

## 일본잎갈나무(*Larix kaempferi*) 유기질소원 및 식물생장조절물질 처리에 따른 조직증식 및 체세포배 유도 효과

김용욱 · 김지아 · 문흥규 · 정수진

### Effect of tissue proliferation and somatic embryo induction in *Larix kaempferi* following treatment with organic nitrogen sources and plant growth regulators

Yong Wook Kim · Ji Ah Kim · Heung Kyu Moon · Su Jin Jeong

Received: 22 September 2015 / Revised: 19 October 2015 / Accepted: 2 December 2015  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** This study was conducted to evaluate the effects of different types and concentrations of organic nitrogen sources (L-Glutamine and casein hydrolysate, CH) and plant growth regulators (auxins and cytokinins) on embryogenic tissue proliferation and somatic embryo production in *L. kaempferi*. Overall, the highest tissue fresh weight was obtained at either 2 or 4 weeks in culture when 1,000 mg/L L-Glutamine was added to the culture medium, which showed similar results with other treatments. In experiments with different types and concentrations of plant growth regulators on somatic embryo production, the highest production (426.3/90 mg tissue) was found when 0.2 mg/L IBA was added; however, no somatic embryos were induced following treatment with 0.2 mg/L BA or Kinetin. The effect of various concentrations of IBA on somatic embryo production was also tested. The best result (303/90 mg tissue) was obtained when plants were treated with 0.2 mg/L IBA; 1.0 mg/L IBA was also effective (281/90 mg tissue). The lowest result (109.3/90 mg tissue) was obtained with 5.0 mg/L IBA.

**Keywords** Embryogenic tissue, IBA, Japanese larch, Tissue growth

### 서론

일본잎갈나무(*Larix kaempferi*)는 *Larix*속에 속하는 낙엽 침엽교목으로 1904년 경에 일본으로부터 종자가 최초로 도입되어 전국각지에 식재되었으며, 수고 30 m, 직경 1 m까지 자라는 주요 조림 수종중의 하나이다.

낙엽송의 클론증식은 삽목방법이 가장 널리 이용되고 있으나 삽목에 사용되는 삽수는 모수의 연령이 높아질수록 발근율은 현저히 감소하며, 유령목(幼齡木)의 삽수를 이용할 경우 그 삽목묘는 몇 년 간 사향성(斜向性)생장을 보이는 단점이 있다. 또한 클론 간에 따라 발근율 차이가 커 일정한 양의 클론묘를 지속적으로 생산할 수 없다. 이러한 단점을 극복하기 위해 조직배양 기술을 통한 우량개체의 번식이 시도되고 있는데 그 중 체세포배 유도법을 이용한 식물체생산이 현재 가장 널리 이용되는 기술이다(Lelu and Paques 2009). 그중 *Larix*속 수종의 체세포배 유도연구는 Nagmani and Bonga (1985)가 유럽낙엽송(*L. decidua*)에서 배발생조직을 처음으로 유도한 이후로 *L. laricina* (Klimaszewska *et al.* 1997), *L. leptoeuropaea* (Lelu *et al.* 1994), *L. occidentalis* (Thompson and von Aderkas 1992) 등의 수종에서 이루어졌으며, 본 연구대상 수종인 일본잎갈나무의 경우 체세포배 유도 및 식물체 재분화에 관한 Kim *et al.* (1999, 2007)의 연구가 있다.

L-Glutamine 등은 유기질소원으로서 식물의 유기질소원으로 널리 이용되며, 침엽수종의 체세포배유도의 경우 배발생조직의 증식, 유지 및 체세포배 발생에 매우 효과적인 것으로 알려져 있으며(Guevin and Kirby 1996; Barrett *et al.* 1997), 또한 침엽수종의 종자배 발달에도 중요한 역

Y.-W. Kim (✉) · J.-A. Kim · H.-K. Moon · S.-J. Kim  
국립산림과학원 산림생명공학과  
(Korea Forest Research Institute (KFRI), Division of Forest  
Biotechnology, Suwon, Korea)  
e-mail: bravekim@korea.kr

할을 하는 것으로 알려져 있다(Feirer 1995). 또한 식물생장조절물질을 첨가하여 체세포배 유도 효율을 높이는 연구결과 또한 보고되어 있다(Liu *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2007). 따라서 본 연구는 유기질소원 종류 및 농도차이에 따른 일본잎갈나무 배발생조직 증식량 비교, 배발생조직으로부터 체세포배 발생 시 옥신 류 및 사이토키닌 류의 종류 및 농도 효과 등의 비교에 관한 연구결과이다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

