

참나리(*Lilium lancifolium* Thunb.) 접합자배로부터 소자구 형성을 통한 식물체 재생

김경희¹, 유장렬², 김석원^{1*}

¹한국생명공학연구원, 생물자원센터, ²식물유전체연구센터

Plant Regeneration from Zygotic Embryos Cultures of *Lilium Lancifolium* Thunb. Via Bulblet Formation

Kyung Hee Kim¹, Jang Ryol Liu², and Suk Weon Kim^{1*}

¹Biological Resource Center

²Plant Genomics Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 52 Eoeun-dong, Yuseong, Daejeon 305-806, Korea

ABSTRACT Plant regeneration system from zygotic embryos ($2n=24$) of *Lilium lancifolium* Thunb. via bulblet formation was established. Zygotic embryos of *Lilium lancifolium* formed bulblets and somatic embryos simultaneously when they cultured on MS medium supplemented with low concentration of 2,4-D. The highest frequency of bulblet and somatic embryo formation from zygotic embryos of *Lilium lancifolium* was 66.7% and 56.7%, respectively. The frequency of bulblet and somatic embryo formation was decreased when they cultured on MS medium over than 1 mg/L of 2,4-D. To regenerate whole plants, somatic embryos formed on zygotic embryos were transferred to MS basal medium. However somatic embryos did not fully converted into plantlets. Further incubation in the light, elongated somatic embryos formed numerous bulblets at the base of somatic embryos. Upon transfer to MS basal medium, bulblets were successfully converted into plantlets after further 4 weeks of culture in the light. After acclimatization, plantlets from bulblets were transferred to soil and grown to normal plants in growth chamber (approximately $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 16/8h photo period, 25°C). The chromosome analysis revealed that plants regenerated from zygotic embryos showed $2n=24$. These results indicate that chromosome stability of source tissue is maintained during plant regeneration via bulblet formation.

서 론

참나리(*Lilium lancifolium* Thunb.)는 백합과(Liliaceae)에 속하는 단자엽 식물로 전국적으로 분포하며 꽃 모양과 화색이 아름다워 화훼작물로서 가치가 매우 높다. 아울러 참나리의 자구는 한방에서는 구토 및 임신 후 입덧 증상을 효과적으로 감소시켜 주는 약리적 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으나 아직 유효한 약리적 성분에 관한 연구는 거의 이루어지지 않은 상태이다.

참나리는 엽색체 배수성($3n=36$)으로 인해 종자가 거의 맺히지 않으며 주로 엽액에 주아가 발달하여 식물체로 발달하거나 또는 자구를 통하여 번식이 이루어진다. 그러므로 참나리의 육종을 통한 화훼작물로 개발하기 위해서는 종자가 형성될 수 있는 계통이 필요하며 종자 발달이 가능한 계통은 육종 소재로써 활용가치가 매우 높다. 따라서 종자가 형성될 수 있는 참나리 계통은 자연 상태에서는 희소성이 매우 높으므로 식물체로부터 조직배양을 통한 대량 증식이 이루어지게 되면 육종소재로써 활용이나 또는 유용식물자원의 보존을 위한 현지 외 보존 수단으로 활용이 가능하리라 예상된다.

*Corresponding author Tel 042-860-4646 Fax 042-860-4677
E-mail: kimsw@kribb.re.kr

백합과 식물은 원예적 가치가 높아 현재까지도 대량증식에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 백합과 식물의 재생은 체세포배발생을 통한 식물체 재생(Pelkonen and Kauppi 1999, Tribulato et al. 1997, Been et al. 1996) 및 소자구 형성을 통한 식물체 재생(Nam et al. 2003, Han et al. 2000, Hwang et al. 2000, Arzate et al. 1997, Park et al. 1997, Lee et al. 1995, Simmonds and Cumming 1976, Sheridan 1968) 등 국내외적으로 많은 연구가 보고된 바 있다. 그러나 참나리의 접합자배로부터 식물체재생체계는 아직 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 종자형성이 이루어지는 참나리 계통 ($2n=24$)으로부터 접합자배 배양을 통하여 체세포배 및 소자구 형성에 요구되는 2, 4-D의 영향을 조사하였으며 아울러 소자구 형성을 통해 재생된 접합자배 유래 식물체로부터 염색체 수를 조사함으로써 배양과정에서 염색체의 안정성을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료

