

나리 'Gelria'의 기내인편에서 유도된 callus 배양을 통한 자구의 재분화

한봉희* · 예병우 · 박천호¹

원예연구소 초본화훼과, ¹고려대학교 원예학과

Bulblet Regeneration through the Callus Culture induced from Bulb Scales of *Lillium longiflorum* 'Gelria'.

HAN, Bong Hee* · YAE, Byeong Woo · PARK, Chun Ho¹

National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon 440-310, Korea.

¹Department of Horticulture Korea University, 5-1 Anarm, Sungbuk, Seoul, 136-701

ABSTRACT This study was conducted to establish a regeneration system of plantlets through callus culture induced from bulb scales of *Lillium* 'Gelria'. Friable callus was induced very easily from bulb scales, and grew vigorously on medium lacking growth regulators. In media with 0.5~1.0 mg/L kinetin and 0.1~1.0 mg/L NAA, 100% of explants produced callus. Proliferation of callus was actively occurred on media containing 0.1~1.0 mg/L kinetin and 0.1~1.0 mg/L NAA. Callus proliferation and regeneration of bulblets from callus were occurred simultaneously. Light condition was more effective for the callus proliferation and solid medium was better than liquid medium. Although callus was proliferated vigorously on media containing 0.1~1.0 mg/L BA and NAA, the frequency of plantlet regeneration was better on medium without growth regulators, then on medium with 0.1 mg/L BA and NAA.

서 론

캘러스 배양에 의한 간접적인 방법으로 식물체를 재생하는 방법은 식물체를 연속적으로 대량증식할 뿐만 아니라, 유전자 조작에 의한 새로운 식물체를 생산할 수 있는 가능성을 열어 놓았다 (Enaksha et al. 1994). 캘러스 배양을 통한 소식물체와 자구의 생산이 Easter lily (Sheridan 1968; Priyadarshi and Sen 1992; Park et al. 1997)와 *Lillium* Oriental Hybrids (Simmonds and Cumming 1976) 및 다른 나리 종 (Stimart et al. 1980)에서 보고되었다. *Lillium longiflorum*은 기내인편에서 자구를 직접 유기시킴으로써 효과적으로 증식시킬 수 있었다고 보고 (Stimart and Ascher 1978)된 이래, 인편배양을 통한 나리증식은 안정적이라는 이유로 널리 사용되어 왔다. 최근에 Enaksha 등 (1994)은 Easter lily의 캘러스 배양을 통하여 식물체를 더 빠르게 증식시키고, 안정성 있게 개화까

지 시킬 수 있었다고 보고하였다. 또한 Priyadarshi와 Sen (1992)은 Easter lily의 캘러스 배양에서 분화된 캘러스를 염색체 변화 없이 3년 동안 안정성 있게 유지할 수 있었으며, 이러한 캘러스는 3년 후에도 재생능력을 보유하고 있었다고 발표하였다. 그러나 이러한 캘러스를 경유한 간접적인 식물체 재생방법은 배양조건을 구명하기까지 시간이 오래 걸리고, 종에 따라서는 배양기간이 길어지며 유전적으로 불안정할 수 있다는 등의 문제로 실용화되지 못하고 있다 (Park et al. 1997). 따라서 본 연구는 나리 'Gelria'의 인편에서 캘러스를 유도, 증식시키고, 증식된 캘러스에서 식물체를 재분화하여 캘러스 배양을 통하여 식물체를 대량증식하고자 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료는 당 90 g/L가 첨가된 MS 기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에서 4개월간 배양된 *Lilium longiflorum* 'Gelria' 자구의 중간부위 인편을 사용하였다. 배지는 MS 기