배발생조직 유도를 위한 재료인 미숙종자는 충북 충주에 위치한 국립산림품종관리 센터 내 낙엽송클론 채종원에서 7월초 풍매 미숙구과를 채취하여 종자내의 미숙배를 분리한 다음 배양하였다. 종자표면 살균은 70% 에탄올로 1분간 처리 후 2% NaClO로 10분정도 침적한 다음 멸균 증류수로 수 차례 세척 후 배양에 이용하였다.

### 배발생조직 유도 및 증식

배발생조직 유도는 LM (Litvay *et al.* 1985) 배지에 2.0 mg/L 2,4-D, 1.0 mg/L BA, 1,000 mg/L L-Glutamine (열소독 후 첨가) 및 3.0% sucrose를 첨가하였고 0.4% gellan gum (Sigma)을 첨가시켜 반고형 배지로 만들어 사용했다. 종자내의 미숙배를 적출하여 배지위로 평행으로 배양하였고 배양환경은 25±1°C, 암소에서 8주 동안 새로운 배지교환 없이 이루어졌다. 배발생조직 증식은 유도배지 조성과 동일하였고 약 0.5 cm 정도 크기의 조직을 새로운 배지로 이식함으로써 증식시켰다.

### 체세포배 유도

체세포배 유도를 위한 기본배지 조성은 염류의 반을 줄인 ½LM 배지에 250 mg/L L-Glutamine가 첨가된 액체배지에 증식시킨 배발생조직을 현탁배양 한 후 5.5 cm 크기의 종이필터(Whatman)위로 세포농도가 90 mg이 포함된 3 ml 정도의 세포현탁액을 깔아준 후 진공펌프를 이용하여 약 5초간 액체배지만을 제거하였다. 그 후 배발생조직이 포함된 종이필터를 60 µM, 0.2 M maltose 및 0.8% gellan gum 이 첨가한 반고형 배지에 치상하여 체세포배를 발생시켰다. 배양조건은 25±1°C, 암소에서 8주간 새로운 배지로의 교환 없이 연속배양법으로 이루어졌다.

### 화원질소원 농도 별 첨가에 따른 배발생조직 증식 효과

배발생조직 증식에 영향을 미치는 L-Glutamine과 CH 두 종류

의 유기질소원을 비교하였다. 각 농도는 0, 250, 500, 1,000 mg/L를 단독 첨가 혹은 L-Glutamine과 CH를 각각 250, 500 mg/L를 혼합 처리한 총 9조합을 처리하였다. L-Glutamine은 0.22 µM 필터로 여과 멸균하여 배지 온도가 50°C로 식었을 때 첨가하였다. 처리구 별 배발생조직 증식량은 최초 배양 후 2주후 측정하였고, 4주후에도 처리구 별로 조직생중량을 재 측정하였다.

### 식물생장조절물질 종류 및 농도에 따른 체세포배 유도 효과

체세포배 유도 시 옥신 및 사이토키닌류의 식물생장조절물질 첨가효과를 알아보기 위하여 수행되었다. 본 실험에 비교된 옥신 류로서는 NAA 및 IBA를 각각 0.2 mg/L를 첨가하였고, 사이토키닌 류 또한 BA 및 Kinetin을 0.2 mg/L로 각각 첨가하였다. 체세포배 유도효과는 배양 8주 후에 해부현미경 하에서 자엽단계 이상의 체세포배 만을 선별하여 조사하였다.

### IBA 농도에 따른 체세포배 유도 효과

IBA를 0 ~ 5.0 mg/L까지 총 7종류의 농도로 첨가하였고, 체세포배 유도효과는 배양 8주 후에 해부현미경 하에서 자엽단계 이상의 체세포배 만을 선별하여 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 유기질소원 농도 별 첨가에 따른 배발생조직 증식 효과

Figure 1은 CH 단독 및 혼합 등의 9처리 농도 별 첨가에 따른 배발생조직의 생중량 변화를 비교를 한 것으로 2주 배양 시 1,000 mg/L L-Glutamine처리구에서 4.7 g으로 가장 높은 증가량을 보였으며 0 혹은 250 mg L-Glutamine 처리구

