

백합나무(*Liriodendron tulipifera* L.)
體細胞胚 發生에 미치는 母樹 및 暗培養 效果

孫碩奎* · 文興奎¹ · 金勇旭¹ · 金志娥¹

국립산림과학원 난대산림연구소, ¹국립산림과학원 생물공학과

Effect of Mother Trees and Dark Culture Condition Affecting
on Somatic Embryogenesis of *Liriodendron tulipifera* L.

Seog-Gu Son*, Heung-Kyu Moon¹, Yong-Wook Kim¹ and Ji-Ah Kim¹

Warm-temperature Forest Research Center, Korea Forest Research Institute, Jeju Seogwipo 697-050, Korea

¹Div. Biotechnology, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

요 약: 5본의 백합나무 모수로부터 미숙종자 배양을 통한 체세포 배발생을 시험하였다. 두 가지 배지(MS 및 B5)에 2,4-D 및 TDZ의 농도별 조합처리로 캘러스 및 배발생 조직 유도를 시험하고 체세포배 유도, 발달 및 재분화에 미치는 명·암배양의 효과를 조사하였다. 캘러스 및 배발생 조직의 유도는 두 배지간 유의적인 차이가 없었으나 MS + 2,4-D 1.0 mg/L, TDZ 0.01 mg/L, 3% sucrose 조건에서 양호하게 나타났다. 캘러스 유도는 모수 및 명·암배양에 따른 차이가 없었으나 배발생 조직의 유도는 암배양이 주효하여 명배양보다 약 2배의 효과가 있었고 모수간 55~72%까지 차이를 나타냈다. 체세포배 유도 및 정상적인 체세포배의 발달에 있어서도 모수의 영향을 받으며, 암배양이 필수적인 것으로 나타났고, 해부학적인 관찰을 통해 확인할 수 있었다. 본 실험 결과는 백합나무 체세포배 유도에 있어 모수의 선택과 암배양이 중요한 요인임을 시사해 준다.

Abstract: An effective micropropagation system for *Liriodendron tulipifera* L via somatic embryogenesis was established using immature seeds. Immature seeds from five individual trees were bisected longitudinally and cultured on two basal media (MS and B5) containing different combinations of 2,4-D and TDZ to induce callus and embryogenic tissue under light (40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 16 hr/day) or complete darkness at 25 \pm 2°C. There was no distinctive difference on callus and embryogenic tissue induction between the two basal media with PGRs. Optimum culture medium appeared to be MS medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D and 0.01 mg/L TDZ plus 3% sucrose. Non-embryogenic callus induction rate was not significantly different among the genotypes. However, the embryogenic callus induction frequency differed greatly by the genotypes ranging from 55% to 72% when cultured in the dark. Generally, the cultures maintained in the dark tended to show normal somatic embryo development as well as embryogenic tissue formation and this was confirmed by histological examination. Above results suggest that a proper selection of mother tree and dark culture condition are necessary to optimize somatic embryogenesis system of *Liriodendron tulipifera*.

Key words: yellow poplar, somatic embryo maturation and conversion, dark culture, histology

서 론

백합나무(*Liriodendron tulipifera* L.)는 목련과(Magnoliaceae)의 낙엽 활엽 교목으로 tulip-tree 또는 yellow-poplar로 불리며 북미지역 전역에 분포하고 있다(Merkle, 1991). 국내에서는 1920년대 중반에 북미산 종자가 처음 도입되어 설립된 이후 뛰어난 환경 적응성과 생장력을 보여주고 있으며, 연녹색의 큰 꽃과 잎으로 인해 조경수로도 주목을 받고 있는 부가가치가 높은 수종이다(Ryu, 2003). 그러나 곤충을 매개로 한 수분(pollination) 특성으로 타가수분율이 낮고 높은 자배현상 때문

에 충실 종자율은 10% 정도에 그치고 있다. 따라서 대량으로 묘목을 생산하기 위해서는 충실종자의 선별과 그에 따른 대량의 종자를 채종해야 하는 어려움이 있다(Beck, 1990). 일부 클론본존이나 채종원의 조성을 위하여 T접, 삼목 등의 무성 번식법이 이용되고 있으나 접목 기술상의 어려움과 낮은 삼목 발근율로 인해 실용화 되지 못하고 있다(Ryu와 Kim 2003).

