc	40.0
	1.0	100	17.5a	100	5.0 a	80.0

Note: No shoot formed from leaf culture.

^b Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

양호하였다. 절편은 경정에서 신초의 형성이 가장 좋았고, 잎 절편에서는 신초가 형성되지 않았다.

본 실험에 사용된 BAP 2~4 mg/l 와 NAA 0.2 mg/l 의 조합 처리는 Calvo 와 Segura (1988, 1989a)가 *Lavandula latifolia*의 배측 절편의 배양에서 shoot의 유도에 사용한 BAP 2 mg/l 와 IAA 0.

Table 4. Effect of BAP and NAA on shoot formation from explants of *Lavandula spica* cv. Marino in 60 days.

Growth regulator (mg/l)	Shoot form. (%)	No. of shoot	Shoot height (cm)	Shoot form. (%)	No. of shoot	Shoot height (cm)
Shoot tip			Internode			
BAP 2 NAA	0	100	12.4ab ^b	1.6a	6.7	5.0a
	0.2	100	9.7bc	1.1abc	76.9	2.2b
	2.0	100	5.6d	0.6cd	40.0	3.7ab
4	0	100	5.7d	0.5d	0.0	0.0
	0.2	100	13.4a	1.3ab	26.7	2.8b
	1.0	100	7.1cd	0.8bcd	26.7	2.5b

Note: No shoot formed from leaf culture.

^b Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

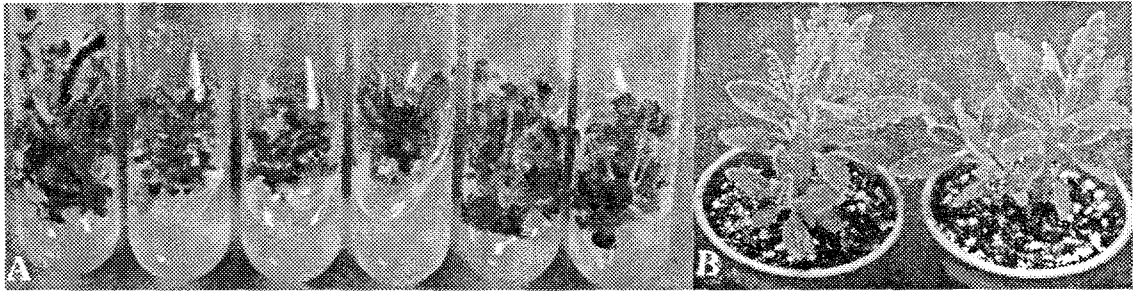


Fig. 2. A: Effect of BA and NAA on shoot formation in MS medium from shoot tip of *Lavandula spica* cv. Marino.
 left→right: BA 2, BA 2+NAA 0.2, BA 2+NAA 2, BA 4,
 BA 4+NAA 0.2, BA 4+NAA 1 (mg/l)
 B: In vitro-regenerated plants of *Lavandula spica* cv. Marino.

01 mg/l 의 조합 처리에서와 비슷한 경향을 보이는 것이었다.

기내증식에서 BAP 0.5 mg/l 와 NAA 0.01 mg/l 를 첨가한 B₅ 배지는 신초의 분화율 및 분화수가 각각 99.3%와 9.1개로 높았으나, 경정 배양에서 사용했던 BAP 2 mg/l 와 NAA 0.01 mg/l 를 첨가한 MS 배지는 신초의 분화율 및 분화수가 각각 53.3%와 5.2개로 저조하였다 (Table 5). 이는 식물의 발육단계에 따라 신초의 분화에 필요한 양분 및 성장 조절물질의 요구가 다르기 때문인 것으로 생각된다.

Table 5. Effect of different media and plant growth regulators on shoot proliferation of *Lavandula spica* cv. Marino.