*Corresponding author. Tel 031-240-3644
E-mail bhhan@rda.go.kr

본배지에 당 30 g/L가 첨가된 배지를 사용하였으며, kinetin과 NAA 0.0~1.0 mg/L를 혼용으로 첨가하여 인편에서 캘러스를 유기하였고, 캘러스의 증식 및 자구의 재분화를 위하여는 0.0~1.0 mg/L의 kinetin과 NAA, 0.0~1.0 mg/L의 BA와 NAA가 혼용으로 첨가된 배지에 flask당 유도된 캘러스 0.5 g을 배양하였다. 또한 배양환경 및 배양조건이 캘러스의 증식 및 증식된 캘러스로부터 자구의 재분화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.0~1.0 mg/L의 kinetin과 NAA가 혼용으로 첨가된 배지에 flask당 캘러스 0.5 g을 치상하여 고체배양과 액체배양, 명배양과 암배양하였다. 고체배양은 한천 8 g/L가 첨가된 배지를 이용하였으며, 액체배양은 왕복 shaker에서 120 rpm으로 수행하였다. 100 ml의 삼각 flask에 25 ml의 배지를 분주하여 pH를 5.8로 조절한 다음, 121°C에서 15분 동안 고압멸균하였다. 인편에서 캘러스를 유기하기 위하여 삼각flask에 6개의 인편을 배양하여 처리당 flask 4개로 4반복하였으며, 형성된 캘러스에서 캘러스의 증식 및 자구의 재분화를 위하여는 flask 당 0.5 g의 캘러스를 배양하여 처리당 flask 4개로 4반복하였다. 캘러스의 유기 및 유기된 캘러스에서 캘러스의 증식은 배양 8주 후에, 증식된 캘러스에서 자구의 재분화는 배양 4개월 후에 캘러스의 유기 및 증식정도, 자구의 재분화수 등을 조사하였다. 배양은 25±2°C로 조절되는 배양실에서 배양하였으며, 암배양을 제외하고 형광등 40 μmol · m⁻² · sec⁻¹로 16시간/일 조명하면서 실시하였다.

결과 및 고찰

인편에서 캘러스의 유도는 성장조절제가 전혀 첨가되지 않은 배지에서도 47%가 유도되었으며, kinetin 0.5~1.0 mg/L와 NAA 0.1~1.0 mg/L가 첨가된 배지에서는 유연성이 높고 약간 녹색을 띤 노란색의 캘러스가 100% 유도되었다. 유도된 캘러스의 생체중은 kinetin 농도가 높아짐에 따라 증가하는 경향을 보였으며, kinetin 1.0 mg/L와 NAA 0.1 mg/L가 첨가된 배지에서 캘러스의 무게가 828.5 mg으로 가장 무거웠다.

Lillium longiflorum 종들은 식물체 각 부위에서 쉽게 캘러스를 얻을 수 있으며 이러한 결과는 Stimart와 Asher (1978)에 의하여도 발표된 바 있다. 또한 Enaksha 등 (1994)은 Easter lily의 캘러스 배양에서 엽과 줄기조직을 0.1 mg/L의 2.4-D와 BA가 첨가된 배지에서 8주간 배양하여 캘러스를 유도하였고, Stimart 등 (1980)도 나리 'Black Beauty'의 중간 교잡종 인편을 2개월 배양하여 캘러스를 유도하였으며, 유도된 캘러스는 성장조절제가 없는 배지에서 양호하게 증식되었다고 하였다. 본 실험에서도 성장조절제가 첨가되지 않은 배지에서도 47%의 캘러스가 유도되었고 kinetin 0.5~1.0 mg/L와 NAA 0.1~1.0 mg/L가 첨가된 배지에서 100%의 캘러스 유도율을 나타내어 쉽게 캘러스가 유도되었다 (Table 1).

0.5 g의 유도된 캘러스를 kinetin과 NAA가 혼용으로 첨가

된 배지에서 8주간 배양하여 증식시킨 결과 (Table 2), 성장조절제가 첨가되지 않은 배지에서도 증식률이 4.4배로 캘러스 증식이 양호하였으며, 성장조절제가 첨가된 배지에서는 증식률이 이보다 높아 캘러스의 증식이 매우 왕성한 것으로 나타났다. 또한 대조구 및 성장조절제가 첨가된 배지에서 캘러스로부터 신초가 발생하여 'Gelria'는 캘러스의 증식과 신초의 재분화가 동시에 발생하였다.

