

# 오리엔탈 백합의 인편 및 줄기의 박판 세포층 절편으로부터 고빈도 자구형성

오승철<sup>1</sup>, 정명희<sup>1</sup>, 김석원<sup>1</sup>, 유장렬<sup>1,2\*</sup>

한국생명공학연구원 <sup>1</sup>식물유전체연구소제은행실, <sup>2</sup>식물세포공학연구소

## High Frequency Bulblet Formation in Scale and Stem Thin Cell Layer Explant Cultures of *Lilium* Oriental Hybrids

Seung-Cheol Oh<sup>1</sup>, Myung-Hee Chung<sup>1</sup>, Suk-Won Kim<sup>1</sup>, Jang-Ryol Liu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Plant Genomics Services and <sup>2</sup>Laboratory of Plant Cell Biotechnology, Korea Research Institute of  
Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 52 Eoeun-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea

**ABSTRACT** An efficient system for *in vitro* bulblet formation of *Lilium* oriental hybrids (cvs. Casa Blanca and Siberia) is described. Transverse thin cell layer (tTCL) (1 mm thick) explants of 'Casa Blanca' formed bulblets at a frequency of 97.7% when cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (On average 15.6 bulblets were formed per explant). The frequency of bulblet formation was drastically reduced when the explant thickness was thinner than 1 mm. Explants from the outermost layer of bulb scale produced greater frequency of bulblet formation than middle or innermost layer. Among auxins supplemented to culture medium at 1 mg/L, 2,4-D led to greater frequency of bulblet formation on explants than dicamba, picloram, or phenylacetic acid (PAA). tTCL explants from the middle region of the outermost layer bulb scale yielded greater frequency of bulblet formation than the upper or lower region. tTCL stem explants of 'Siberia' formed bulblets at a frequency of 95.3% when cultured on MS medium with 1 mg/L 2,4-D (On average 9.1 bulblets were formed per explant). The system established in this study will be useful for *in vitro* rapid propagation and genetic transformation of *Lilium* Oriental hybrids.

**Key words:** Casa Blanca, Liliaceae, lily, Siberia

### 서 론

백합과에 속하는 백합은 튜립, 글라디올러스와 함께 세계 3대 구근 화훼작물로서 소비자의 기호에 따라 다양한 품종이 육성되고 있다. 일부 품종에서 종자 번식이 되기도 하지만 우량품종은 대부분 영양번식을 한다. 그 중에서도 인편번식법이 일반적으로 사용되고 있으며, 아울러 무병구의 생산을 목적으로 한 조직배양 기술도 활용되고 있다 (Been et al. 1996).

백합의 조직배양은 인편 (Kim et al. 1999), 약 (葯) (Qu et al. 1988), 잎과 줄기 (Bacchetta et al. 2003), 어린줄기 (Nhut et al. 2001a), 주아 (pseudo-bulblet) (Bui et al. 1999; Nhut DT 1998)

등과 같이 여러 조직의 절편이 이용되며, 절편으로부터 직접 구근을 유도하는 방법 (Takayama and Misawa 1983)과 캘러스를 거치는 방법 (Been et al. 1996) 등이 있다. 백합의 인편을 배양할 때에 주로 인편을 쪼개지 않고 그대로 배양한다 (Lee et al. 1995; Kim et al. 1996). 최근에는 인편의 박판 절편을 배양하는 방법이 제시되었다. 이 방법은 Tran Thanh Van (1985)이 처음 사용하였는데 박판 세포층 (thin cell layer, TCL)을 사용하는 것으로 체계화되었으며, 박판 세포층 방법으로 나팔나리의 주아, 어린 줄기 등으로부터 자구를 생산한 바 있다 (Bui et al. 1999; Nhut et al. 2001a, 2001b, 2002). 이 방법은 기존의 여러 방법보다 자구의 생산 빈도가 높고 짧은 배양기간 동안에 자구를 유도할 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 이제까지 박판세포층 절편으로 사용된 바가 없는 인편을 이용하여 고빈도의 자구 형성을 유도하고자 하였으며 줄기의 박판