Media	Growth regulators (mg/l)		Shoot form. (%)	No. of shoot	Shoot height (cm)
	BAP	NAA			
B ₅	0.5	0.01	99.3	9.1a ¹⁾	1.0a
SH	0.5	0.01	60.6	3.6b	0.4b
½MS	0.5	0.01	64.4	5.1b	0.5b
MS	0.5	0.01	55.0	4.6b	0.5b
MS	1.0	0.01	67.8	5.3b	0.4b
MS	2.0	0.01	53.3	5.2b	0.5b

Note: Shoots used in above experiment were regenerated from 1st subculture of *Lavandula spica* cv. Marino.

¹⁾ Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

B₅ 배지에 NAA, IAA 및 IBA를 각각 0.01, 0.1, 1 mg/l 의 농도별로 첨가하여 발근에 미치는 옥신류의 효과를 조사한 결과, 뿌리의 형성율은 NAA 0.1~1 mg/l 처리구에서 100%, IAA 1 mg/l 처리구에서 77.8%, IBA 0.1 mg/l 처리구에서는 71.4%로 나타났다 (Table 6). 뿌리의 수는 NAA 처리구가 IBA 및 IAA 처리구에 비해 많았으며, 농도가 높아짐에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. 뿌리의 길이는 IBA 및 IAA 처리구가 NAA 처리구에 비해 길었고 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다.

Table 6. Effect of NAA, IBA and IAA on root formation of *Lavandula spica* cv. Marino in B₅ medium.

Plant growth regulator (mg/l)	Rooting rate (%)	No. of root	Root length (mm)	
			Mean	SE
NAA	0.01	66.7	3.8±2.6	18.8±4.1
	0.1	100	5.2±4.0	8.0±4.3
	1.0	100	8.5±1.9	11.8±1.4
IBA	0.01	40.0	1.0±0.0	22.0±5.7
	0.1	71.4	3.0±1.0	21.7±3.2
	1.0	50.0	1.3±0.6	8.3±3.5
IAA	0.1	42.9	3.0±1.0	19.7±3.8
	1.0	77.8	5.3±1.1	15.6±5.9

Note: Shoots used in above experiment were regenerated from 2nd subculture of *Lavandula spica* cv. Marino.

재분화 식물체의 순화 및 RAPD분석

순화과정을 거치지 않은 유식물체를 재료 및 방법에 기술된 바와 같은 비닐하우스 조건에 이식하여 순화를 시켰을 경우, 30일 후 활착율이 94.4%로 높게 나타나 순화에는 큰 어려움이 없는 것으로 확인되었다 (Fig. 2B).

모본 1 개체와 재분화 식물체 중 9 개체를 선발하여 RAPD 분석을 수행한 결과, primer OPA 2, 4와 OPB 7의 경우, 모본과 재분화 식물체가 같은 band 형태를 보여주었고 (Fig. 3a, b, d), primer OPA 14의 경우, 하나의 특이 band가 관찰되었다 (3.85%; 1/26) (Fig. 3c). 본 실험 결과 얻어진 이러한 특이 band는 변이의 가능성이 높은 것으로, 일반적으로 다른 연구자들에 의해서도 조직배양을 통하여 재분화된 식물체들은 모식물체에서 나타나지 않았던 변이가 흔히 일어났다 (Shepard et al., 1980).

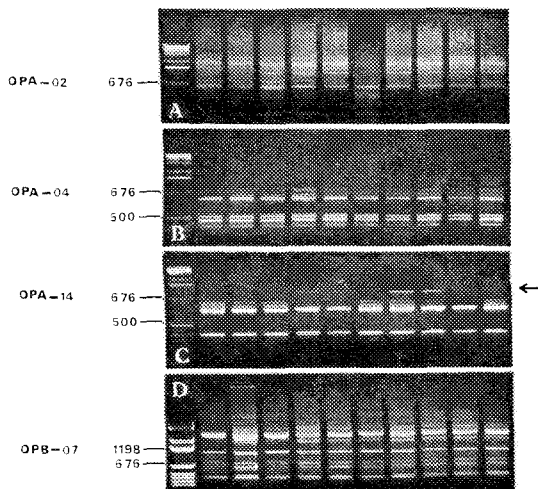


Fig. 3. RAPD analysis of regenerated plants of *Lavandula spica* cv. Marino using random primers. M: pGEM DNA marker, Lane 1: mother plant, Lane 2~10: regenerated plants.