목본류 조직배양 기술은 1960년대 초 포플러류를 대상으로 시작되어 몇몇 침엽수종에서는 상업적 실용화 단계에까지 이르고 있다. 특히 체세포배 유도 기술은 증식효율이 높아 가내 대량증식의 핵심기술로 자리잡고 있다(Merkle과 Jeffrey, 2000; Pena와 Seguin, 2001). 백합나무의 조직배양은 Merkle과 Sommer(1986)에 의해 처음 시도된 이후, 체세포배의 유도와 성숙(Merkle et al., 1990), 접합자배의 발달단계별 배발생 유

*Corresponding author
E-mail: sonsak@foa.go.kr

도 효율(Sotak *et al.*, 1991), 백합나무 교잡종에 대한 번식(Merkle *et al.*, 1993), 체세포배의 초저온 저장 기술(Vendrame *et al.*, 2001), 미숙종자 채취시기 및 배지 첨가 물질의 영향(Lee *et al.*, 2003) 등 많은 연구가 보고되어 있다. 체세포 배발생은 주로 미숙배를 재료로 시도된 것으로 배발생 캘러스의 유도는 비교적 무난하게 이루어지고 있으나(Merkle, 1995), 정상적인 식물체의 재분화율이 낮아 여전히 해결되어야 할 문제점으로 남아있다(Merkle과 Watson-Pauley, 1994). 따라서 배발생 캘러스로부터 정상적인 체세포배를 유도하여 완전한 식물체로의 재생을 위한 배의 단계별 성숙과 호르몬의 관계(Nicle과 Yeung, 1999; Ramesar-Fortner와 Yeung, 2001), 삼투압제의 영향(Aparna와 Kothari, 2003) 등 많은 연구가 이루어지고 있다.

한편 배양환경 중 광도조건에 따라 체세포배 발생율이 크게 차이가 있는 것으로 알려져 있으며, Halperin(1966)과 Stasolla 등(2003)은 명배양과 암배양에 따른 효과를 보고하였고, Tremblay와 Tremblay(1991)은 전나무류의 체세포배 유도에서 암배양시 발아되는 체세포배의 수가 최대에 이른다고 하였다. 따라서 체세포배발생 유도와 관련된 명, 암처리의 중요성과 더불어 다양하게 나타나는 체세포배의 형태적 변이의 원인규명을 통해 재분화 효율을 제고할 수 있음이 시사되고 있다(Dodeman *et al.* 1997). Zimmerman(1993)은 체세포배 유도 초기의 형태적, 해부적 특성을 관찰함으로써 식물체내의 극성 확립 기작을 이해할 수 있으며, 형질전환에 의한 유전자 발현에 대한 기초연구의 재료로 유용하게 쓰일 수 있다고 하였다.

본 연구는 국내 유망 조류수종 중 하나인 백합나무를 대상으로 명, 암 배양에 따른 배발생 조직유도 및 체세포배 발아 효과를 조사하고, 체세포배 발달과정의 형태적, 해부적 특징을 조사하여 체세포배 유도를 통한 백합나무 재분화의 효율 증진을 도모하고 차후 형질전환을 위한 기초 자료를 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 식물재료

국립산림과학원 산림유전자원부 구내에 식재된 약 30년생 백합나무 5본을 모수로 사용하였다. 각 모수로부터 개화 후 4주가 경과한 미숙종자를 채취하여 절개한 후 시과(翅果)를 한 개씩 분리하였다. 시과의 중간부분에서 분리한 시과를 모아 붙어 있는 시편을 제거한 후 계면활성제를 2~3방울 넣어 흐르는 물에 표면 세척한 다음 무균상에서 70% 에탄올에 1분, 2% 차아염소산 나트륨용액(NaClO)에 3분간 소독하였고 멸균수에 3회 세척하였다. 소독된 시과를 절개하고 종피를 제거하고 미숙배가 포함된 조직을 추출하여 준비된 배지에 배양하였다.

2. 캘러스 및 체세포배 유도

캘러스 유도는 MS(Murashige와 Skoog, 1962) 배지와 B5(Gamborg *et al.*, 1968) 배지를 사용하였으며 성장조절제는 TDZ(thidiazuron)와 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)를 각각 0.01 mg/L과 0.1 mg/L, 0.5 mg/L과 1.0 mg/L의 두 수준으로 하여 배지별 2² factorial design으로 처리하였다. 무처리구를 포함한 모두 10가지 처리구의 배지에, 500 mg/L casein hydrolysate와 4% sucrose를 첨가하고 pH를 5.7로 조정하여 멸균 소독한 후 500 mg/L glutamine을 필터링 처리로 첨가하여

1회용 Petri dish(87×15 mm)에 25 ml씩 분주하였다. 추출된 미숙배를 각 Petri dish에 10점씩, 처리구 당 20반복으로 치상하였다. 배양온도는 24±2°C에, 명배양과 암배양을 실시하였으며 명배양시 조도는 40 μmol m⁻²s⁻¹, 16시간 일장 조건이었다. 형성된 캘러스는 4주마다 계대배양 하였으며, 캘러스로부터 발생된 배발생캘러스를 분리하여 성장조절물질이 첨가되지 않은 200 ml용 플라스크에 1/2 MS 액체 배지를 50 ml씩 분주한 후 배발생캘러스 1 g을 이식하여 배양하였다. 진탕배양기에서 100 rpm/분으로 10일간 액체 배양 후 유도된 체세포배를 50 mesh(300 μm)의 체로 걸러 MS 기본 배지에 이식하였다.