\*Corresponding author Tel 042-860-4430 Fax 042-860-4608  
E-mail jrliu@kribb.re.kr

세포층 절편도 함께 사용하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

백합은 *Lilium Oriental hybrid*인 '카사블랑카 (Casa Blanca)'와 '시베리아 (Siberia)'의 두 품종을 사용하였다. 카사블랑카는 생장점 배양을 통하여 얻어진 자구를 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지에서 8주마다 계대 배양하여 유지된 자구의 인편을 사용하였으며, 시베리아는 포장에서 재배된 식물체의 어린 줄기가 20 cm 미만으로 성장하였을 때 채취한 줄기를 사용하였다. 시베리아의 줄기는 수돗물에 30분간 씻은 후 70% 에탄올에 1분간, 1% sodium hypochlorite 용액에 15분간 침적하여 표면 살균하였으며 멸균수로 3회 이상 세척하여 사용하였다.

### 배지조성 및 배양조건

MS기본배지 (MS salts, 0.4 mg/L thiamine · HCl, 0.1 mg/L nicotinic acid, 0.5 mg/L pyridoxine · HCl, 2 mg/L glycine, 100 mg/L myo-inositol, 3% sucrose, 0.4% Gelrite, pH 5.8)를 사용하였다. 배지는 25 mL씩 플라스틱 페트리디쉬 (87×15 mm)에 분주하여 사용하였으며 생장조절제 dicamba, picloram, phenylacetic acid (PAA)는 여과살균 (pore size: 0.22  $\mu$ m)후 첨가하였다. 본 연구에서 모든 배양은 특별한 언급이 없는 한 25°C에서 명배양 (30  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, cool-white 형광등, 16시간 광주기)으로 수행하였다.

### 자구발생 및 식물체 재생

카사블랑카의 인편으로부터 자구 형성을 위한 최적 조건을 규명하고자 인편절편의 크기, 절편의 채취부위 및 식물생장조절제의 영향을 조사하였다. 가장 바깥 쪽의 인편전체 (두께 > 10 mm), 가장 바깥 인편의 중간부위에서 채취한 약 2×5 mm 크기의 2~3 mm, 1 mm, 1 mm 이하의 두께의 절편 (Figure 1A)을 1 mg/L의 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)를 첨가한 MS배지에서 배양하였다. 또한 인경에서의 배양부위에 따른 자구 형성빈도 및 옥신의 영향을 조사하기 위하여 자구의 중심부에 있는 인편, 그 바깥 쪽에 있는 인편, 가장 바깥에 있는 인편의 중간 부분에서 채취한 1 mm 두께와 약 2×5 mm 크기의 절편 (Figure 2A)을 각각 1 mg/L의 2,4-D, dicamba, picloram, 혹은 PAA를 첨가한 배지에서 배양하였다. 아울러 자구의 가장 바깥 쪽 인편을 상부, 중부, 하부로 나누어 (Figure 3A) 채취한 1 mm 두께와 약 2×5 mm 크기의 절편을 1 mg/L의 2,4-D를 첨가한 배지에서 배양하였다. 인편 절편은 각 페

트리디쉬 당 15개씩 치상하였으며, 각 처리구당 3반복으로 배양하였다. 상기의 실험은 2주 후 1회 반복 수행하였다.

시베리아의 줄기는 약 20 cm의 것을 3등분하여 상부 (upper), 중부 (middle), 하부 (lower) (Figure 4A)로 나누어 배양하였다. 절편은 1 mm의 두께로 만들어 1 mg/L의 2,4-D를 첨가한 MS 배지에서 배양하였다. 아울러 1% (w/w)의 활성탄 (Sigma)이 자구형성에 미치는 영향을 조사하였다. 줄기 절편은 각 페트리디쉬 당 7개씩 치상하였으며, 각 처리구당 6반복으로 배양하였다. 상기의 실험은 2주 후 1회 반복 수행하였다.