참나리(*Lilium lancifolium* Thunb.)의 접합자배는 성숙된 열매를 채취하여 확보하였다. 참나리 열매내에는 약 200개 정도의 종자가 들어있으며 종자의 두께는 약 0.5 mm 정도로 매우 얇았고 길이는 약 6-7 mm 정도 이었다. 종자를 흐르는 수돗물에 깨끗이 씻은 후 무균작업대에서 증류수로 2회 세척하고 70% ethanol로 1분간 소독하였다. 그리고 0.4% 락스에서 10분간 소독한 후 멸균수로 5회 세척하였다. 표면 살균된 종자를 여과지를 깔아놓은 Petri dish에 놓고 실온에서 2시간 건조하였다. 건조된 종자의 표피를 실험용 메스로 절단하여 제거한 다음 접합자배(길이는 약 4-5 mm)에 상처가 나지 않도록 조심스럽게 꺼내어 각각의 2,4-D가 첨가된 배양배지에 치상하여 25°C 항온기에서 암배양 하면서 소자구 및 체세포배의 형성 유무를 조사하였다.

참나리 접합자배로부터 소자구 및 체세포배 형성빈도 조사

참나리 접합자배 배양은 3% sucrose 와 0.4% Gelrite가 첨가된 MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지를 기본배지로 사용하였으며 pH는 5.8로 조정하였다. 참나리 접합자배로부터 체세포배발생 및 소자구 형성에 미치는 2,4-D 영향을 조사하기 위하여 2,4-D를 각각 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 3 mg/L 첨가된 배지에 접합자배를 배양하였으며 각 처리구당 10개씩 3개의 반복처리를 하였다. 배양 4 주경과 후 동일 조성의 고체배지로 옮겨주었으며 총 8 주간 배양한 다음 소자구 및 체세포배

형성빈도를 조사하였다. 참나리 접합자배 배양은 모두 25°C 항온기에서 암배양 하였다. 참나리 접합자배로부터 체세포배의 형성빈도, 소자구의 형성빈도의 통계분석은 Origin 6.1 (OriginLab, Northampton, MA, USA)를 이용하여 회귀분석을 실시하였다.

소자구로부터 식물체 재생

참나리 주아 및 접합자배 배양을 통해 형성된 소자구로부터 식물체를 재생하기 위하여 각각의 소자구를 생장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지가 100 ml이 첨가된 유리병 배양용기(부피 약 500 ml)로 옮겨왔다. 형성된 소자구는 25°C 항온기에서 명배양(약 $80 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; 광주기: 16/8 h) 하였다. 약 4주간 배양 후 발근이 이루어진 소식물체는 인공토양 (원예용상토: 펄라이트; 4:1)으로 옮겨 순화 처리하였다.

염색체 안정성 조사

재분화된 식물체의 염색체 이상을 관찰하기 위하여 재생된 식물체의 뿌리선단으로부터 염색체수를 조사하였다. 재생된 식물체의 뿌리 선단을 약 1 cm 정도 절취하여 증류수에 넣고 4°C 냉장고에서 24시간 동안 방치한 다음 뿌리 선단을 acetic alcohol (acetic acid : alcohol = 1 : 3)에 옮겨 4°C 냉장고에서 24시간 동안 고정하였다. 고정된 뿌리 선단에 1N HCl 용액을 첨가하여 60°C 수조에서 8 분간 처리한 다음 증류수로 10분간 세척한 후 슬라이드 글라스에 옮겨 백색의 분열조직부위를 골고루 펼친 다음 아세트카민용액으로 염색 한 후 광학현미경($\times 800$)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