적 요

라벤다의 기내배양을 통한 대량증식의 가능성을 알아보기 위하여 식물체 부위별 절편, 성장 조절물

질 및 배지가 캘러스 유지 및 유식물체의 분화에 미치는 영향과 기내증식 개체의 변이에 대해 조사하였다.

캘러스 유도는 잎 절편을 이용한 2, 4-D 1 mg/l 와 NAA 2 mg/l 의 단독 또는 BAP 0.05 mg/l 와의 조합 처리 조건에서 양호하였다. 신초의 분화에는 경정을 이용한 BAP 2~4 mg/l 단독 또는 BAP 4 mg/l +NAA 0.2mg/l 조합 처리가 가장 양호하였다. B₅ 배지에 BAP 0.5 mg/l 와 NAA 0.01 mg/l 가 조합 첨가되었을 때 신초의 증식이 9.1배로 높게 나타났다. 분화된 신초의 뿌리 형성은 NAA 0.1~1 mg/l 와 IAA 1 mg/l 에서 양호하였다. 기내에서 증식된 유식물체는 peatmoss: vermiculite:perlite (1:1:1, v/v/v) 혼합 상토에서 90% 이상의 높은 활착율과 양호한 생육을 보였다. 재분화 식물체의 RAPD 분석 결과 primer OPA 14에서 하나의 변이 band가 나타났다.

인 용 문 헌

- Banthorpe, D. V., H. J. Bilyard, and D. G. Watson. 1985. Pigment formation by callus of *Lavandula angustifolia*. *Phytochemistry* 24 : 2677 - 2680.
- Calvo, M. C., A. Jordan, and J. Segura. 1988. Plant regeneration from isolated cells of *Lavandula latifolia* Medicus. *In vitro* 24 : 943 - 946.
- Calvo, M. C. and J. Segura. 1988. In vitro morphogenesis from explants of *Lavandula latifolia* and *Lavandula stoechas* seedlings. *Hort. Sci.* 36 : 131 - 137.
- Calvo, M. C. and J. Segura. 1989a. In vitro propagation of Lavender. *Hort. Sci.* 24 : 375 - 376.
- Calvo, M. C. and J. Segura. 1989b. Plant regeneration from cultured leaves of *Lavandula latifolia* Medicus. Influence of growth regulators and illumination conditions. *Plant Cell, Tissue, Org Culture.* 19 : 33 - 42.
- Fourney, R. M., R. D. Dietrich, and M. C. Paterson. 1989. Rapid DNA extraction and sensitive alkaline blotting protocol: Application for detection of gene rearrangement and amplification for clinical

- molecular diagnosis. *Disease Markers* 7 : 15 – 26.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50 : 151 – 158.
- Jordan, A., M. C. Calvo, and J. Segura. 1988. Morphogenesis in callus and isolated cell cultures of *Lavandula latifolia*. In : 6th Congr FESPP. Split. Abstr. p14.
- Lappin, G. J., J. D. Stride, and J. Tampion. 1987. Biotransformation of monoterpenoids by suspension cultures of *Lavandula angustifolia*. *Phytochemistry* 26 : 995 – 997.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473 – 497.
- Quazi, M. H. 1980. In vitro multiplication of *Lavandula spp.* *Ann. Bot.* 45 : 361 – 363.
- Schenk, R. U. and A. C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50 : 199 – 204.
- Shepard, J. F., D. Bidney, and E. Shalin. 1980. Potato protoplasts in crop improvement. *Science* 28 : 17 – 24.
- Watanabe, K., F. Sato, M. Furuta, and Y. Yamada. 1985. Induction of pigment production by S-containing compounds on cultured *Lavandula vera* cells. *Agric. Biol. Chem.* 49 : 533 – 534.
- Webb, J. K., D. V. Banthorpe, and D. G. Watson. 1984. Monoterpene synthesis in shoots regenerated from callus cultures. *Phytochemistry* 23 : 903 – 904.