Simmonds와 Cumming (1976)은 Oriental Hybrid의 인편을 5μM의 BA와 2.4-D가 첨가된 배지에서 배양하여 캘러스를 유기하였으며, 일단 유도된 캘러스는 성장조절제가 첨가되지 않은 배지에서도 왕성하게 증식되었다고 보고하였고, Stimart 등 (1980)도 동일한 결과를 보고하였다. 본 실험에서도 성장조절제가 첨가되지 않은 배지만 아니라 성장조절제가 첨가된 배지에서도 캘러스가 왕성하게 증식되었다. 그러나 대조구 및 성장조절제가 첨가된 배지에서 캘러스로부터 신초가 발생하였다. Park 등 (1997)은 'Gelria'의 캘러스 배양에서 유도된 캘러스는 재분화 성향이 매우 강하여 NAA와 BA가 첨가된 캘러스 유도배지에서 캘러스 유지가 어려웠다고 보고하여 'Gelria'는 캘러스의 증식과 신초의 재분화가 동시에 발생한다는 것을 지적하였다.

유도된 캘러스를 명, 암상태에서 8주간 배양한 결과 (Table 3), 캘러스의 증식 및 신초의 발생이 암배양보다는 명배양에서 높아 명배양이 암배양보다 캘러스의 증식 및 신초의 재분화를 촉진하는 것으로 나타났다. Enaksha 등 (1994)은 Easter lily의 캘러스 배양에서 암상태에서 3회 계대배양 후, 캘러스를 명상태로 옮기면 암상태보다 더 캘러스 증식률을 높일 수 있었다고 보고하여 본 실험 결과와 유사하였다.

배양방법이 캘러스의 증식 및 신초의 재분화에 미치는 영향을 조사한 결과, 배양 8주 후 캘러스의 증식배수 및 신초수가 액체배양보다는 고체배양에서 높아 액체배양보다는 고체배양이 캘러스의 증식 및 신초의 분화를 촉진시키는 것으로 나타났다 (Table 4). 또한 액체배양에서는 증식된 캘러스 및 분화된 신초가 모두 투명화되는 경향을 나타내어 'Gelria'의 캘러스 증식 및 신초의 재분화에 액체배양은 부적절하였다 (결과생략). Enaksha 등 (1994)은 Easter lily 배양에서 소시물체 및 녹색 캘러스의 일부는 부풀어 오르는 투명화 현상을 나타낸다고 하여 Easter lily의 캘러스 배양에서 투명화가 나타날 수 있다는 것을 암시하고 있으며, 이러한 투명화 현상은 gelrite를 0.8%의 한천으로 대용하였을 때 회피할 수 있었다고 발표하였다.

0.5 g의 증식된 캘러스를 BA와 NAA가 혼용으로 첨가된 배지에서 4개월간 배양하여 캘러스의 증식 및 증식된 캘러스로부터 신초의 재분화를 조사하였다 (Table 5). 증식된 캘러스의 무게가 BA 0.1~1.0 mg/L와 NAA 0.1~1.0 mg/L가 첨가된 배지에서 6.0 g 이상으로 매우 높아 성장조절제가 첨가된 배지에서는 캘러스가 왕성하게 증식되었다. 그러나 재생신초수가 대조구에서 4.5개로 가장 높았으며, 다음은 BA와

Table 1. Effect of kinetin and NAA on callus induction from bulb scales of *Lilium longiflorum* 'Gelria' after 8 weeks in culture.