3. 체세포배 성숙 및 발아

MS 기본 배지에 이식 후 형성된 체세포배를 상기조건의 배양실에서 명배양 및 암배양하여 체세포배 성숙을 도모하였다. 암배양 기간은 최초 캘러스 배양으로부터 약 4주간 실시하였다. 약 4주간 배양 후 어뢰형의 단계까지 자란 체세포배를 각 처리구별로 그 발생수를 조사하고 처리구 당 25개씩 임의로 추출하여 4반복으로 모두 100개의 체세포배에 대한 형태를 조사하였다.

4. 체세포배 검경

배발생 캘러스와 일반 캘러스 및 체세포배의 발달단계적인 해부학적 특성을 관찰하기 위하여 캘러스와 각 발달단계의 체세포배를 2.5% glutaraldehyde와 1.6% paraformaldehyde가 포함된 고정액에 24~48시간 동안 4°C에서 고정시켰다. 고정 후 에탄올로 탈수 과정을 거쳐 Technovit 7100(Kulzer, Germany)으로 침투, 포매하였다. 포매시킨 블록은 microtome(Leica RM 2165)을 사용하여 3 μm의 크기로 잘라 슬라이드에 고정시켰다. 그 다음 0.1% periodic acid과 Schiff용액, 0.05% toluidine blue O로 염색후 광학 현미경(Leica DMR, Germany)으로 관찰하였다(Yeung 1999).

결과 및 고찰

1. 배발생 캘러스의 유도

배양 2주 후 치상된 미숙배가 부풀어 오르면서 캘러스가 형성되기 시작하였다. 5본의 모수 중 3번과 4번 모수에서 캘러스 형성율이 좋았는데, 명배양의 경우에는 두 본 모두 38% 정도로 비슷하였으나 암배양의 경우에는 3번목에서 41%, 4번목에서 36%로 나타났다(Table 1). 그러나 5본의 모수 전체 평균은 명배양시 34%, 암배양시 35%로 명배양 및 암배양과 모수에 따른 캘러스 형성율의 통계적 차이는 보이지 않았다. 형태적인 면에서, 명배양에서 형성된 캘러스는 진녹색을 띠었으며 조직이 단단한 형태를 보였다.

형성된 캘러스로부터 약 4주에서 8주에 걸쳐 배발생 캘러스가 관찰되었다. 치상된 미숙배의 하배측 부분에서 주로 배발생 캘러스가 관찰되었는데, 배발생 캘러스는 연한 노란색을 띠고 부드럽고 영성한 형태로 일반 캘러스와 육안 구별이 가능하였다. 배발생 캘러스 유도에 대한 모수별 효과는, 선정된 5본의 모수 모두에서 배발생 캘러스가 유도되었으나 이중 3번 모수로부터 MS 배지에서 약 31%의 가장 높은 유도율을 얻을 수 있었다(Table 2). 암배양과 명배양을 비교하였을 때 암배양의 경우 5본의 모수 전체평균 약 20%로서 명배양의 2%에 비해 10배 높게 나타났다.

Table 1. Effect of light on callus formation from immature seeds of *L. tulipifera* by mother trees

Mother tree	Light (16 h/day light)		Dark	
	No. of explants*	No. of calli induced (%)	No. of explants*	No. of calli induced (%)
1	985	318 (32.3)	997	335 (33.6)
2	661	211 (31.9)	670	206 (30.7)
3	512	193 (37.7)	654	266 (40.7)
4	683	254 (37.2)	493	178 (36.1)
5	658	213 (32.4)	318	114 (35.8)
Average		237.8 (34.3)		219.8 (35.4)

*The explants were cultured on MS medium with combinations of 2,4-D and TDZ. Culture period was 4 weeks.

Table 2. Effect of genotypes and light on formation of embryogenic tissue and somatic embryos cultured in MS medium for 8 weeks

Mother tree	Light (16h/day light)		Dark	
	% embryogenic tissue formation	No. of somatic embryos*	% embryogenic tissue formation	No. of somatic embryos*
1	0.9	35.4±2.2	6.0	55.9± 8.5
2	1.4	36.8±2.9	16.5	62.9±10.1
3	3.1	42.4±3.6	31.2	72.1± 9.0
4	2.4	36.7±3.6	24.2	65.3±11.8
5	2.3	39.0±3.2	27.2	66.2±11.3
Average	2.0	38.1±3.0	20.1	64.5± 9.2

*Number of somatic embryos/g fresh weight (mean ± S.E).