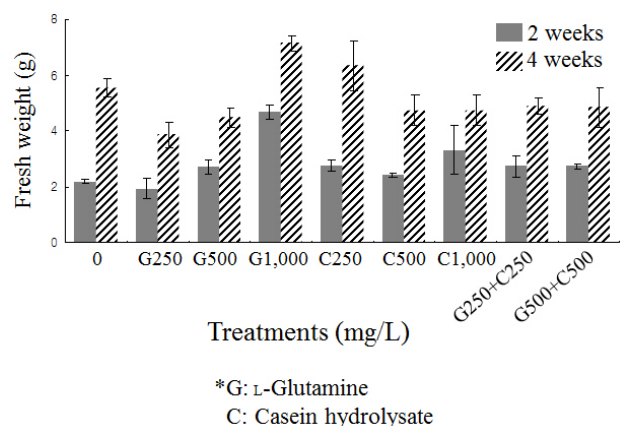


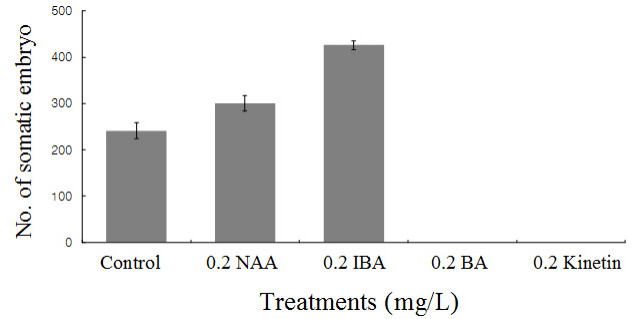
Fig. 1 Effect of various concentrations/combinations of organic nitrogen sources on tissue proliferation in *L. kaempferi*

에서 각각 2.2 및 1.9 g을 보여 비슷한 증가량을 보였다. 4주배양 후 결과에서는 1,000 mg L-Glutamine처리구에서 7.1 g으로 2주배와 동일한 최대 증가량을 보였으며 250 mg/L CH처리구에서 또한 6.3 g을 보여 조직생장에 효과가 있음을 보였다(Fig. 1). L-Glutamine의 경우 농도가 증가함에 따라 조직증식량은 증가하는 경향을 보인 반면 CH의 경우 다소 감소함을 보여 상반된 결과를 보였다. L-Glutamine과 CH혼합처리구는 농도에 관계없이 거의 유사한 조직증식량을 보였으며, CH 500 및 1,000 mg처리구의 조직증식량과도 유사하게 나타났다(Fig. 1).

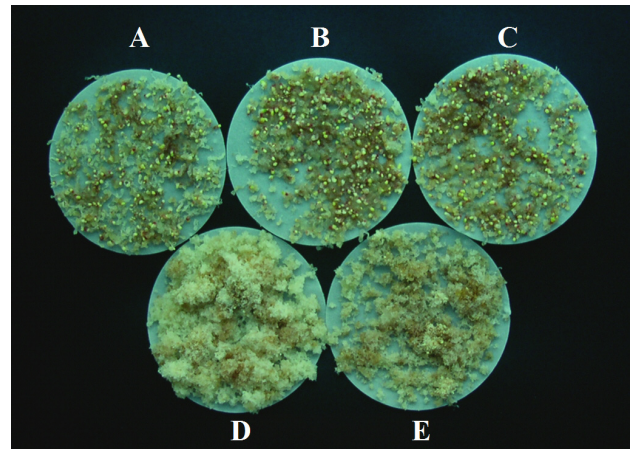
L-Glutamine 혹은 CH와 같은 유기질소원을 첨가 시 배 발생조직 증식 효과는 수중에 따라 다양하게 그 효과가 보고되고 있는데 *Picea glauca*의 배 발생조직 증식에는 500 mg/L 첨가 시 가장 높은 성장량을 보였으며(Barret *et al.* 1997), Ogita 등(2001)은 삼나무 배 발생조직 증식 시 2.4 g/L 정도의 Glutamine 첨가로 가장 높은 조직건중량을 보고하고 있어 본 실험의 결과와 유사하게 침엽수종의 배 발생조직 증식에는 Glutamine 등의 유기질소원 첨가가 효과적인 것으로 나타났다. 또한 유기질소원은 배 발생조직의 유지 및 증식에 유용하지만 또한 종자 및 침엽으로부터 배 발생조직 유도(Bozhkov *et al.* 1993; Harry and Thorpe 1991) 및 체세포배 유도(Bozhkov *et al.* 1993; Kim *et al.* 2007) 시 다양한 종류 및 농도의 첨가로 증진된 효과에 관해 다수 보고되고 있다. 반면 von Arnold (1987)는 독일가문비 나무의 배 발생조직 유도 시  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 가 함유된 배지에 Glutamine첨가 시 훨씬 그 유도율이 감소하였음을 보고해 항상 Glutamine 첨가가 유효한 것은 아님을 보고하고 있다.