Treatment (mg/L)	Callus induction (% ± SE)	Friability ^a	Fresh wt. of induced callus/explant (mg)	Callus color ^b
Control	47.0 ± 3.0	B	105.3 ± 5.0	Y
Kinetin 0.1				
+ NAA 0.1	83.5 ± 6.5	B	238.1 ± 34.4	Y
NAA 0.5	81.0 ± 19.0	B	208.1 ± 0.6	Y
NAA 1.0	62.5 ± 17.7	B	165.0 ± 17.5	Y
Kinetin 0.5				
+ NAA 0.1	100 ± 0.0	AB	650.6 ± 46.9	Y
NAA 0.5	100 ± 0.0	AB	415.0 ± 95.0	Y
NAA 1.0	100 ± 0.0	AB	306.3 ± 47.5	Y
Kinetin 1.0				
+ NAA 0.1	100 ± 0.0	AB	828.5 ± 47.9	GY
NAA 0.5	100 ± 0.0	AB	576.9 ± 88.1	GY
NAA 1.0	100 ± 0.0	AB	600.0 ± 48.8	GY

24 bulb scales/4 flask were cultured for each treatment.

^aA to B : friable to hard. ^bG : green, Y : yellow

Table 2. Effect of kinetin and NAA on growth of callus and shoot development from 0.5 g of induced calli in *Lilium longiflorum* 'Gelria' after 8 weeks in culture.

Treatment (mg/L)	Fresh wt. of callus(mg ± SE)	Friability ^a	Callus proliferation (multiple No.)	No. of shoots
Control	2,179 ± 134	B	4.4 ± 1.7	8.1 ± 1.6
Kinetin 0.1				
+ NAA 0.1	2,987 ± 173	B	6.0 ± 1.6	12.0 ± 3.9
NAA 0.5	3,040 ± 190	B	6.1 ± 2.4	7.1 ± 1.4
NAA 1.0	4,580 ± 194	B	9.2 ± 2.9	12.4 ± 0.8
Kinetin 0.5				
+ NAA 0.1	2,944 ± 382	AB	5.9 ± 1.4	13.1 ± 7.7
NAA 0.5	6,473 ± 229	B	7.9 ± 2.3	11.7 ± 1.8
NAA 1.0	5,418 ± 295	B	10.8 ± 2.7	8.2 ± 1.6
Kinetin 1.0				
+ NAA 0.1	3,725 ± 252	AB	7.5 ± 1.9	15.0 ± 3.9
NAA 0.5	4,698 ± 146	AB	9.4 ± 1.8	10.2 ± 3.0
NAA 1.0	3,769 ± 226	AB	7.5 ± 1.4	7.9 ± 1.7

^aA to B : friable to hard

Table 3. Growth of callus and shoot development from 0.5 g of induced calli affected by cultural conditions in *Lilium longiflorum* 'Gelria' after 8 weeks in culture.

Cultural condition	Treatment (mg/L)	Fresh wt. of callus(mg ± SE)	Friability ^b	Callus proliferation (multiple No.)	No. of shoots
Light ^a	Kinetin 0.1				
	+ NAA 0.1	2,985 ± 280	B	6.0 ± 1.6	12.0 ± 3.9
	NAA 0.5	3,035 ± 683	B	6.1 ± 2.4	7.1 ± 1.4
	NAA 1.0	4,580 ± 323	B	9.2 ± 2.9	12.4 ± 0.8
	Kinetin 0.5				
	+ NAA 0.1	2,940 ± 254	AB	5.9 ± 1.4	13.1 ± 7.7
	NAA 0.5	3,970 ± 204	B	7.9 ± 2.3	11.7 ± 1.8
	NAA 1.0	5,420 ± 272	B	10.8 ± 2.7	8.2 ± 1.6
	Dark	Kinetin 0.1			
+ NAA 0.1		1,825 ± 643	B	3.7 ± 1.3	6.6 ± 3.9
NAA 0.5		2,625 ± 418	B	5.3 ± 2.1	6.8 ± 2.0
NAA 1.0		3,770 ± 449	AB	7.5 ± 2.9	4.8 ± 2.3
Kinetin 0.5					
+ NAA 0.1		1,330 ± 321	AB	2.7 ± 0.6	6.6 ± 1.4
NAA 0.5		2,555 ± 312	AB	5.1 ± 2.6	6.1 ± 1.3
NAA 1.0		2,155 ± 188	AB	4.3 ± 1.8	4.5 ± 2.8

^a40 μmol · m⁻² · sec⁻¹ of fluorescent lamps under 16 hour photoperiod a day.