이 중 배발생 켈러스의 유도율이 가장 좋았던 3번 모수에 대해 암배양하여 배지 및 처리구별 생장조절제 효과를 조사한 결과, MS 배지에 1.0 mg/L 2,4-D와 0.01 mg/L의 TDZ의 처리구에서 65%를 보였다. 동일한 처리 조건의 B5 배지에서도 60%의 배발생 켈러스가 유도되어 두 가지 배지에 따른 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. 최근 Lee 등(2003)은 백합

나무의 체세포배 유도 실험에서 MS 등 3종류의 배지에 대한 배발생 켈러스 유도에서 배지간 차이가 없음을 관찰한 바 있다. 1.0 mg/L 2,4-D와 0.01 mg/L의 TDZ의 처리에서 얻어진 이같은 결과는 다른 처리구에 비하여 배발생 켈러스 유도율이 높아 백합나무 미숙배를 이용한 체세포배 유도의 적정 처리 조건으로 생각되었다.

2. 체세포배 유도

배발생 켈러스의 진탕배양 10일 후 광학현미경하에서 관찰된 대부분의 세포는 구형단계의 체세포배로 나타났다. 구형의 크기는 매우 다양하였으며, 5일간 더 배양하였을 때 대부분 심장형으로 발달되었다. 체세포배의 유도는 배발생 켈러스의 유도율이 높았던 3번 모수에서 가장 많이 유도되었고 1번 모수에서 가장 적게 유도되었다. 심장형으로 발달된 체세포배의 수는 암배양시 3번 모수에서 g당 72개, 1번 모수에서 56개였으며 명배양시는 3번 모수에서 42개, 1번 모수에서 35개이었다(Table 2, Figure 1-B). 유도된 체세포배 수에 대한 표준편차는 명배양에서 5.3, 암배양에서 16.0으로 계산되었다. 커피나무(Fuentes *et al.*, 2000)와 두릅나무(Moon *et al.*, 2001)에서도 이와 비슷하게 유전자형에 따른 체세포배 발생의 차이가 보고된 바 있다. 관찰된 체세포배의 수를 비교해 볼 때 명배양에서는 모수간에 차이가 없는 것으로 나타난 반면, 암배양에서는 최대치 72개(3번모수)와 최소치 56개(1번모수) 사이에 통계적인 유의성이 나타나고 있어 모수의 차이를 보여주고 있다. 표준편차에서도 암배양의 경우가 명배양에 비해 3배 정도 크게 나타나고 있어 명배양시 보다 암배양을 수행할 때 모수 효과가 더 크게 작용하는 것으로 나타났다. 구형의 체세포배는 300 μ m의 mesh로 걸러 MS 기본배지로 이식하여 약 4주가 경과하였을 때 어뢰형으로 발달하였다.

3. 체세포배 성숙

체세포배 유도 후 어뢰형 단계까지 자란 배를 임의로 택하여 발아에 미치는 명암 배양의 효과를 조사하였다. 자엽의 발달에서 정상적인 2개의 자엽을 가진 개체수가 명배양에서 34%, 암배양에서는 65%로 나타나 암배양이 체세포배의 정상

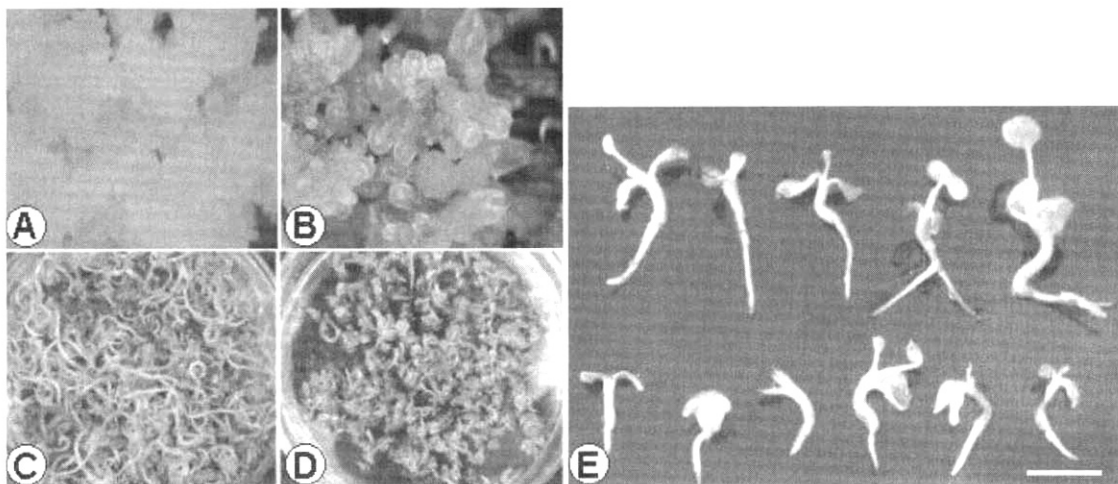


Figure 1. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration of *L. tulipifera* L. A-Embryogenic tissues showing yellow in color; B-Somatic embryos induced from the embryogenic tissue; C-Normally germinating somatic embryos cultured in darkness; D-Abnormally germinating somatic embryos cultured in light ($40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 16 h/day); E-Converted plantlets showing various cotyledon shapes (bar equals 2 cm).