형성된 자구는 절편으로부터 분리하여 생장조절제를 첨가하지 않은 MS 기본배지에 치상하여 식물체로 발달시켰다. 발달된 식물체는 순화처리후 화분에 옮겨 온실에서 유지하였다.

### 자구형성빈도 및 절편당 자구수 조사

배양 7주 경과 후 인편 및 줄기 절편에 형성된 자구 (혹은 shoot)를 육안으로 관찰하여 자구형성빈도와 절편당 형성된 자구수를 조사하였다. 자구형성빈도는 전체 절편 중 자구를 형성하는 절편의 빈도로 계산하였으며 절편당 자구의 수는 각 처리구의 전체 절편수로부터 형성된 총 자구의 수에 대한 평균으로 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### 카사블랑카의 인편절편으로부터 자구형성

인편절편은 배양 2~3주 경과 후 돌기가 형성되며, 4주 경과 후부터 소형의 자구가 형성되었고, 6주 경과 후 비대해진 자구로부터 shoot이 발달하였다. 이후 shoot의 신장이 이루어지면서 자구가 비대해짐을 관찰 할 수 있었다. 자구의 형성은 주로 인편의 기부와 절편의 표면에서 이루어졌다 (Figure 1B). 절편의 두께에 따른 자구 형성빈도 및 절편 당 형성되는 자구의 수는 절편 두께가 1 mm일 때 각각 97.7% 및 15.6개로 가장 높았다. 이는 Nhut 등 (2001a, b, 2002)이 나팔나리의 어린 줄기와 주아 (pseudo-bulblet)의 절편으로부터 절편 두께에 따른 기관분화 및 체세포배발생에 미치는 영향조사 시 절편 두께가 1 mm일 때 기관분화 및 체세포배가 발생 빈도가 가장 높았다는 보고와 일치하였다. 또한 형성된 자구의 형태는 인편 전체를 배양하는 경우 비정상적인 자구가 다수 발달하였으나 절편 두께가 1 mm일 때는 정상적인 자구가 다수 발달하였다. 절편 두께가 2~3 mm인 경우에는 절편 두께가 1 mm일 때보다 자구형성빈도는 크게 변하지 않았으나 절편당 형성 자구수는 감소하였다. 그러나 절편 두께가 1 mm 이하가 되면 자구 형성빈도와 형성되는 자구의 수는 크게 감소하였다 (Figure 1C). 형성된 자구를 계대배양을 하지 않고 그대로 두면 자구의 기부로부터 뿌리가 발달하였다.

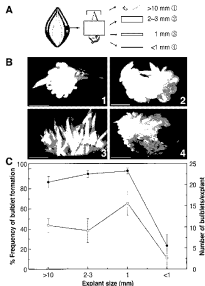
민핵절편의 배양부위에 따른 자구 형성빈도는 가장 바깥의 인편에서 채취한 절편에서 자구 형성빈도와 절편당 형성되는 자구의 수가 가장 높았으며, 중상부, 중간부위의 순으로 나타났다 (Figure 2C). 그리고 자구 형성에 미치는 옥신의 영향은 2,4-D 처리구에서 자구의 형성 빈도 및 형성된 자구의 수가 가장 높았다 (Figure 2C) 형성된 자구가 가장 비대해지고, 자구로부터 다수의 shoot와 뿌리가 발달하였다 (Figure 2B 1-4). 또한 형성된 자구를 계대배양 없이 배양을 유지하게 되면 자구의 기부로부터 뿌리가 발달하였다 (Figure 2B 1-4). 신나물 핵합의 싹자재에 조직으로부터 2,4-D 처리를 통해 체세포배 발달은 가능하나 자구형성은 이루어지지 않았으며 (Beem et al. 1996), 나팔나리의 구아 절편을 0.5 mg/L의 dicamba 혹은 picloram을 첨가한 배지에서 배양한 경우 역시 체세포배는 형

