

낙엽송 (*Larix leptolepis*) 성숙배로부터 부정아 유도 및 식물체 재분화

김용욱* · 김준철¹ · 윤 양 · 노의래 · 손성호
임업연구원 임목육종부, ¹강원대학교 생물학과

Adventitious Bud Induction and Plant Regeneration from Mature Embryos in *Larix leptolepis*

KIM, Yong Wook* · KIM, Joon Chul¹ · YOUN, Yang · NOH, Eu Rae · SON, Sung Ho

Department of tree breeding, Forestry Research Institute, Suwon, 441-350, Korea

¹Department of Biology, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea

ABSTRACT. Adventitious buds were produced from the cultures of mature zygotic embryos of *Larix leptolepis* with the highest frequency of 91.7% in SH medium containing 1.0 mg/L zeatin. The most effective cytokinin combination for inducing adventitious buds was 1.0 mg/L zeatin + 1.0 mg/L thidiazuron (40.3%). The highest mean number of adventitious buds induced in 1.0 mg/L zeatin + 1.0 mg/L 2iP or 1.0 mg/L zeatin + 1.0 mg/L kinetin combined treatments. Elongation of the adventitious buds occurred the best on half strength LM salts medium, on which the buds elongated upto 27 mm. Also, the supplement of activated charcoal in medium suppressed the elongation of the adventitious buds. The highest frequency (23.3%) of rooting from elongated shoots was obtained on the medium containing 5.0 mg/L IBA and 0.2 mg/L NAA. The highest number (3.5) of roots was induced on the medium containing 5.0 mg/L IBA alone.

Key words: Rooting

서 론

우수한 형질을 지닌 임목을 선발한 후 그로부터 차대를 생산하고자 지난 수십년간 많은 연구가 이루어져 왔다. 가장 기본적인 임목육종 전략은 선발육종으로, 우수형질을 지닌 수형목을 선발하여 수형목끼리 교배하여 양친의 좋은 형질을 지닌 종자 생산이 되도록 채종원을 조성하여 다량의 개량된 종자를 생산하는 것이다. 또한 접·삽목과 같은 영양번식 기술도 개발하여 왔는데 (Farmer et al. 1986; Morgenstern 1987), 그 중 삽목방법이 현재 가장 많이 이용되고 있다. 그러나 삽목시 이용되는 삽수는 모수의 연령이 높아질수록 발근율은 현저히 감소하며 클론간에 많은 발근율 차이를 보여 일정한 양의 발근묘를 지속적으로 생산하기 어렵다. 그 대안으로 배

배양의 조직배양 기술을 통한 우량개체의 대량번식이 제안되고 있으며 침엽수종의 경우 대부분 종자배 및 발아묘 자엽 등의 유시성이 높은 조직을 주로 이용하고 있다. 그러나 단점은 종자배와 같이 유시성이 매우 높은 재료는 조직배양시 기관형성 등의 반응은 매우 좋으나 그로부터 번식된 식물체는 모수의 형질과 다른 유전자형을 가져 진정한 의미의 클론증식은 이루어지지 않고 있다.

Larch종의 부정아유도에 관한 첫 연구는 Bonga와 Mc-Innis (1983)가 *Larix laricina*의 발아중인 종자배 자엽 및 하배축을 배양하여 부정아를 유도한 이후로 *Larix decidua*의 자엽 및 하배축에서 연구가 이루어졌으며 (Karnosky and Diner 1984), 그 이후 Diner 등 (1986)은 *L. decidua*에서 종자배 자엽 및 하배축의 유시재료로부터 부정아유도, 신초 신장을 통해 번식시키는 배양기술을 확립하였다. 본 실험의 대상수종인 낙엽송의 부정아유도 연구는 Bonga와 Pond (1991)가 30년생 낙엽송 성숙목의 신초 원기에서 부정아를 유도한 것이 유일한 연구결과이며 낙엽송에 관한 연구는 거의 없다.

*Corresponding author. Tel 0331-290-1183
E-mail yongwookkim@hanmail.net

따라서 본 연구에서는 낙엽송의 성숙 종자배를 여러 종류의 식물생장조절물질이 첨가된 배지에 배양하여 부정아를 유도하고 이를 더욱 증식시킨 후 발근유도하여 완전한 식물체로 재분화시키기 위한 조직배양 기술을 개발하는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 낙엽송 종자배는 충북 충주에 위치한 낙엽송 클론 채종원에서 채취한 성숙종자로부터 분리하여 이용하였다. 채취한 종자는 사용때까지 4°C에서 보관하였으며, 종자 멸균은 30% H₂O₂ 용액에 30분간 담근 후 멸균증류수로 1회 세척한 다음 10% NaClO 용액에 30분간 진탕하고 다시 1회 세척하였다. 그후 1% HgCl₂ 용액에 20분간 처리한 다음 마지막으로 멸균증류수로 5회 세척 후 배양하였다. 종자는 종피를 제거한 후 배유조직 (female gametophyte)은 버리고 종자배만을 분리해 절단면을 배양배지면에 접하도록 하여 배양하였다.