식물생장조절물질 종류 및 농도에 따른 체세포배 유도 효과

체세포배 유도 시 4종류의 식물생장조절물질 첨가 효과를 조사한 것으로서 최대 체세포배 유도는 0.2 mg/L IBA 첨가 시 426.3개로 나타났으며(Fig. 2, 3), 0.2 mg/L BA 혹은 Kinetin 처리구에서는 전혀 유도되지 않아 첨가효과가 없었다. 본 실험의 경우 최대 체세포배 유도는 사이토키닌 류 첨가구에서는 전혀 유도되지 않았지만 *Sequoia sempervirens*의 침엽으로부터 직접적인 체세포배 유도에는 0.5 mg/L BA+ 0.5 mg/L IBA가 유효하였고(Liu *et al.* 2006), *Picea abies*의 체세포배 성숙 시에도 BA를 첨가함으로써 증가율 상승(Bozhkov *et al.* 1992)을 보고하고 있어 본 결과와는 다소 차이를 보였다. 이것은 사이토키닌 류 첨가가 체세포배 발생에 효과적인 것은 첨가 시 배 발생조직 내의 초기 원배 분화 과정을 촉진하며 결국 체세포배 성숙에 효과적임을 보여 준다(Bozhkov *et al.* 1992). 그러나 *Pinus bungeana* (Zhang *et al.* 2007) 및 *Picea abies* (Bozhkov *et al.* 1992)의 경우 IBA를 첨가함으로써 가장 높은 체세포배 유도를 보여 IBA와 같은 옥신 류의 식물호르몬이 필요함을 보여 본 연구의 결



**Fig. 2** Effect of various concentrations and types of auxins on somatic embryo production in *L. kaempferi*

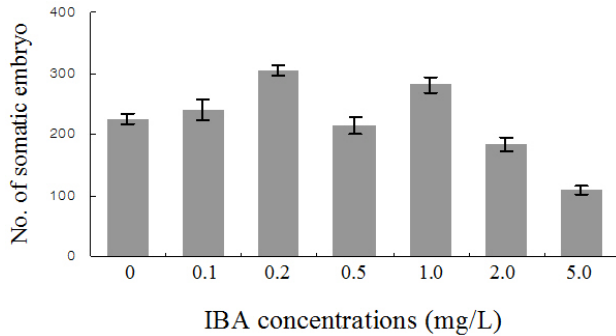


**Fig. 3** Comparison of somatic embryo production of *L. kaempferi* with varying treatment with plant growth regulators. (A) Control; (B) 0.2 mg/L NAA; (C) 0.2 mg/L IBA; (D) 0.2mg/L BA; (E) 0.2 mg/L Kinetin

과 일치하였다(Fig. 2). 또한 Jain (1988) 등은 *Picea abies* 배 발생조직으로부터 체세포배 유도 시 0.2 mg/L NAA를 첨가하여 시 가장 효과적임을 보고해 수중에 따라 옥신 류 종류에도 다소 차이가 있음을 보여 준다.

IBA 농도에 따른 체세포배 유도 효과

Figure 4는 Figure 2의 결과를 바탕으로 IBA농도를 0.1 ~ 5.0 mg/L까지 세분하여 조사한 결과 최대 체세포배 유도는 Figure 2에서와 마찬가지로 0.2 mg/L 첨가구에서 303.6개 (/90 mg 조직)로 가장 높았다(Fig. 3), 다음으로는 1.0 mg/L 처리구에서 281개로 높은 유도수를 보였고 5.0 mg/L 첨가구에서는 109.3개로 가장 저조하였으며, 1.0 mg/L 이상의 농도에서 점차 체세포배 유도 수가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4). 첨가된 IBA 농도에 따라 체세포배 유도 효율에 따른 보고는 수중에 따라 매우 다양하게 나타났는데 *Picea abies*의 경우 0.2 mg/L IBA (Becwar *et al.* 1989)를, *Pinus bungeana*의 경우 0.1 mg/L 첨가 시 최적으로 나타났으며(Zhang *et al.* 2007) 또한 *Sequoia sempervirens*의 체세포