접합자배로부터 소자구 형성 및 체세포배발생에 미치는 2,4-D 영향

저농도의 2,4-D 단독 처리를 통해 참나리 접합자배 절편으로부터 직접적인 소자구 및 체세포배 형성을 통한 식물체 재분화 체계를 확립하였다(Fig. 1). 배양개시 2주일 후 MS기본배지에 치상한 접합자배는 발아를 통해 정상적인 식물체로 성장하였다(Fig. 1A). 2,4-D가 첨가된 배지에서는 접합자배의 중간 부분부터 부풀면서 유근 및 자엽 선단부터 캘러스 형성이 이루어지기 시작하였다(Fig. 1B). 배양 3주 후에는 접합자배가 전체적으로 캘러스화 되었다(Fig. 1C). 그리고 배양 6주 후 캘러스 중간 부분에서 다수의 체세포배가 형성되었다(Fig. 1D). 그러나 일부 접합자배에서는 소자구가 체세포배와

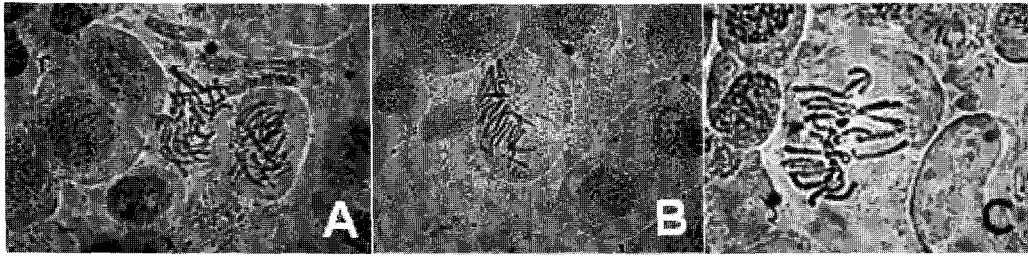


Figure 2. Cytological examination from root tips of regenerated plants. A: Regenerated plants from bulbs (2n=36); B: Regenerated plants from direct bulblet formation of zygotic embryos (2n=24); C: Regenerated plants from bulblet formation of somatic embryos (2n=24) (X 800).

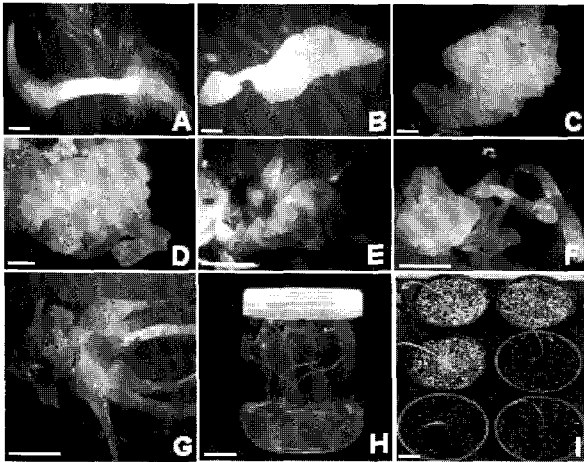


Figure 1. Plant regeneration from zygotic embryo cultures of *Lilium lancifolium*. A: Germination of zygotic embryo on MS basal medium after 2 weeks of culture in the dark; B: Callus induction from zygotic embryo when cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/L 2,4-D; C: Callus formation from zygotic embryo after three weeks of culture; D: Somatic embryos formation from zygotic embryo; E: Direct bulblets formation from zygotic embryo; F: Elongation of somatic embryos; G: Multiple bulblets formation from elongated somatic embryo; H: Plantlets regeneration from bulblets; I: Soil transfer of regenerated plants. Scale bars represent 1 mm (A-D), 5 mm (E-G) and 2 cm (H-I), respectively.