^bA to B : friable to hard

Table 4. Growth of callus and shoot development from 0.5 g of induced calli affected by cultural methods in *Lilium longiflorum* 'Gelria' after 8 weeks in culture.

Cultural condition	Treatment (mg/L)	Fresh wt. of callus (mg ± SE)	Friability ^b	Callus proliferation (multiple No.)	No. of shoots
Solid	Kinetin 0.1				
	+ NAA 0.1	2,985 ± 280	B	6.0 ± 1.6	12.0 ± 3.9
	NAA 0.5	3,035 ± 683	B	6.1 ± 2.4	7.1 ± 1.4
	NAA 1.0	4,580 ± 323	B	9.2 ± 2.9	12.4 ± 0.8
	Kinetin 0.5				
	+ NAA 0.1	2,940 ± 254	AB	5.9 ± 1.4	13.1 ± 7.7
	NAA 0.5	3,970 ± 204	B	7.9 ± 2.3	11.7 ± 1.8
	NAA 1.0	5,420 ± 272	B	10.8 ± 2.7	8.2 ± 1.6
	Liquid ^a	Kinetin 0.1			
+ NAA 0.1		2,575 ± 495	A	5.2 ± 1.3	6.6 ± 0.7
NAA 0.5		3,200 ± 863	A	6.4 ± 2.1	6.8 ± 1.2
NAA 1.0		3,100 ± 580	A	6.2 ± 2.9	4.8 ± 0.8
Kinetin 0.5					
+ NAA 0.1		1,790 ± 453	A	3.6 ± 0.6	6.6 ± 0.6
NAA 0.5		2,815 ± 863	A	5.6 ± 2.6	6.1 ± 1.2
NAA 1.0		2,500 ± 453	A	5.0 ± 1.8	4.5 ± 0.6

^aLiquid culture was conducted on the shaker with 120 rpm.^bA to B : friable to hard**Table 5.** Effect of BA and NAA on growth of callus and shoot development from 0.5 g of induced calli in *Lilium longiflorum* 'Gelria' after 4 months in culture.

Treatment (mg/L)	Total fresh wt. (g ± SE)	Fresh wt. of callus (g ± SE)	Friability ^a	No. of regenerated shoots	No. of developed leaves
Control	4.3 ± 0.5	2.1 ± 0.3	B	4.5 ± 0.3	26.0 ± 1.7
BA 0.1					
+ NAA 0.1	8.2 ± 1.2	6.8 ± 1.7	AB	4.3 ± 1.2	23.3 ± 6.3
NAA 0.5	8.8 ± 1.0	7.7 ± 1.0	A	3.8 ± 0.5	32.3 ± 10.5
NAA 1.0	8.5 ± 1.0	7.4 ± 0.6	A	3.0 ± 0.0	24.0 ± 2.3
BA 0.5					
+ NAA 0.1	9.2 ± 0.4	8.8 ± 0.3	A	2.0 ± 0.8	20.0 ± 8.0
NAA 0.5	9.5 ± 1.2	8.9 ± 0.8	A	1.0 ± 0.0	12.7 ± 3.0
NAA 1.0	6.0 ± 1.9	5.4 ± 1.4	A	1.0 ± 0.0	10.5 ± 1.5
BA 1.0					
+ NAA 0.1	7.0 ± 0.3	6.1 ± 0.2	A	2.5 ± 0.5	29.5 ± 11.5
NAA 0.5	8.3 ± 0.5	6.5 ± 1.1	A	2.3 ± 0.3	13.0 ± 4.3
NAA1.0	7.2 ± 0.4	5.9 ± 0.6	A	1.0 ± 0.0	16.5 ± 4.5

^aA to B : friable to hard

NAA 0.1 mg/L가 첨가된 배지로 4.3개였다. 또한 캘러스로부터 많은 엽이 분화되었는데 성장조절제가 첨가되지 않은 대조구에도 26개로 많은 엽이 분화되었으며, 전반적으로 NAA의 농도가 높아지면 분화엽수가 감소하는 대신 callus의 무게가 증가하였다 (Table 5).