**Fig. 4** Effect of various concentrations of IBA on somatic embryo production in *L. kaempferi*

포배 유도 시에는 0.5 mg/L BA+ 0.2 mg/L IBA의 혼합 첨가 시 높은 체세포배 발생 수를 보여(Liu *et al.* 2006) 수종마다 식물호르몬에 다양한 반응이 나타났지만 IBA와 같은 옥신 류의 첨가가 체세포배 성숙에 도움이 되는 것은 확실한 것으로 보였다. 이상의 결과는 유기질소원 첨가로 보다 증식율이 높은 배발생조직 획득 및 IBA와 같은 옥신 류의 식물호르몬의 처리로 고 빈도의 체세포배 발생을 달성하고 나아가 클론식물체 대량생산뿐만 아니라 신품종의 개발연구에도 널리 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 적 요

본 연구는 낙엽송의 배발생조직 증식 및 체세포배 유도에 영향을 주는 유기질소원(L-Glutamine 및 casein hydrolysate, CH), 식물생장조절물질(옥신 및 사이토키닌류)의 종류 및 농도의 효과를 평가하기 위해 수행되었다. 배발생조직 증식 비교에서 1,000 mg/L L-Glutamine 첨가 시 2주 혹은 4주 모두 가장 높은 조직생증량을 보였고 그 외 처리구에서는 대체로 유사하였다. 체세포배 유도에서는 0.2 mg/L IBA 첨가 시 가장 높은 426.3개를 유도하여 가장 효과적이었으나 0.2 mg/L BA 혹은 Kinetin 처리구에서는 전혀 체세포배가 유도되지 않았다. IBA 농도 별 비교에서는 0.2 mg/L (303개)농도가 가장 좋았으며, 1.0 mg농도에서도 281개를 유도하여 체세포배 유도에 효과적이었으나 5.0 mg/L 첨가 시 109.3개로 가장 저조하였다.

## References

- Arnold S von (1987) Improved efficiency of somatic embryogenesis in mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *J Plant Physiol* 128:233–244
- Barrett JD, Park YS, Bonga JM (1997) The effectiveness of various nitrogen sources in white spruce [*Picea glauca* (Moench)] somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 16:411–415
- Becwar M, Noland TL, Wyckoff JL (1989) Maturation, germination, and conversion of Norway spruce (*Picea abies* L.) somatic embryos to plants. *In Vitro Cell Develop Biol-Plant* 25:575–580
- Bozhkov PV, Lebedenko LA, Shiryaeva GA (1992) A pronounced synergistic effect of abscisic acid and 6-benzyladenine on Norway spruce (*Picea abies* L. Karst) somatic embryo maturation. *Plant Cell Rep* 11:386–389
- Bozhkov PV, Mikhlina SB, Shiryaeva GA, Lebedenko LA (1993) Influence of nitrogen balance of culture medium on Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) somatic polyembryogenesis: High frequency establishment of embryonal-suspensor mass lines from mature zygotic embryos. *J Plant Physiol* 142:735–741
- Gomez MP, Segura J (1996) Morphogenesis in leaf and single-cell cultures of mature *Juniperus oxycedrus*. *Tree Physiol* 16:681–686
- harry IS, Thorpe TA (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from mature zygotic embryos of red spruce. *Bot Gaz* 152:446–452
- Jain SM, Newton RJ, Soltes EJ (1988) Enhancement of somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies* L.). *Theor Appl Genet* 76:501–506
- Liu C, Xia X, Yin W, Huang L, Zhou J (2006) Shoot regeneration and somatic embryogenesis from needles of redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.). *Plant Cell Rep* 25:621–628
- Ogita S, Sasamoto H, Yeung EC, Thorpe TA (2001) The effect of glutamine on the maintenance of embryogenic cultures of *Cryptomeria japonica*. *In Vitro Cell Develop Biol-Plant* 37:268–273
- Zhang CX, Li Q, Kong L (2007) Induction, development and maturation of somatic embryos in Bunge's pine (*Pinus bungeana* Zucc. ex Endl.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 91:273–280