성되나 자구의 발달은 이루어지지 않았다 (Tribulato et al. 1997). 그러나 본 연구에서는 이러한 연구 결과와는 달리 인편으로부터 캘러스단계를 거치지 않고 직접 자구가 발달하였다. Dicamba 및 picloram은 자구의 형성보다는 캘러스 형성에 더 효과적이었으며 (Figure 2B 2, 3), PAA는 절편으로부터 직접 shoot가 형성되었고 다른 처리구와는 달리 절편 표면으로부터 부정근이 많이 발달하였다 (Figure 2B 4).

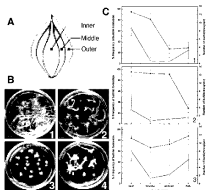
자구의 가장 바깥 쪽 인편을 상부, 중부, 하부로 나누어 배양한 경우 인편의 위치에 따른 자구 형성빈도는 상부 < 하부 < 중부 순으로 나타났다 (Figure 3B, C). 상부의 선단부위와 하부의 기부에서는 자구가 형성되지 않았으며 하부에서는 뿌리만 신장하였다.

#### A 비리이의 줄기절편으로부터 자구형성

시비리아의 줄기절편을 배양한 결과, 상부에서 채취한 절편의 표면에서 캘러스가 일부 형성되었으나 배양기간이 지속되면서 고사하였으며, 중부에서 채취한 절편은 캘러스가 형성되지 않았으며, 소수 절편에서 자구가 발생되었다 (Figure 4B2).



**Figure 1.** Effect of bulb scale explant thickness on bulblet formation in *Lilium Oriental* hybrid cv. Casa Blanca. A, Schematic illustration of bulb scale explants of various thickness; B, Bulblets formed on explants of various thickness (1, 2, 3, and 4 represent bulblets formed on >10 mm, 2-3 mm, 1 mm, and <1 mm thick explants, respectively) (scale bar = 5 mm); C, Effect of bulb scale explant thickness on bulblet formation. Explants were excised from the middle region of the outermost scales of bulbs. +—+, Frequency of bulblet formation on explants; —+—, Number of bulblets formed per explant. Each treatment consisted of 15 explants with three replicates. Two independent experiments were conducted. Data were collected after seven weeks of culture. Vertical bars represent S.D.

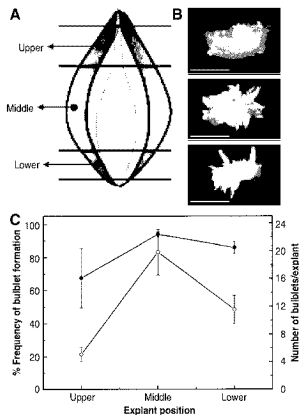


**Figure 2.** Effect of bulb scale explant layer source on bulblet formation in *Lilium Oriental* hybrid cv. Casa Blanca. A, Schematic illustration of bulb scale explant layers; B, Bulblets formed on TLC explants from the outermost bulb scale cultured on MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D (1), dicamba (2), picloram (3), or PAA (4) (scale bar = 1 cm); C, Effect of bulb scale explant layer source on bulblet formation. iTLC explants were excised from the middle region of innermost (1), middle (2), or outermost layers (3) of bulblet. +—+, Frequency of bulblet formation on explants; —+—, Number of bulblets formed per explant. Each treatment consisted of 15 explants with three replicates. Two independent experiments were conducted. Data were collected after seven weeks of culture. Vertical bars represent S.D.