Park 등 (1997)은 'Gelria'의 캘러스 배양에서 2,4-D와 BA가 고정된 상태에서 NAA의 농도가 증가될수록 캘러스의 생체중이 증가하였다고 보고하여 본 실험의 결과와 매우 유사하였고, Stimart 등(1980)의 나리 'Black Beauty' 배양에서 유지된 캘러스를 3년 동안 유지한 후에 고체배지에 옮긴 결과 식물체가 재분화되기까지 1년의 긴 기간이 걸린다고 발표하였다. 본 실험에서도 배양 4개월 후에 식물체가 재분화되어

'Gelria'의 캘러스에서 식물체의 재분화는 긴 시간이 요구되었다.

적 요

나리 'Gelria'의 인편에서 캘러스를 유도, 증식시키고, 증식된 캘러스에서 식물체를 재분화하여 캘러스를 통한 재분화 기술체계를 확립하고자 실험한 결과, 인편에서 캘러스의 유도는 성장조절제가 전혀 첨가되지 않은 배지에서도 유도되었고, kinetin 0.5~1.0 mg/L와 NAA 0.1~1.0 mg/L가 첨가된 배지에서는 유연성이 높은 캘러스가 100% 유도되었다. 성장조절

제가 첨가되지 않은 배지에서도 캘러스의 증식이 양호하였으며, 성장조절제가 첨가된 배지에서는 증식률이 높아 캘러스가 왕성하게 증식되었다. 또한 캘러스로부터 신초가 발생하여 캘러스의 증식과 신초의 재분화가 동시에 발생하였다. 캘러스는 암배양보다는 명배양에서, 액체배양보다는 고체배양에서 더 잘 증식하였다. 성장조절제가 첨가된 배지에서는 캘러스가 왕성하게 증식하였고 신초의 재생은 성장조절제가 첨가되지 않은 배지에서 높았고, 다음으로 1.0 mg/L의 BA와 NAA가 첨가된 배지에서 높았다.

인 용 문 헌

- Enaksha, RM, Wickremesinhe, E, Holcomb, EJ, Artega, RN** (1994) A practical method for the production of flowering Easter lilies from callus cultures. *Sci Hort* **60**:143-152
- Murashige, T, Skoog, F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Park, SY, Kim, SD, Kyun, SS, Lee, CH, Paek, KY** (1997) Several factors on bulblets regeneration from callus culture in *Lillium longiflorum* 'Gelria'. *Kor J Plant Tissue Cult* **24(3)**:183-188
- Priyadarshi, S, Sen, S** (1992) A revised scheme for mass propagation of Easter Lily. *Plant Cell Tissue & Organ Cult* **31**:193-197
- Sheridan, WF** (1968) Tissue culture of monocot *Lillium*. *Planta* **82**:189-192
- Simmonds, JA, Cumming, BG** (1976) Propagation of *Lillium* hybrids. II. Production of plantlets from bulb-scale callus cultures for increased propagation rates. *Sci Hort* **5**:161-170
- Stimart, DP, Ascher PD** (1978) Tissue culture of bulb scale sections for asexual propagation of *Lillium longiflorum* Thunb. *J Amer Soc Hort Sci* **5**:161-170
- Stimart, DP, Ascher, PD, Zagoski, JS** (1980) Plants from callus of the interspecific hybrid *Lillium* 'Black Beauty'. *HortiScience* **15**:313-315

(접수일자 2000년 9월 14일)