배지 및 cytokinin 첨가

기본배지로서는 SH (Schenk and Hildebrandt 1972) 배지를 이용하였고 배지에 3% sucrose, 0.3% gellan gum (Sigma)을 첨가하였다. 식물생장조절물질은 BAP (6-benzylaminopurine), kinetin (6-furfurylamino-purine) 및 zeatin (6-[4-hydroxy-3-methyl-2-butenylamino]purine)을 0.5, 1.0, 2.0 mg/L 등의 3수준의 농도를 첨가하였고 TDZ (1,3-diphenylurea, thidiazuron)는 0.01, 0.05 및 0.1 mg/L 농도로 첨가하였다. 배지는 pH 5.7로 조정하였고 BAP 및 kinetin은 배지 열소독전에 첨가하였고 TDZ 및 zeatin은 1회 용 필터 (0.2 μm)를 이용해 여과멸균 후 열소독이 끝난뒤 배지온도가 45°C 정도로 식었을 때 첨가하였다. 배양조건은 25 ± 1°C, 16/8시간의 광주기하에서 배양하였고, 식물생장조절물질 처리구마다 성숙배를 20개씩, 3반복으로 각 처리구당 총 60개를 배양하였으며 배양 4주 후 식물생장조절물질이 없는 동일조성의 새로운 배지로 계대배양하였다. 배양 8주 후 배지, 식물생장조절물질 종류 및 농도에 따른 부정아 유도 및 신초 길이 등을 조사하였다.

Cytokinin 혼합처리

1.0 mg/L zeatin을 기본으로 첨가하고 1.0 mg/L TDZ, BAP, 2iP (6-γ-γ-dimethylallylaminopurine) 및 kinetin 등을 첨가시킨 처리구마다 성숙배를 20개씩, 3반복으로 처리구당

총 60개를 배양하였으며 배양4주 후 식물생장조절물질이 없는 동일조성의 새로운 배지로 계대배양하였다. 8주배양 후 부정아 유도율, 평균 부정아 유도수, BFC (bud forming capacity) 지수 및 신초 길이 등을 조사하였다.

신초의 신장

염류 농도를 1/2로 줄인 GD (Gresshoff and Doy 1972), LM (Litvay et al. 1985), LP (Quoirin and Lepoivre 1977) 및 SH 등의 기본배지에 1.0%의 활성탄 (Sigma)을 첨가한 처리구와 무첨가 처리구간의 신초 생존율 및 신장된 신초 길이를 배양 4주 후 조사하였다. 각 처리구당 신초를 10개씩, 2반복으로 총 20개의 신초를 배양하였다.

신초의 발근

1/4LM 기본배지에 2% sucrose를 첨가하였으며 발근처리구는 0.02-5.0 mg/L IBA 및 0.2 mg/L NAA가 첨가된 7처리구에서 4주배양 후 발근율, 발근수 및 캘러스 형성률을 조사하였다. 각 처리구당 신초를 10개씩, 3반복으로 총 30개의 신초를 배양하였다.

식물체 재분화

발근된 식물체가 5~7 cm 정도 길이가 되면 perlite : peatmoss : vermiculite (1 : 1 : 1)의 배양토로 이식한 후 투명한 비닐을 덮고 그 위로 투명한 아크릴판을 덮은 후 25 ± 1°C 조건의 배양실 (16시간 광주기)내에서 4주간 순화시켰다. 그리고 매일 1차례씩 스프레이를 이용해 관수하였고 4주 후에는 뚜껑을 서서히 열어 외부 환경에 순화시킨 8주 후에는 온실로 옮겨 pot 묘로 육성시켰다.

결과 및 고찰

배지 및 cytokinin 조합에 따른 부정아 유도

낙엽송 성숙종자배로부터 부정아유도시 배양배지, cytokinin 종류 및 농도효과를 조사하였는 바 1.0 mg/L zeatin 처리구에서 91.7%의 가장 높은 부정아 유도율을 보였지만 zeatin 농도간 유도율의 통계적 유의성은 인정되지 않아 부정아 유도율에는 동일한 효과를 보이고 있으나 다른 종류의 cytokinin 처리구보다 zeatin 처리구가 가장 효과적인 것으로 나타났다 (Table 1). 그리고 2 mm 이상의 신초 유도의 효과도 모든 zeatin 처리구에서 58.2~67.9%로 다른 종류의 cytokinin 처리구보다 훨씬 효과적이었다. Zeatin 첨가시 최고 부정아 유도율을 보인 예는 *Thuja occidentalis* (Harry et al.

Table 1. Effect of plant growth regulators on adventitious bud formation and shoot growth on SH medium from mature zygotic embryos of *Larix leptolepis*.