그러나 하부에서 채취한 절편에서는 다수의 자구가 형성되었다 (Figure 4B3, 4). 줄기 하부의 절편으로부터 자구 형성빈도 및 절편당 형성된 자구의 수는 각각 95.3% 및 9.1개이었다 (Figure 4C1). 또한 활성탄을 첨가하면 오히려 자구 형성 빈도가 낮아졌는데 (Figure 4B4). 이는 나팔나리 어린 줄기 절편 배양에서 배지에 활성탄을 첨가함으로써 자구의 형성이 촉진되었다는 보고 (Nhut et al. 2001a)와 상반된다.

#### 인편 및 줄기의 박관 세포층 절편으로부터 고빈도 자구형성

본 연구에서는 나팔나리의 주아, 어린 줄기 등으로부터 자구를 유도하는 방법으로 사용된 바 있는 박관세포층 절편법 (Bui 1999; Nhut et al. 2001a, 2001b, 2002)을 기내에서 유지하고 있는 오리엔탈 자구의 인편에 적용하였다. 그 결과 실용적으로 이용할 수 있는 높은 빈도의 자구가 형성되었다. 주아는

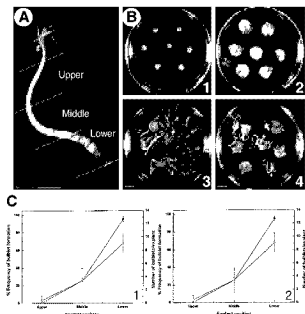


**Figure 3.** Effect of the outermost bulb scale explant region on bulblet formation in *Lilium Oriental* hybrid cv. Casa Blanca. A, Schematic illustration of bulb scale explant region; B, Bulblet formation on iTLC explants from the upper (1), middle (2), and lower region (3) of the outermost bulb scale cultured on MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D (scale bar = 5 mm); C, Effect of the outermost bulb scale explant region on bulblet formation. —●—, Frequency of bulblet formation on explants; —○—, Number of bulblets formed per explant. Each treatment consisted of 15 explants with three replicates. Two independent experiments were conducted. Data were collected after seven weeks of culture. Vertical bars represent S.D.

백합의 특정 발달시기에만 얻을 수 있는 데 반하여 기내에서 유지되는 자구는 연중 공급이 가능하므로 주아를 재료로 하는 것에 비하여 재료가확보가 용이하다는 이점이 있다. 또한 줄기 조직도 나팔나리의 경우와 마찬가지로 기내 자구형성에 효과적으로 이용할 수 있음을 밝혔다. 본 연구에서 확립한 기내 자구 형성 시스템은 오리엔탈 백합의 우량 품종을 기내 급속 증식하거나, 외래 유전자 도입을 위한 형질전환에 활용할 수 있을 것이다.

#### 적 요

오리엔탈 백합 카시블랑카와 사베리아의 고빈도의 자구발생 체계를 확립하였다. 카시블랑카의 인편을 박관세포층 (두께 1 mm) 절편으로 1 mg/L 2,4-D를 첨가한 MS 배지에서 배양하였을 때 자구 형성빈도는 97.7%이었으며, 절편 당 형성된 자구의 수는 15.6개이었다. 두께를 1 mm 이하로 하였을 때에는 자구형성 빈도가 크게 감소하였다. 절편은 자구의 가장 바



**Figure 4.** Effect of stem explant region on bulblet formation in *Lilium Oriental* hybrid cv. Siberia. A, Illustration of stem explant region (scale bar = 5 cm); B, Bulblet formation on iTLC explants from the upper (1), middle (2), and lower region (3) of young stem cultured on MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D (scale bar = 1 cm). iTLC explants from the lower region were also cultured on MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D and 1% (w/w) activated charcoal (4); C, Effect of stem explant region on bulblet formation. Explants were cultured on medium without charcoal (1) or with charcoal (2). —●—, Frequency of bulblet formation on explants; —○—, Number of bulblets formed per explant. Each treatment consisted of 7 explants with three replicates. Two independent experiments were conducted. Data were collected after seven weeks of culture. Vertical bars represent S.D.

