

낙엽송 (*Larix leptolepis*) 배발생조직의 초저온보존 및 식물체 재분화

김용욱* · 김준철¹ · 윤 양 · 노의래 · 손성호
임업연구원 임목육종부, ¹강원대학교 생물학과

Cryopreservation of Embryogenic Tissue and Plant Regeneration in *Larix leptolepis*

KIM, Yong Wook* · KIM, Joon Chul¹ · YOUN, Yang · NOH, Eu Rae · SON, Sung Ho
Department of Tree breeding, Forestry Research Institute, Suwon, 441-350, Korea
¹Department of Biology, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea

ABSTRACT The possibility for long-term preservation of *Larix leptolepis* embryogenic tissue was tested in this study. Higher relative increase of the tissue fresh weight was observed when embryogenic tissue was pretreated for 24 hrs in a medium containing 0.4 M sorbitol or 20% polyethyleneglycol with cooling rate of $-0.33^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The fast cooling rate of -0.5°C and $-1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ appeared to be less effective in regrowth of tissues from cryopreservation. No DNA variants have been observed by PCR analysis among the embryogenic tissues recovered after 1-, 7-, and 28-day-cryopreservation. The post-thaw embryogenic tissue gave rise to mature somatic embryos which developed into plants.

Key words: Larch, liquid nitrogen, long-term preservation, programmable freezer

서 론

목본식물 중에서도 침엽수는 체세포배로부터 유도된 식물체가 포장시험 결과 우수한 형질을 나타낼 경우에도 모수의 조직이 이미 성숙기로 전이되어 접 삽목 등의 일반 증식법을 적용하여 대량 식재하는 데는 많은 어려움이 있다. 따라서 모수로부터 유도된 배발생조직을 액체질소에 초저온보존 함으로써 형질검정이 끝날 때까지 장기간 활력손실 없이 보존할 경우 기내선발 육종의 효율을 더욱 높일 수 있을 것으로 생각된다 (Chen and Kartha 1987; Gupta et al. 1987).

최근 침엽수종의 배발생조직이 초저온보존에 적합하다는 것이 많은 연구결과로 밝혀져 클론번식에 필요한 배발생조직의 장기보존에 관한 집중적인 연구가 진행중에 있다 (Charest and Klimaszewska 1995).

Gupta 등 (1987)은 *Picea abies* 및 *Pinus taeda*의 배발생조직을 -196°C 의 액체질소에 10분간 초저온보존 후 활력이 있는 조직으로 재생장시켰으며 Bercetche 등 (1990)은 *Picea abies*의 배발생조직을 3개월 동안 초저온보존 후 식물체 재생에 성공한 바 있다. 특히 *Picea abies* 경우 abscisic acid (ABA)가 첨가된 배지에 배양했을 때 초저온보존을 하지 않은 세포보다 더욱 빨리 체세포배를 유도할 수 있었는데 이것은 초저온보존시 배발생조직에 혼재되어 있는 비배발생조직은 사멸되고 세포질이 풍부한 배발생조직 부위의 세포만 생존하였을 가능성을 보여줌으로써 초저온보존이 배발생조직의 선발에도 적용될 수 있음을 시사하였다.

초저온보존 후 조직 재생장률은 높은 것으로 보고되어 있는데 *Picea glauca engelmannii*에서는 357개의 genotype중 97%가 생존하였으며 (Cyr et al. 1994), Park 등 (1994)은 *Picea glauca*의 551개 클론의 83% 정도가 초저온보존 후에도 조직생존율을 유지하고 있음을 보고한 바 있다.