Medium SH	BAP	Plant growth regulators (mg/L)				Adventitious bud (% ± S.E.)	Shoot growth (%)	
		zeatin	kinetin	IAA	TDZ		<2 mm	>2 mm
	0.5					63.8 ± 14.2cd ^a	94.6	5.4
	1.0					62.7 ± 6.2cd	100	0
	2.0					85.1 ± 8.6abc	100	0
		0.5				88.3 ± 1.7a	32.1	67.9
		1.0				91.7 ± 6.7a	41.8	58.2
		2.0				86.7 ± 8.8ab	40.4	59.6
			0.5	0.05		53.3 ± 7.2d	93.8	6.2
			1.0	0.05		63.3 ± 3.4cd	92.1	7.9
			2.0	0.05		55.0 ± 2.9d	100	0
					0.01	65.0 ± 8.7bcd	94.9	5.1
					0.05	50.8 ± 2.9d	100	0
					0.1	48.3 ± 3.3d	100	0

^a Means with the same letters are not significantly different as determined by an analysis of variance with Duncan's Multiple Range Test. Pr>F: 0.0005, F value: 4.99.

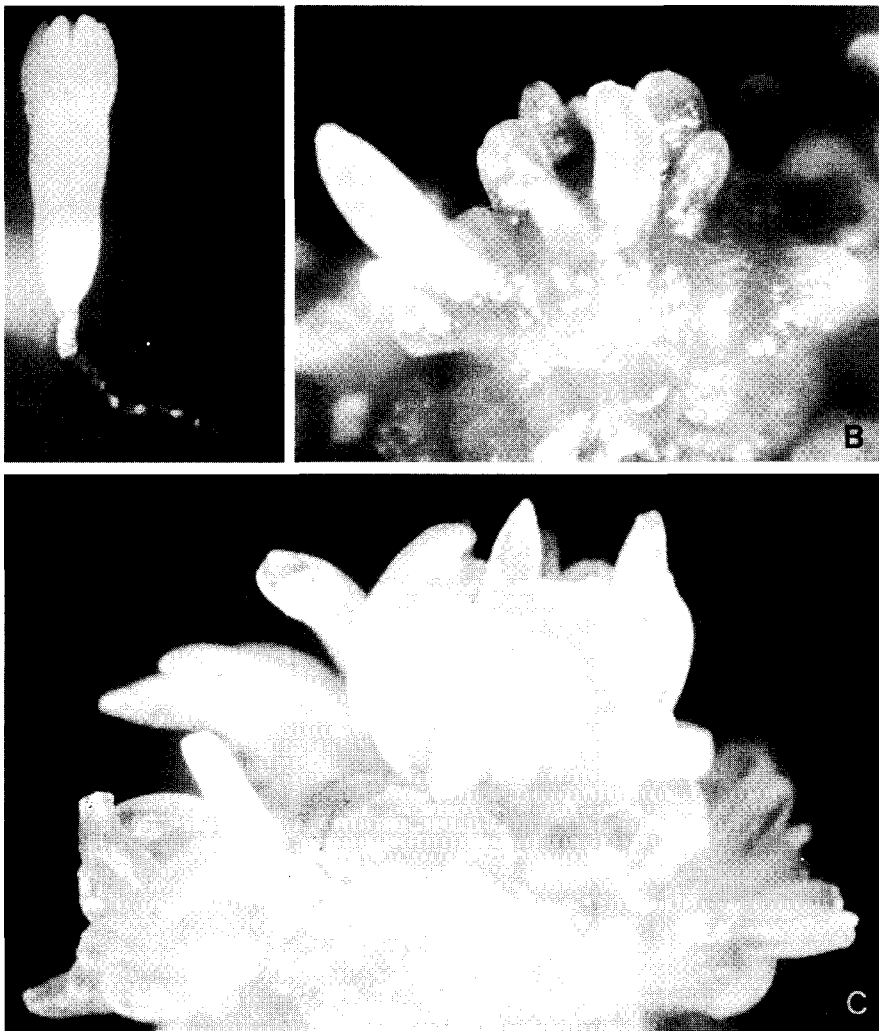


Figure 1. The induction of adventitious bud from mature zygotic embryos of *L. leptolepis*. (A) A freshly isolated mature embryo; (B) Adventitious shoot buds arising from the cultured embryo surface; (C) Further elongated adventitious buds after 4 weeks on induction medium and 2 more weeks on hormone-free SH medium.

1987), *Pinus halepensis* (Lambardi et al. 1993), 및 *Picea glauca* (Ellis et al. 1991) 등이지만 대부분의 경우 zeatin을 첨가하여 부정아 유도를 한 연구보고는 많지 않다. 반면 대부분 침엽수종의 경우 BAP 첨가가 가장 높은 유도율을 나타내는 것으로 보고하고 있는데 (Harry et al. 1995; Lambardi et al. 1995), Larch종의 경우 *L. occidentalis*에서는 2.0 mg/L BAP가 효과적이었고 (Chesick et al. 1990), *L. decidua* 실생묘배양의 경우 부정아 유도에는 1.0 mg/L BAP가 좋은 것으로 보고되었다. 또한 절편체당 부정아 유도수도 1.0 mg/L BAP 첨가가 효과적이라고 보고되어 (Diner et al. 1986) 수종별, 식물재료 종류에 따라 최적 BAP 농도가 다양함을 알 수 있다.