깎쪽의 인편에서 얻은 것이 그 안쪽에서 얻은 것에 비해 자구 형성 빈도가 높았으며, 1 mg/L의 2,4-D, dicamba, picloram, PAA 중에서는 2,4-D를 첨가하였을 때에 가장 높았다. 맨 바깥쪽 인편을 사용할 때에는 절편을 중간부위에서 얻었을 때가 상부 혹은 하부에서 얻었을 때보다 자구 형성 빈도가 높았다. 시베리아 어린 줄기 절편을 1 mg/L 2,4-D를 첨가한 MS 배지에서 배양하였을 때 자구 형성빈도는 95.3%이었으며, 절편 당 자구형성 수는 9.1개이었다. 본 연구에서 확립한 시스템은 오리엔탈 백합의 기내 급속 증식과 형질전환에 활용될 수 있을 것이다.

사사 - 본 연구는 농진청의 BioGreen 21 사업의 연구비(no. ABM0030312), 과학기술부 국책연구개발사업의 유전 자원지원활용사업단의 연구비(no. BDM0100211) 및 한국과학재단 지정 식물대사 연구센터의 연구비로 지원되었음.

## 인용문헌

- Bacchetta L, Remotti PC, Bernardini C, Saccardo F (2003) Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of *Lilium*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 74: 37-44
- Been CG, Goo CH, Kim YJ, Ko JY (1996) Plant regeneration via somatic embryogenesis in lily (*Lilium × formolongi*). *Kor J Plant Tiss Cult* 23: 249-252
- Bui VL, Nhut DT, Tran Thanh Van K (1999) Plant production via shoot regeneration from thin cell layer pseudo-bulblet explants of *Lilium longiflorum* in vitro. *Plant Biol Pathol* 322: 303-310
- Kim EY, Choi JD, Park KI, Byun MS, Kim KW (1999) Enhancement of proliferation rate through multiple shoot induction from culture of microscale section in *Lilium*. *J Kor Soc Hort Sci* 40: 459-462
- Lee EM, Chung HJ, Lee YB (1995) Regeneration of bulblets from bulblet-derived bulb-scales of *Lilium longiflorum*. *Kor J Plant Tiss Cult* 22: 89-93
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nhut DT (1998) Micropropagation of lily (*Lilium longiflorum*) via in vitro stem node and pseudo-bulblet culture. *Plant Cell Rep* 17: 913-916
- Nhut DT, Le BV, Fukai S, Tanaka M, Tran Thanh Van K (2001a) Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. *Plant Growth Reg* 33: 59-65
- Nhut DT, Le BV, Tran Thanh Van K (2001b) Manipulation of the morphogenetic pathways of *Lilium longiflorum* transverse thin cell layer explants by auxin and cytokinin. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 37: 44-49
- Nhut DT, Le BV, Minh NT, Silva JT, Fukai S, Tanaka M, Tran Thanh Van K (2002) Somatic embryogenesis through pseudo-bulblet transverse thin cell layer of *Lilium longiflorum*. *Plant Growth Reg* 37: 193-198
- Qu Y, Mok MC, Mok DWS, Stang JR (1988) Phenotype and cytological variation among plants derived from anther cultures of *Lilium longiflorum*. *In Vitro Cell Biol* 24: 471-476
- Takayama S, Missawa M (1983) A scheme for mass propagation of *Lilium* in vitro. *Scientia Hort* 18: 353-362
- Tran Thanh Van K, Toubart P, Cousson A, Darvill AJ, Gollin DG, Chefl P, Albersheim P (1985) Manipulation of the morphogenetic pathways of tobacco explants by oligosaccharins. *Nature* 314: 615-617
- Tribulato A, Remotti PC, Löffler HJM, van Tuyll J.M (1997) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Lilium longiflorum* Thunb. *Plant Cell Rep* 17: 113-118

(접수일자 2003년 7월 4일, 수리일자 2003년 9월 6일)