Table 3. Frequency of normal and aberrant somatic embryos developed on MS medium in light and dark culture conditions

Morphological characteristics*	Culture condition	
	Light (%)	Dark (%)
Normal shape embryos with two cotyledons	34.0	65.0
one cotyledon	15.0	8.0
multi cotyledons	7.0	4.0
Abnormal shapes of embryos		
fused embryo	17.0	10.0
cotyledon necrosis	14.0	8.0
root-tip necrosis	13.0	5.0

*The examination of morphological characteristics was conducted when the torpedo-shaped embryos were observed after 4 weeks of transferring the globular embryos.

적인 발아에 효과가 있는 것으로 나타났다(Table 3).

광조건에 따른 체세포배의 형태적 차이는 다른 식물에서도 많이 보고되고 있으며, Halperin(1966)은 체세포배의 발아과정에서 정상적인 자엽의 것과 비정상적으로 발아되는 형태가 동시에 발생할 수 있으며 그 발생 빈도는 배양시의 광조건과 배지에 첨가된 생장조절제의 농도에 따라 달라진다고 하였다. 또한 Stasolla 등(2003)은 수분, 삼투압제, 광 등 배양조건에 따라 정상적인 체세포배의 형성율이 좌우되며, 특히 광조건은 배발생 캘러스의 유도에서 체세포배의 발아까지 중요한 영향을 끼쳐 과도한 광조건에서는 자엽이 집합된 형태의 체세포배 혹은 다자엽의 배로 발달하는 비정상적 체세포배의 발생이 증가할 수 있다고 하였다. Das 등(2002)도 포도의 재분화 과정에서 2주간의 암처리를 통해 80% 이상의 캘러스를 유도하였고 배발생 조직은 저광도인 $15 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 2주간 처리시 가능하며, 캘러스를 고광도($60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)에 직접 노출시킬 경우 캘러스의 색이 분홍색으로 변하며 체세포배의 분화가 이루어지지 않았다고 하여 광조건이 중요성을 시사하였다.

본 실험에서도 체세포배의 발아과정에서 쌍자엽의 정상적인 것과 비정상적인 형태가 동일한 배양조건에서 관찰되었다. 비정상적인 형태의 체세포배는 한 개의 자엽이 발달하는 형태와 3개 이상의 자엽이 발달하는 형태, 두개의 체세포배가 접합되어 발달하는 형태, 자엽의 발달 없이 배측과 뿌리만 발달하는 형태 및 전혀 발아하지 못하는 형태가 특히 명배양 조건에서 많이 관찰되었다(Table 3, Figure 4). 암배양에서의 정상적 체세포배 발생율은 65%로 관찰되었는데 이 결과는 이 등(2003)이 지속적으로 암배양을 실시 하여 얻은 47% 보다 향상된 것이었다. 본 실험에서는 캘러스 배양 초기 약 4주간의 암배양을 실시하여 어뢰형단계의 체세포배로 발달시킴으로서 정상적 체세포배의 발생율을 향상시킬 수 있었는데, 이 같은 결과는 Kintzios 등(2000)이 *Capsicum annum*에서 초기 암배양 조건이 체세포배 유도에 크게 영향을 미치며, 심장형과 어뢰형의 체세포배는 처음 3 주 동안 암배양한 배발생 캘러스에서만 얻었다는 결과와 매우 유사하였다. 정상적으로 발달된 체세포배는 활성탄 0.05%가 첨가된 MS 배지로 계대하여 완전한 식물체로 90% 이상 재분화되었다.

4. 체세포배 조직검검

일반적으로 식물에서 관찰되는 배발생 캘러스의 가장 큰 특징은 비배발생 캘러스에 비해 세포의 크기가 작으며 세포질

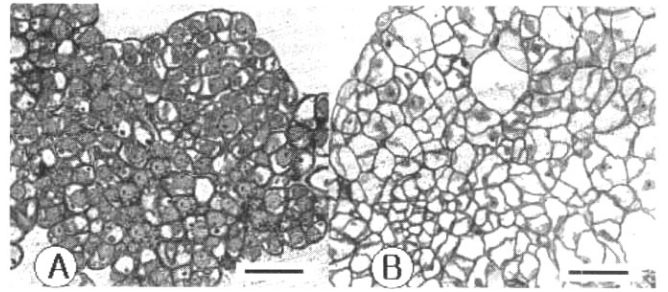


Figure 2. Anatomy of two representative callus types induced from immature zygotic embryos of *L. tulipifera*. (A) Embryogenic cell clumps constituted with dense cytoplasmic cells and (B) non-embryogenic callus with vacuolated cells (B). Bar equals 10 μm .