배양 1~2일 후 성숙종자배 (Figure 1A)의 하배축부위는 붉은색으로 바뀌며 배양 2주 후에는 유근, 하배축 및 자엽부위가 길게 신장함을 관찰할 수 있었다. 그리고 zeatin 및 TDZ의 모든 농도처리구에서는 최초로 소수의 연녹색의 부정아 원기가 형성되었으나 더 이상의 원기발달은 보이지 않았다. 식물생장조절물질이 첨가된 배지에서 무첨가배지로 계대 배양 4주 후에는 기존의 신초는 점차

갈변화되는 경향을 보였고 갈변화된 자엽중앙에 녹색을 띤 dome 모양의 부정아원기 형성이 새로이 이루어졌다. 또한 1.0 mg/L zeatin 첨가 배지에서 유래한 절편체는 하배측과 신초 원기부위에 구형의 부정아가 많이 유도됨을 관찰할 수 있었다 (Figure 1B). 배양8주 후에는 캘러스조직 사이로 새로운 신초 부정아 형성이 시작되었으며 이미 유도된 신초는 길이 생장이 더욱 신장되는것을 관찰할 수 있었다 (Figure 1C).

Cytokinin 혼합처리에 따른 부정아 유도

Douglas fir에서 최초로 cytokinin을 혼용처리하여 부정아 유도효과를 보고한 이래 Cheng (1975) 이에 관한 실험이 침엽수종에서 많이 이루어졌다. Table 2는 종자배로부터 부정아 유도시 여러 종류의 cytokinin 혼합처리 효과를 조사한 것으로 1.0 mg/L zeatin + 1.0 mg/L TDZ 처리구에서 40.3%의 가장 높은 유도율을 보였으며 1.0 mg/L zeatin + 1.0 mg/L 2iP 처리구에서는 23.8%의 유도율을 보여 단독처리구에 비해 유도율이 떨어지는 경향을 보였다. 그리고 평균 부정아 유도수는 1.0 mg/L zeatin + 1.0 mg/L 2iP 및 1.0 mg/L zeatin + 1.0 mg/L kinetin 처리구에서 종자배당 1.9개로 동일한 유도수를 보여 단독 처리구에 비해 그 효과는 비슷하였다. 부정아 형성능을 나타내는 BFC 지수는 7.98을 보인 1.0 mg/L zeatin + 1.0 mg/L 2iP 처리구에서 가장 높았고 4.47의 BFC를 보인 1.0 mg/L zeatin + 1.0 mg/L TDZ에서 가장 낮았다. 신초 길이에 대한 효과로서는 1.0 mg/L zeatin + 1.0 mg/L 2iP (57.9%) 및 1.0 mg/L zeatin + 1.0 mg/L TDZ (55.2%)의 처리구에서 효과적이었다. *Picea rubens*의 종자배 자엽의 경우 1.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L 2iP처리구에서 가장 높은 부정아 유도율을 보였고 (Lu et al. 1991), *Picea abies*의 발아묘 자엽배양시에는 0.5 mg/L zeatin + 0.05 mg/L kinetin 처리구에서 가장 길이가 긴 신초가 가장 많이 유도되었으나 4 mm 이

상의 신초는 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 처리구에서 가장 많이 유도되어 (Ewald and Suss 1993) 본 실험과는 차이를 보였다. 본 실험의 2 mm 이상의 길이를 보인 신초 유도수는 1.0 mg/L zeatin + 1.0 mg/L kinetin 처리구에서 26.1%로 낮게 나타나 *Picea abies*의 발아묘 자엽배양 결과와 유사함을 보였는데 이는 1.0mg/L zeatin에 kinetin 첨가보다는 2iP 혹은 TDZ가 보다 신초의 신장에 효과적인 것으로 사료된다. 그리고 부정아 유도를 위한 table 1의 cytokinin 단독처리와 table 2의 혼합처리를 비교해보면 zeatin의 단독처리가 훨씬 효과적인 것으로 보인다.