동시에 형성되었다(Fig. 1E). 식물체 재생을 위하여 형성된 소자구와 체세포배를 MS기본배지로 옮겨 배양한 결과 체세포배는 배양 4주후에 녹색을 띠면서 길이생장을 하였으나 정상적인 소식물체로 발달하지 못하였다(Fig. 1F). 그러나 동일 배지에서 계속적인 배양 결과 신장된 체세포배의 중앙 부위 기저부에서 소자구가 발생됨을 관찰 할 수 있었다(Fig. 1G). 체세포배에서 이차적으로 형성된 소자구 및 접합자배에서 직접적으로 형성된 소자구를 MS기본배지로 옮겨 명배양한 결과 다수의 정상적인 식물체가 발달하였다(Fig. 1H). 정상적으로 발달한 소식물체는 토양이식 후 순화과정을 거쳐 정상적인 식물체로 발달하였다(Fig. 1I). 본 연구에서 참나리의 체세포배는 뿌리 발달을 통해 정상적인 식물체로 발달하지 못하였으며 신장된 체세포배의 기저부에서 다수의 소자구가 이차적으로 발달하여 이 소자구로부터 식물체 재생이 가능하였다. 이 결과는 백합의 체세포배에서 신표와 뿌리형성을 통해 정상적인 식물체로 발달한다(Been et al. 1996)는 보고와는 상반된 결과를 보였다.

2,4-D 농도에 따른 접합자배로부터 체세포배 형성 및 소자구 형성빈도를 보면, 0.1 mg/L에서는 소자구 형성빈도가 66.7%, 체세포배형성 빈도는 56.7%이었다(Fig. 2). 그러나 0.3

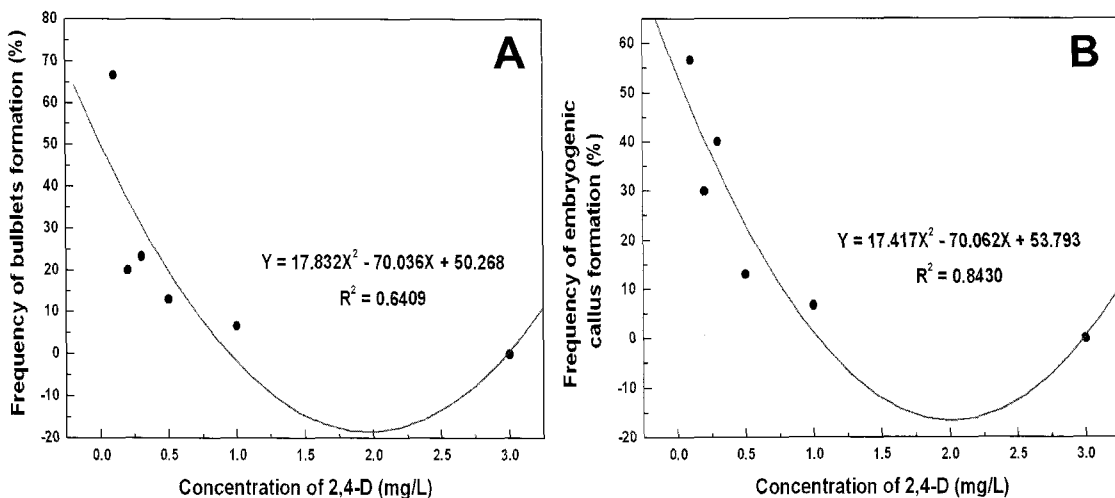


Figure 2. Effect of 2,4-D on bulblet (A) and embryogenic callus formation (B) from zygotic embryo of *Lilium lancifolium* after eight weeks of culture in the dark. Each treatment consisted of 10 explants per treatment with three replicates.