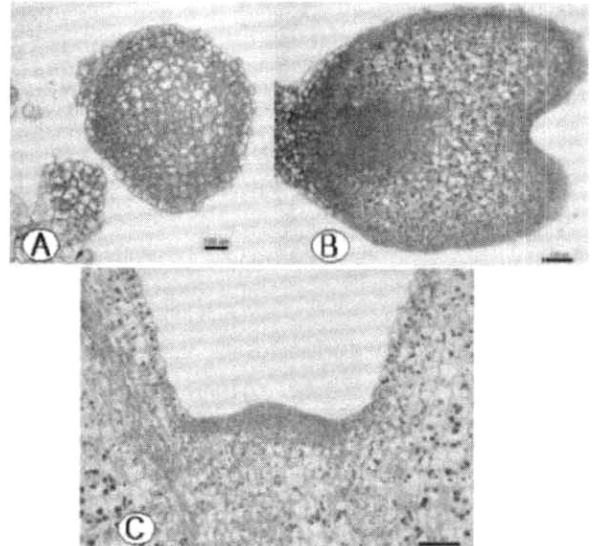


Figure 3. Anatomy of an early stage somatic embryos of *L. tulipifera*. Globular embryo formed after 10 days of culture (A), heart-shaped embryo after 15 days of culture (B) and an embryo showing eumeristematic cell after 30 days of culture (C). Bar equals 100 μm .

이 세포내에 가득 차있다는 점이다(Yeung, 1999). 본 실험에서도 동일한 결과를 관찰할 수 있었는데 배발생 캘러스는 전형적으로 노란색을 띠며 조직이 치밀하고 세포의 크기가 작고 세포질이 충분하게 나타났으며(Figure 3-A), 반면 비배발생 캘러스는 대체로 흰색을 띠었고 신장된 세포로 인해 그 크기가 크며 세포내의 대부분이 액포로 차있었다(Figure 2-B). 배발생 캘러스의 이러한 특징은 가시오갈피 배발생 캘러스에서 관찰된 Han과 Choi(2003)의 결과와 매우 유사한 것으로 나타났다.

배발생 캘러스로부터 구형의 체세포배 발달은 배양 약 10 일 후에 관찰되었으며(Figure 3-A), 그 후 5일이 더 지나면 심장형의 체세포배가 다수 관찰되었다(Figure 3-B). Tarre 등(2004)은 체세포배의 발달이 수종에 따라 다르게 나타난다고 하며, 가지(*Solanum melongena*)의 체세포배 유도에서 구형의 체세포배는 6일 후, 심장형의 체세포배는 그 후 8일 후에 관찰되었다고 하여 수종에 따른 차이를 보여주었다. 한편 백합 나무에서는 심장형의 체세포배를 15일 정도 더 배양하였을 때 어뢰형 단계로 발달하였고 자엽사이로 초기 정단 분열조직이 관찰되었다(Figure 3-C).

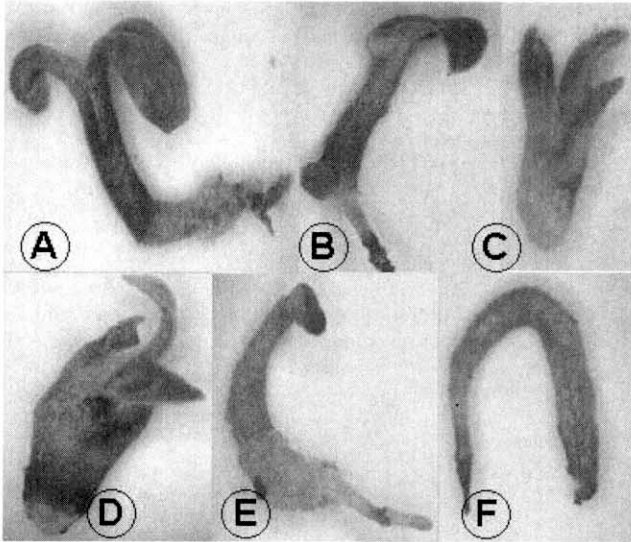


Figure 4. Normal (A) and various abnormal types (B-F) of somatic embryos occurred in embryo germination (A-Normal somatic embryo with well expanded two cotyledons; B-single cotyledon embryo; C-multi cotyledon embryo without root development; D-fused cotyledon embryo; E-cotyledon necrotic embryo; F-cotyledon and root-tip necrotic embryo)