신초증식

성숙종자배로부터 분화된 신초 발근유도를 위해 신초를 더욱 생장시킬 필요가 있는데 table 3은 효과적인 줄기증식의 결과로서 1/2GD 배지에 활성탄을 첨가하지 않은 처리구에서 가장 높은 신초생존율 (100%)을 보였고 1.0% 활성탄 무첨가구에서는 배지종류에 관계없이 모두 75~100%까지 높은 생존율을 보여 처리구간의 생존율은 비슷한 것으로 나타났다. 반면 1/2GD 배지에 1.0% 활성탄 첨가구를 제외한 3가지 활성탄 첨가구에서는 신초 생존율이 55~60%까지 보여 활성탄 무첨가구보다 낮은 생존율을 보였다. 신초 생장길이의 경우 처리구 간에는 많은 차이를 보였는데 특히 1/2LM 배지에서 증식된 신초는 원래 길이보다 27 mm 정도 길이신장을 보여 가장 효과적인 처리구였으며 활성탄 무첨가 처리구간에서도 많은 신초 길이 차이를 보였으나 1.0% 활성탄의 첨가구에서는 0.2~0.9 mm 정도의 길이신장만 보여 신초 증식에는 거의 효과가 없었다.

*Pinus banksiana*의 경우 배지내에 0.05~0.5% 활성탄을 첨가함으로써 신초내에 잔존한 식물생장조절물질 및 신초로부터 분비되는 페놀성 물질의 흡수로 신초 활력에 더욱 효과가

Table 2. Effect of various combinations of cytokinins on adventitious bud formation and shoot growth from mature zygotic embryos of *Larix leptolepis* on the medium with 1.0 mg/L zeatin.

Treatments (mg/L)	Adventitious buds (% ± S.E.)	Mean no. of buds (x ± S.E.)	BFC index ^a	Shoot growth (%)	
				<2 mm	>2 mm
1.0 TDZ ^c	40.3 ± 3.7a ^b	1.8 ± 0.3a ^c	4.47	44.8	55.2
1.0 BA	36.3 ± 5.6ab	1.7 ± 0.2a	4.68	86.2	13.8
1.0 2iP	23.8 ± 5.3b	1.9 ± 0.1a	7.98	42.1	57.9
1.0 Kinetin	28.8 ± 2.3ab	1.9 ± 0.2a	6.59	73.9	26.1

^aBFC (bud forming capacity) index = (no. of buds per embryo)/(% of embryo forming buds) × 100.

^bMeans with the same letters are not significantly different as determined by an analysis of variance with Duncan's Multiple Range Test. Pr>F: 0.1080, F value: 2.81.

^cPr>F: 0.8856, F value: 0.21.

Table 3. Effect of various media on the elongation of shoots induced from zygotic mature embryos of *Larix leptolepis*.

Treatments	Survival of shoot (% ± S.E.)	Length of elongated shoot (mm)
1/2GD + 1.0% charcoal	90.0 ± 5.1abc ^a	0.6 ± 0.2c ^b
1/2LM + 1.0% charcoal	60.0 ± 11.1cd	0.9 ± 0.3c
1/2LP + 1.0% charcoal	65.0 ± 17.6bcd	0.2 ± 0.08c
1/2SH + 1.0% charcoal	55.0 ± 10.4d	0.3 ± 0.1c
1/2GD	100.0a	4.7 ± 1.3bc
1/2LM	95.0 ± 3.8ab	27.0 ± 5.4a
1/2LP	85.0 ± 11.5abcd	10.2 ± 2.4b
1/2SH	75.0 ± 12.7abcd	5.3 ± 0.8bc

^aMeans with the same letters are not significantly different as determined by an analysis of variance with Duncan's Multiple Range Test. Pr>F: 0.053, F value: 2.61.

^bPr>F: 0.0001, F value: 17.86.

Table 4. Effect of auxin on the rooting of shoots induced from zygotic mature embryos of *Larix leptolepis*.^a

Treatments (mg/L)	Shoots forming root (% ± S.E.)	Mean no. of roots (x ± S.E.)	Callus formation (%)
0.02 IBA	0.0 ± 0.0c ^b	0.0 ± 0.0d ^c	0.0
0.2 IBA	20.0 ± 5.8ab	3.3 ± 0.3ab	26.7
2.0 IBA	20.0 ± 5.8ab	2.5 ± 0.2b	93.3
5.0 IBA	13.3 ± 3.3abc	3.5 ± 0.4a	100
0.2 IBA+0.2 NAA	6.9 ± 3.1bc	1.5 ± 0.2c	86.2
2.0 IBA+0.2 NAA	6.7 ± 3.4bc	3.0 ± 0.2ab	96.7
5.0 IBA+0.2 NAA	23.3 ± 6.7a	2.6 ± 0.2b	100

^a Basal medium: ¼LM + 2% sucrose.

^b Means with the same letters are not significantly different as determined by an analysis of variance with Duncan's Multiple Range Test. Pr>F: 0.0211, F value: 3.67.

^c Pr>F: 0.0001, F value: 23.98.

있어 지속적인 배양시 유기되는 갈변화 (browning)도 방지하였다는 보고가 있으나 (Harry et al. 1995) 본 실험의 경우 1% 활성탄 첨가시에는 무첨가보다 더욱 낮은 신초 생존율을 보여 위의 결과와 상반되는 경향을 보였다. 또한 각 수종마다 최대 신초 증식을 보이는 배지는 수종간에 많은 차이를 보여 일정한 경향을 찾기는 힘들지만 *Thuja occidentalis* 경우 ½ LP배지에서 1.5~2 cm의 최고 신장률을 보여 (Harry et al. 1987) 수종간에 신초 증식을 위한 적정 배지가 다양함을 알 수 있다.