mg/L 2,4-D 처리구에서는 소자구 및 체세포배 형성빈도가 각각 23%, 33.3%로 2,4-D 농도가 증가할수록 소자구 및 체세포배 형성빈도가 감소함을 알 수 있었다. 1 mg/L 이상의 고농도 2,4-D 처리구에서는 소자구 및 체세포배 형성빈도가 각각 6.7%로 0.1 mg/L 2,4-D 처리구에 비해 약 10배 감소하였다. 따라서 본 연구를 통해 참나리 접합자배로부터 소자구 및 체세포배 형성에 요구되는 2,4-D의 최적농도는 0.1 mg/L임을 알 수 있었으며 접합자배 절편당 약 3개의 소자구가 형성되었다. 이 결과는 백합의 자구 형성에 있어서 저농도 auxin 조건에서 자구의 형성 및 빈도가 촉진된다는 보고 (Artrijk and Blom-Barnhoorn, 1981, Stimart and Ascher, 1978) 및 백합의 성숙배조직으로부터 배발생 캘러스와 체세포배 형성에 있어서 저농도의 2,4-D가 적합하다는 보고(Been et al. 1996)와 유사한 결과라 사료된다. 한편, 2,4-D와 BA, NAA의 혼용처리(Lee et al. 1995) 및 NAA와 TDZ의 혼용처리(Teixeira da Silva 2003, Nam et al. 2003)를 통해 참나리의 주아로부터 소자구 형성이 보고된 바 있으나 본 연구 결과 저농도 2,4-D의 단독처리만으로도 소자구 형성이 가능함을 알 수 있었다. 따라서 참나리 접합자배의 경우 저농도의 2,4-D의 단독처리가 소자구 형성 또는 체세포배 형성에 효과적인 것이라 사료된다.

접합자배로부터 재생된 식물체의 염색체 안정성

본 연구에서 참나리 접합자배(2n=24)로부터 소자구형성을 통해 재생된 각각의 식물체에서 염색체 수의 안정성이 유지되는지를 조사한 결과 참나리의 주아에서 재생된 식물체는 3n=36 (Fig. 2A) 그리고 접합자배에서 직접 발달한 소자구로부터 재생된 식물체 (Fig. 2B) 및 체세포배에서 이차적으로 발달한 소자구로부터 재생된 식물체는 염색체 수가 2n=24였다 (Fig. 2C). 이 결과는 2,4-D 첨가가 이루어진 배양조건에서 배양이 이루어져도 식물체의 염색체 수가 안정하게 유지됨을 보여주는 것으로 나리의 인편으로부터 재생된 식물체에서 염색체 수 변이가 이루어지지 않는다는 보고(Lassner and Orton 1983, Nam et al. 2003)와 유사하였다. 아직까지 본 연구에서는 접합자배로부터 재생된 식물체의 종자 형성은 관찰하지 못하였다. 따라서 참나리 주아(3n=36)와 접합자배(2n=24)로부터 소자구형성을 통해 재생된 각각의 식물체가 종자 형성이 이루어지는지 또는 주아가 형성되는지 조사가 이루어진다면 염색체 배수성과 주아 및 종자 형성의 상관관계 규명 연구에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 아울러 접합자배로부터 재생된 참나리 식물체는 형질 개량을 위한 교배육종 및 분자 육종의 소재로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 유전자원지원활용사업(BDM08 00622)과 한국생명공학연구원 기관고유사업 지원으로 수행되었습니다.

적 요

참나리(*Lilium lancifolium*)의 접합자배(2n=24)로부터 체세포배발생 및 소자구 형성을 통해 식물체 재분화 체계를 확립하였다. 참나리의 접합자배는 2,4-D가 첨가된 MS 배지에 배양하게 되면 소자구 및 체세포배가 동시에 발생하였다. 접합자배로부터 소자구 및 체세포배 형성빈도는 0.1mg/L 2,4-D 첨가 배지에서 각각 66.7% 와 56.7% 로 가장 높았다. 그러나 1mg/L 이상의 고농도 2,4-D 처리구에서는 소자구 및 체세포배 형성빈도가 크게 감소하였다. 접합자배에서 형성된 체세포배로부터 식물체를 재생하기 위하여 체세포배를 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본배지로 옮겨 명배양하였으나 식물체의 발달이 이루어지지 않았으며 신장된 체세포배의 기저부에서 이차적으로 다수의 소자구가 발달하였다. 형성된 소자구를 MS 기본배지로 옮겨 4주간 배양한 결과 정상적인 소식물체로 발달이 이루어졌다. 참나리의 접합자배로부터 직접적인 소자구 형성 및 체세포배로부터 이차적인 소자구 형성을 통해 재생된 식물체는 공히 염색체수가 2n=24 로 2,4-D가 첨가된 배양과정에서 염색체의 안정성이 유지됨을 알 수 있었다.