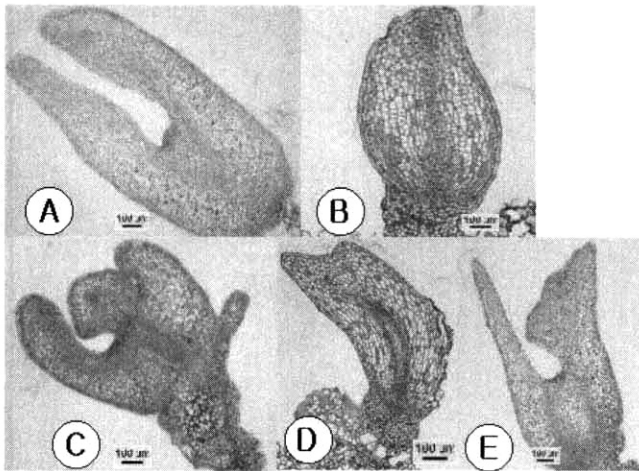


Figure 5. Histological observation of normal and abnormal somatic embryos occurred in embryo development (A-Normal shape somatic embryo with symmetric cotyledons; B-single cotyledon embryo; C-multi cotyledon embryo; D-root-tip necrotic embryo; E-asymmetric cotyledon embryo).

발달단계의 체세포배를 해부적으로 관찰해보면, 크게 자엽과 배병(suspensor) 조직이 대칭으로 나열된 정상적인 체세포배(Figure 5-A)와 비대칭의 기형적 체세포배(Figure 5-E)로 나눌 수 있었다. 또한 한 개의 자엽을 지닌 것(Figure 5-B)과 다수의 자엽을 지닌 것(Figure 5-C), 체세포배가 서로 접합되어 있는 형태, 자엽의 발육이 부진하여 초기 자엽이 고사되는 형태 및 뿌리가 고사하는 형태(Figure 5-D)가 관찰되었다. 이러한 기형의 체세포배가 다량으로 나타나는 것은 배양조건의 적정화가 더욱 필요함을 나타내는 결과로 체세포배의 발달단계에 따른 동조화 배양 및 배지, 성장조절제, 유기첨가물 등의 적정화와 배양환경 특히 광질(radiation source)에 따른 효과를

검토할 필요가 있다. 한편 Onay(2000)는 배지에 첨가되는 성장조절물질이나 배지의 산도 및 광과장 등 외부인자에 따라 체세포배의 극성이 변화하거나 비대칭적인 세포의 분열이 조장될 수 있다고 하여 적절한 배양환경의 중요성을 강조하였다.

Mekle(1995) 등 많은 보고에서 체세포배 발생을 통한 식물 체재분화의 가장 큰 문제점은 기형적인 체세포배가 많이 유도되어 재분화 효율이 낮다는 점을 지적하고 있다. 이런 문제점을 해결하기 위해 Merkle과 Watson-Pauley(1994)는 배축이 신장된 *Magnolia pyramidata* 체세포배를 양분 공급기와 분무기가 장착된 기외 배양장치로 곧바로 이식하였을 때 기내배양시 45% 내외이었던 발아율을 96%까지 향상시킬 수 있었다고 하였다. 그러나 백합나무 체세포배의 발아 및 재분화에 있어 명·암배양에 따른 효과와 체세포배의 발달 단계별 해부학적 비교는 수행되지 못하였다. 본 실험 결과는 백합나무 체세포배의 유도 및 발아에 있어 모수의 선택과 아울러 배양환경, 특히 배발생 조직에서 체세포배의 유도시 약 4주간의 암배양이 중요함을 나타내어 앞으로 이수종의 체세포배 유도시 고려할 필요가 있음을 보여주었다. 이상의 결과는 체세포배 발생을 통한 백합나무의 대량증식 수단으로 활용함은 물론 유전자 조작을 통한 형질전환의 효율을 제고하는 기초 자료로 이용될 수 있을 것이다.