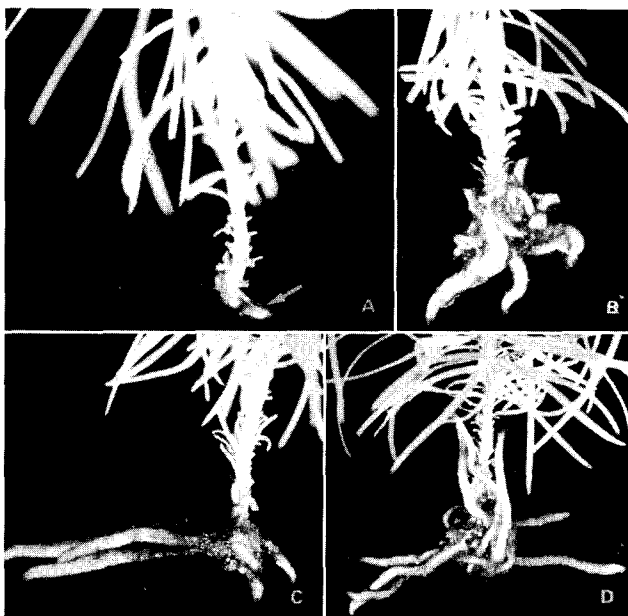


Figure 2. Various rooting patterns of shoot regenerated from mature zygotic embryo of *L. leptolepis*. (A) A newly induced root (arrow) after 2 weeks on rooting medium; (B) S-shaped roots; (C) Mixed pattern of B and D; (D) Up-right and lateral side oriented rooting pattern.

발근

발근유도를 위한 auxin처리는 대부분 IBA (Chesick et al. 1991) 혹은 NAA의 단용처리 (Harry and Thorpe 1994) 및 혼용처리를 하며 처리방법으로는 배지에 첨가하는 방법 (Sen et al. 1994), 8시간에서 5일까지 짧은 시간에 고농도로 침지 처리하는 방법 (Lambardi et al. 1993), perlite 및 peatmoss와 같은 배양토에 미리 식물생장조절물질을 첨가시켜 발근유도하는 기외발근법 (Harry et al. 1995) 등 다양한 방법이 사용되고 있다. 따라서 table 4는 신장된 신초로부터 여러가지 발근처리를 한 결과로서, 5.0 mg/L IBA 및 0.2 mg/L NAA를 첨가한 배지에서 가장 높은 23.3%의 발근율을 보였으며 0.2 혹은 2.0 mg/L IBA 처리구에서도 20%의 발근율을 보여 유사한 효과를 보였다. 그러나 0.2 및 2.0 mg/L IBA에 0.2 mg/L NAA가 첨가된 처리구에서는 각각 6.9%, 6.7%의 저조한 발근율을 보였다. 특히 0.02 mg/L IBA처리구에서는 전혀 발근이 이루어지지 않아 다른 처리구와 많은 차이를 보여 식물생장조절물질 종류 및 농도에 따라 그 효과가 달리 나타났다. 평균 발근수에 있어서는 5.0 mg/L IBA 처리구에서 가장 많은 3.0개의 발근수를 보였고 0.2 mg/L IBA 및 2.0 mg/L IBA + 0.2 mg/L NAA 처리구에서 발근수는 각각 3.3, 3.0로 효과가 있었으나 0.02 mg/L IBA 처리구에서는 전혀 발근유도 효과가 없어 발근처리에 따라 많은 차이를 보였다.

발근유도에는 대개 IBA 및 NAA와 같은 auxin류의 영향으로 신초 하단부에서는 캘러스형성이 자주 관찰되는데 본 실험에서도 0.02 및 0.2 mg/L IBA처리구를 제외하고는 86.2~100%까지의 높은 캘러스 형성을 보였다. *Pinus ayacahuite*의 신초 발근시 0.8 혹은 4 μM NAA와 20 μM IBA를 혼용처리시에는 캘러스형성은 전혀 없었으며, 100 μM NAA를 18시간 처리시에는 40% 이상의 발근율 및 캘러스형성 감소를 보고하여 (Saborio et al. 1997) 발근방법에 따라서 그 효율은 많은 차이를 보이므로 각 수종마다 가장 효과적인 auxin 종류 및 농도, 발근방법 등의 최적조건을 찾아야 할 것이다.