인용문헌

- Ammirato PV (1983) Embryogenesis. In DA Evans, WR Sharp, PV Ammirato, Y Yamada (eds) Handbook of plant cell culture, vol. 1 Macmillan Publishing Co, New York, pp 82-123
- Artrijk JV, Blom-Barnhoorn GJ (1981) Growth regulator requirements for adventitious regeneration from *Lilium* bulb-scale tissue in vitro, in relation to duration of bulb storage and cultivar. Scientia Hort 14: 261-268
- Arzate AM, Nakazaki T, Okumoto Y, Tanisaka T (1997) Efficient callus induction and plant regeneration from filaments with anther in lily(*Lilium longiflorum* Thunb.). Plant cell Report 16: 836-840
- Been CG, Goo DH, Kim YJ, Ko JY (1996) Plant regeneration via somatic embryogenesis in Lily (*Lilium formolongi*). Korean J Plant Tissue Culture 23: 249-252
- Han BH, Yae BW, Park CH (2000) Bulblet regeneration through the callus culture induced from bulb scales of *Lilium longiflorum* 'Gelria'. Korean J Plant Tissue Culture 27: 447-451

- Hwang HY, Lee EK, Lee YB (2000) Micropropagation of bulbs of *Lilium longiflorum* by liquid shaking culture. Korean J Plant Tissue Culture 27: 25-29
- Lassner MW, Orton TJ (1983) Detection of somatic variation. In: Tanksley SA, Orton TJ (eds) Isozymes in plant genetics and breeding, part A. Elsevier, Amsterdam, pp 207-214
- Lee EM, Chung HJ, Min BH, Lee YB (1995) Effects of growth regulators on shoot differentiation and bulblet formation in shoot-tip and bulb-scale cultures of *Lilium longiflorum*. Korea J Plant Tissue Culture 22: 83-87
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol 15: 473-97
- Nam SW, Kim HY (2003) Plant regeneration through bulblet and callus formation from *Lilium lancifolium* Thunb. bulb. Korean J Plant Biotechnology 30: 53-58
- Nhut DT, Bui VL, Teixeira da Silva JA, Aswath CR (2001) Thin cell layer culture system in *Lilium*: regeneration and transformation perspectives. In Vitro Cell Dev Biol 37: 516-523
- Park SY, Kim SD, Kyun SS, Lee CH, Paek KY (1997) Several factors on bulblets regeneration from callus culture in *Lilium longiflorum* 'Gelria'. Korean J Plant Tissue Culture 24: 183-188
- Pelkonen V, Kauppi A (1999) The effect of light and auxins on the regeneration of lily (*Lilium regale* Wil.) cells by somatic embryogenesis and organogenesis. Int J Plant Sci 160: 483-490
- Sheridan WF (1968) Tissue culture of monocot *Lilium*. Planta 82: 189-192
- Simmonds JA, Cumming BG (1976) Propagation of *Lilium hybrids*. II. Production of plants from bulb-scale callus culture for increased propagation rates. Sci Hort 5: 161-170
- Stimart DP, Ascher PD (1978) Tissue culture of bulb-scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. J. Amer Soc Hort Sci 103: 182-184
- Teixeira da Silva JA. (2003) Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology African Journal of Biotechnology 12: 683-691
- Tribulato A, Remotti PC, Loffler HJM, Tuyl JM (1997) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Lilium longiflorum* Thunb.. Plant Cell Reports 17: 113-118

(접수일자 2006년 11월 24일, 수리일자 2006년 1월 2일)