인용문헌

1. Aparna, P. and S.L. Kothari. 2003. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of *Dianthus*. *Sci. Horticult.* 98 : 449-459.
2. Beck, D.E. 1990. In silvics of north America II, Hardwoods. p 406-416. Russell M.B. and Barbara H.H. (eds) USDA, Agriculture Handbook No. 654. Washington, DC. U.S.A.
3. Das, D.K., M. Reddy, K. Upadhyaya, and S. Sopory. 2002. An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Rep.* 20 : 999-1005.
4. Dodeman, V.L., Ducreux, G. and Kreis, M. 1997. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.* 48 : 1493-1509.
5. Fuentes, S.R.L, M.B.P Calheiros, J. Manetti-Filho and L.G.E. Vieira. 2000. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 60 : 5-13.
6. 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.
7. Halperin, W. 1966. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. *Am. J. Bot.* 53 : 443-453.
8. Han, J.Y and Y.E. Choi. 2003. Mass production of *Eleutherococcus senticosus* plants through in-vitro cell culture. *Kor. J. Plant Biotechnol.* 30 : 167-172.
9. Kintzios, S., J.B. Drossopoulos, E. Shortsiannis and D. Peppes. 2000. Induction of somatic embryogenesis from young, fully expanded leaves of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.): effect of leaf position, illumination and explant pretreatment with high cytokinin concentrations. *Sci. Horticult.* 85 : 137-144.
10. Lee, J.S., H.K. Moon and Y.W. Kim. 2003. Mass propagation of *Liriodendron tulipifera* L. *Kor. J. Plant Biotechnol.* 30 : 359-363.
11. Merkle, S.A. and H.E. Sommer. 1986. Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Liriodendron tulipifera* L. *Can. J. For. Res.* 16 : 420-422.
12. Merkle, S.A., R.J. Sotak, A.T. Wiecko and H.E. Sommer. 1990. Maturation and conversion of *Liriodendron tulipifera* somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26 : 1086-1093.
13. Merkle, S.A. 1991. Maturation of yellow-poplar somatic embryos. M.R. Ahuja (ed). *Woody Plant Biotech.* Plenum Press, New York. p. 179-187.

14. Merkle, S.A., M.T. Hoey, B.A. Watson-Pauley, and S.E. Schlarbaum. 1993. Propagation of *Liriodendron* hybrids via somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 34 : 191-198.
15. Merkle, S.A., and B.A. Watson-Pauley. 1994. *Ex vitro* conversion of pyramid magnolia somatic embryos. *Hort. Sci.* 29: 1186-1188.
16. Merkle, S.A. 1995. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.* 1 : 112-121.
17. Merkle, S.A. and F.D. Jeffrey. 2000. Current opinion in biotechnology, *Forest Tree Biotechnol.* 11 : 298-302.
18. Moon, H.K., Y.P. Hong, Y.W. Kim and J.S. Lee. 2001. Genotype effect on somatic embryogenesis and plant regeneration of 15 *Aralia elata*. *J. Kor. For. Soc.* 28 : 129-134.
19. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
20. Nickle, T.C. and E.C. Yeung. 1994. Further evidence of a role for abscisic acid in conversion of somatic embryos of *Daucus carota*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30 : 96-103.
21. Onay, A. 2000. Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf explants of pistachio (*Pistacia vera* L.). *Turk. J. Bot.* 24 : 91-95.
22. Pena, L. and A. Seguin. 2001. Recent advances in the genetic transformation of trees. *Trends in Biotechnol.* 19 : 500-506.
23. Ramesar-Fortner, N.S. and E.C. Yeung. 2001. Tri-iodobenzoic acid affects shoot apical meristem formation and function in zygotic embryos of *Brassica napus* cv. Topas. *Can. J. Bot.* 79 : 265-273.
24. Ryu, K.O. 2003. Adaptability of *Liriodendron tulipifera* Linne in Korea and techniques for producing its seedlings. PhD thesis, Chungbuk National University, Cheongju, Korea. pp 90.
25. Ryu, K.O. and H.E. Kim. 2003. Development of techniques and handling for seedling production of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera* Linne). *J. Kor. For. Soc.* 92 : 236-245.
26. Sotak, R.J., H.E. Sommer, and S.A. Merkle. 1991. Relation of the developmental stage of zygotic embryos of yellow-poplar to their somatic embryogenic potential. *Plant Cell Rep.* 10 : 175-178.
27. Stasolla, C., L. van Zyl, U. Egertsdotter, D. Craig, W. Liu and R. Sederoff. 2003. Transcript profiles of stress-related genes in developing white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos cultured with polyethylene glycol. *Plant Sci.* 165 : 719-729.
28. Tarre, E., C. Magioli, M. Margis-Pinheiro, G. Sachetto-Martins, E. Mansur and L. Santiago-Fernandes. 2004. In vitro somatic embryogenesis and adventitious root initiation have a common origin in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Revista Brasil. Bot.* 27 : 79-84.
29. Tremblay, L. and F.M. Tremblay. 1991. Effects of gelling agents, ammonium nitrate, and light on the development of *Picea mariana* (Mill) B.S.P. (black spruce) and *Picea rubens* Sarg. (red spruce) somatic embryos. *Plant Sci.* 77(2) : 233-242.
30. Vendram, W.A., C.P. Holliday, P.M. Montello, D.R. Smith and S.A. Merkle. 2001. Cryopreservation of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*) and sweetgum (*Liquidambar* spp.) embryogenic cultures. *New For.* 21 : 283-292.
31. Yeung, E.C. 1999. The use of histology in the study of plant tissue culture system-some practical comments. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 35 : 137-143.
32. Zimmerman, L.J. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell* 5 : 1411-1423.

(2005년 1월 11일 접수, 2005년 2월 21일 채택)