발근배지에서 배양 2~3주 후에는 줄기하단부에 0.5~0.7 cm 길이의 뿌리형성을 관찰할 수 있었으며 (Figure 2A) 또한 사용된 auxin 종류 및 농도에 관계없이 3가지 발근유형을 보였다 (Figure 2B, 2C, 2D). 그 중 한 유형은 뿌리 끝부분이 약간 휘어진 S자 모양이며 (Figure 2B), 또 다른 유형은 줄기 끝부분을 중심으로 좌,우 및 윗쪽으로 길게 뻗은 유형 (Figure 2D), 마지막으로 앞의 두가지 유형이 혼재하는 유형 (Figure 2C) 등의 여러 형태의 발근유형을 보였다. 이러한 발근유형은 *Larix laricina*의 실생묘 하배측의 발근유도시 auxin을 처리하지 않은 배지에서의 발근유형은 좌,우 길게 뻗은 발근형태를 보였고, 0.2 mg/L IBA 첨가시에는 3~4개의 주근이 아래로 뻗은 형태를 보였으며 75 μM ethephon 첨가시에는 3~4개의 주근을 중심으로 좌,우로 타원형의 발근유

형을 보여 여러 유형의 발근을 보고하고 있어 (Stein and Fortin 1988) 본 실험에서 관찰된 발근유형과 유사하였다.

식물체 재분화

발근배지에서 8주 배양하여 발근된 식물체 (Figure 3A)를 시험관에서 꺼내 perlite : peatmoss : vermiculite (1 : 1 : 1)의 배양토로 옮겨 배양실 환경조건하에서 4주간 순화시켰다. 순화과정이 끝난 후 활력이 있는 식물체 (Figure 3B)는 온실로 옮겨 계속 생장을 시켰는데 3년 후 동일한 수령을 가진 실생묘와 비교하여 (Figure 3C) 외형상의 침엽모양이나 길이생장에서 거의 유사함을 보였다.

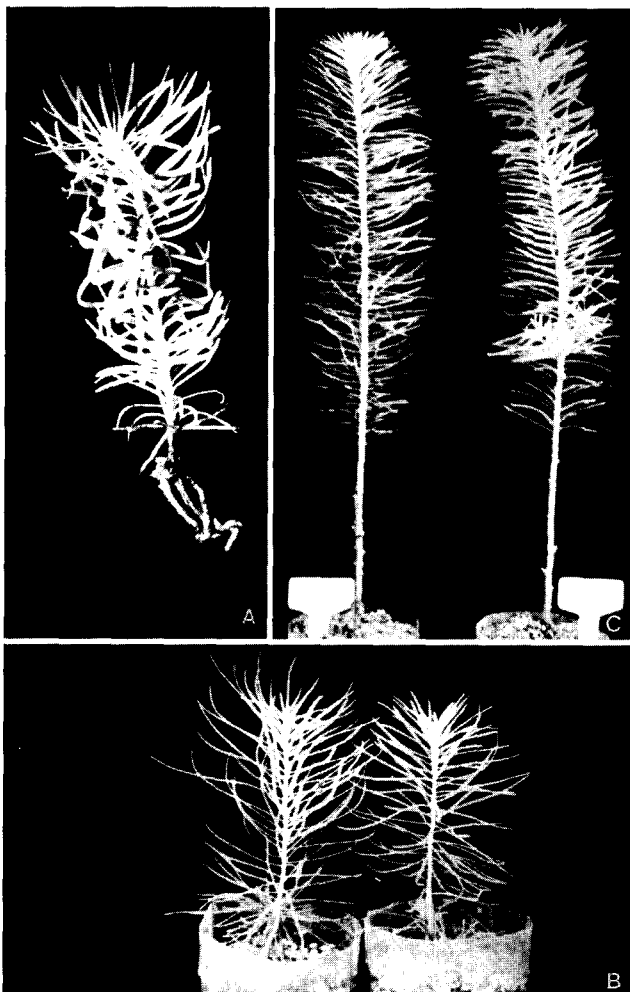


Figure 3. The plants regenerated from mature zygotic embryos of *L. leptolepis* via adventitious bud induction. (A) A rooted plantlet; (B) The plants regenerated from embryo culture; (C) The plant recovered from embryo culture (left) shows similar shoot growth compared with the seedling (right) after three years.

적 요

본 연구는 낙엽송 (*Larix leptolepis*)의 종자배로부터 배양을 통한 식물체 재분화까지의 최적조건을 구명코저 수행되었는데 그 결과는 다음과 같이 요약할 수 있다. 최대 부정아 유도율은 SH배지에 1.0 mg/L zeatin을 첨가한 처리구에서 가장 높은 91.7%의 부정아 유도율을 보였으며, cytokinin 혼용처리를 한 부정아 유도는 1.0 mg/L zeatin + 1.0 mg/L TDZ 처리구에서 40.3%로 가장 높은 유도율을 보였다. 그리고 평균 부정아 유도수는 1.0 mg/L zeatin + 1.0 mg/L 2iP 및 1.0 mg/L zeatin + 1.0 mg/L kinetin 처리구에서 종자배당 1.9개로 동일한 유도수를 보여 그 효과는 비슷하였다. 부정아의 길이생장은 염류량을 절반으로 줄인 1/2LM배지에서 계대배양하였을 때 가장 높은 27 mm의 신초가 생성되어 가장 효과적인 처리구 나타났다. 증식된 신초의 발근율은 5.0 mg/L IBA 및 0.2 mg/L NAA 첨가시 23.3%로 가장 높았고 신초에서 유도된 뿌리수는 5.0 mg/L IBA 처리구에서 신초당 3.5개로 가장 많았다.

인용문헌

- Bonga JM, Pond SE (1991) Adventitious shoot formation in cultures of 30-year-old *Larix decidua*, *L. leptolepis*, *L. eurolepis*, and *L. laricina* trees. *Plant Cell Tiss Org Cult* 26: 45-51
- Bonga JM, McInnis AH (1983) Origin and early development of roots in plantlets derived from embryo sections of *Larix laricina* in vitro. *Can For Ser Res Notes* 3:12-14
- Cheng TY (1975) Adventitious bud formation in culture of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb) Franco.). *Plant Sci Lett* 5:97-102
- Chesick EE, Bilderback DE, Blake GM (1990) In vitro multiple bud formation by 20-year-old western larch buds and stems. *HortSci* 25:114-116
- Chesick EE, Mohn CA, Hackett WP (1991) Plantlet multiplication from white pine (*Pinus strobus* L.) embryos in vitro: bud induction and rooting. *Plant Cell Tiss Org Cult* 36:107-114
- Diner AM, Karnosky DF (1986) Potential for genetic engineering in *Larix*. In : Research and Development Conference, Sep 1986, Tappi, Atlanta, pp 93-94
- Diner AM, Strickler A, Karnosky D (1986) Initiation, elongation and remultiplication of *Larix decidua* micropropagules. *New Zealand J For Sci* 16:306-318
- Ellis DD, Barczynska H, McCown BH, Nelson N (1991) A comparison of BAP, zeatin and thidiazuron for adventitious bud formation from *Picea glauca* embryos and epicotyl explants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 27:282-287
- Ewald D, Suss R (1993) A system for repeatable formation of elongating adventitious buds in Norway spruce tissue cultures. *Sil*

- Gen 42:169-175
- Farmer RE, Foster HA, Bakowsky O, MacDonald B, O'keilly G, Reinholt R** (1986) A vegetative propagation system for tamarack. *New Zealand Appl For* 3:91-93
- Gresshoff PM, Doy CH** (1972) Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta* 107:161-170
- Harry IS, Pulido CM, Thorpe TA** (1995) Plantlet regeneration from mature embryos of *Juniperus cedrus*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 41:75-78
- Harry IS, Thompson MR, Lu CY, Thorpe TA** (1987) *In vitro* plantlet formation from embryonic explants of eastern white cedar (*Thuja occidentalis* L.). *Tree Physiol* 3:273-283
- Harry IS, Thorpe TA** (1994) Regeneration of plantlets through organogenesis from mature embryos of jack pine. *Plant Cell Tiss Org Cult* 37:159-164
- Karnosky DF, Diner AM** (1984) Techniques for increasing clone sizes in *Larix*. In: *Proc 6th Int Congr Plant Tissue and Cell Culture*, Univ, Minnesota, Minneapolis, pp 10
- Lambardi M, Capuana M, Sozzi L, Giannini R** (1995) Factors affecting *in vitro* adventitious bud induction from excised embryos of Swiss stone pine (*Pinusembra* L.). *For Sci* 2:49-58
- Lambardi M, Sharma KK, Thorpe TA** (1993) Optimization of *in vitro* bud induction and plantlet formation from mature embryos of aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.). *In Vitro Cell Biol* 29:189-199
- Litvay JD, Verma DC, Johnson MA** (1985) Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Rep* 4: 325-328
- Lu CY, Harry IS, Thompson MR, Thorpe TA** (1991) Plantlet regeneration from cultured embryos and seedling parts of red spruce (*Picea rubens* Sarg.). *Bot Gaz* 152:42-50
- Morgenstern EK** (1987) Methods for rooting of larch cuttings and application in clonal selection. *For Chron* 63:174-178
- Quoirin M, Lepoivre P** (1977) Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Horticulture* 78: 439-432
- Saborio F, Dvorak WS, Donahue JK, Thorpe TA** (1997) *In vitro* regeneration of plantlets from mature embryos of *Pinus ayacahuite*. *Tree Physiol* 17:787-796
- Schenk RV, Hildebrandt AC** (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50:199-204
- Sen S, Magallanes-Cedeno ME, Kamps RH, McKinley CR, Newton RJ** (1994) *In vitro* micropropagation of Afghan pine. *Can J For Res* 24:1248-1252
- Stein A, Fortin A** (1988) Pattern of root initiation by an ectomycorrhizal fungus on hypocotyl cuttings of *Larix laricina*. *Can J Bot* 68:492-498

(접수일자 1999년 8월 20일)