침엽수종의 배발생조직을 이용한 초저온보존에 관한 국내 연구는 시작단계에 있으므로 본 연구에서는 유용한 침엽수종

*Corresponding author. Tel 0331-290-1183
E-mail yongwookkim@hanmail.net

중 하나인 낙엽송 배발생조직을 이용하여 초저온보존에 요구되는 적정 삼투압제 종류 및 동결온도 하강율 등을 구명함으로써 초저온보존된 조직으로부터 식물체 재분화에 이르는 기술의 확립을 통해 실질적인 기내선발 육종에 적용하기 위하여 실시되었다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 낙엽송 배발생조직은 충북 충주에 위치한 낙엽송 클론 채종원에서 채취한 미숙종자를 배양하여 유도하였다. 미숙종자가 포함된 구과 표면소독은 95% 에탄올에 2분간, 6% NaClO 용액에 10분간 침지 후 다음 멸균증류수로 1회 세척하였으며 배양직전에 95% 에탄올로 화염살균한 후 구과로부터 미숙배를 분리시켜 배양하였다. 배발생조직 유도 배지는 LM (Litvay et al. 1985) 배지에 2.0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 1.0 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP), 1,000 mg/L glutamine 및 3% sucrose를 첨가하였으며, pH 5.7로 조정 후 0.4% gellan gum (Sigma)을 첨가시켜 고행배지로 만들어 사용했다. 그리고 glutamine 용액은 1회용 membrane filter (0.2 µm)를 이용하여 여과멸균 후 열소독이 끝난 뒤 배지온도가 45°C 정도로 되었을 때 첨가하였다. 미숙종자의 배배양시 종피와 배유조직 (female gametophyte)은 제거하고 접합배만을 배양하였으며 절단면을 배양배지면에 접하도록 하여 24°C 암소에서 8주간 배양하였다. 계대배양은 동일조성의 새 배지에 4주간격으로 실시하였다. 유도된 배발생조직의 증식을 위해 염류의 양을 반으로 줄인 1/2 LM 배지에 2.0 mg/L 2,4-D, 1.0 mg/L BAP, 1,000 mg/L glutamine, 2% sucrose 및 0.4% gellan gum이 첨가된 배지에 1주간격으로 계대배양하여 증식하였다.

초저온보존 및 해동

초저온보존을 위한 배발생조직은 계대배양 3일 후의 재료를 사용했으며 먼저 전처리과정으로서 100 mL 삼각플라스크에 cryosolution I (Table 1)을 7 mL 첨가한 후 여기에 배발생조직 1 g을 잘게 부숴 넣은 다음 암소에서 120 rpm 정도로 24시간 현탁배양하였다. 현탁배양후 배발생조직이 포함된 삼각플라스크를 분쇄된 얼음속에 놓고 cryosolution II (Table 1)를 0.5 mL씩 5분간격으로 총 6번 첨가하고, 초저온 보존용액 첨가시 4-5초간 흔들어서 배발생조직과 고루 섞이도록 하였다. Cryosolution II를 모두 첨가한 후 얼음속에서 30분간 정체한 다음 1.5 mL 용량의 초저온 보존용 vial (Nalgene)에 1 mL씩 현탁된 조직을 분배하였다. 그 후 programmable freezer (KRYO 10, Planer)에 넣어 -0.33°C/min의 동결속도

로 -40°C까지 조직을 동결시켰다. 동결된 조직은 동결기로부터 즉시 꺼내 곧바로 액체질소속으로 넣어 초저온저장을 시작하였다.

액체질소 속에서 보존중인 조직의 해동은 액체질소에서 튜브를 꺼낸 즉시 40°C 정도의 온수에 3-4분간 담귀 급속 해동시킨 다음 70% 에탄올에 2-3분 침지 후 무균대에서 완전히 건조시켰다. 해동된 조직은 종이필터 (Whatman No. 2)가 깔린 배발생조직 증식배지로 옮겨 24°C 암상태에서 24시간 배양한 후 동일조성의 배지로 옮겨주었다.

초저온보존으로 재생장된 배발생조직은 1/2 LM 배지에 1.0 mg/L abscisic acid (ABA), 1,000 mg/L glutamine, 3% sucrose 및 0.4% gellan gum이 첨가된 배지에서 체세포배를 유도하였으며 식물체는 1/2 LM 배지에 2% sucrose 및 0.4% gellan gum이 첨가된 배지에서 재분화 시켰다.

Table 1. Composition of cryoprotectant solutions tested for cryopreservation of in *L. leptolepis* embryogenic tissue.

Ingredients	Cryosolution I	Cryosolution II
Salt	1/2LM salt	LM salt
Vitamine	× 1 LM vitamine	× 2 LM vitamine
2,4-D	2.0 mg/L	4.0 mg/L
BA	1.0 mg/L	2.0 mg/L
Casein hydrolysate	1,000 mg/L	2,000 mg/L
Glutamine*	500 mg/L	1,000 mg/L
Sorbitol	0.4 M	0.8 M
Sucrose	2%	4%
DMSO**	-	20%
pH	5.7	5.7

* The solution was sterilized with membrane filter (0.2 µm) and then added after autoclving.

** Dimethyl sulfoxide.

Table 2. Effect of various osmotica and cooling rates on regrowth of *L. leptolepis* embryogenic tissue from one-day cryopreservation.

Treatments	Fresh weight increment (mg) (Mean ± SE)
cooling rate : - 0.33°C/min	
0.4M sorbitol	243.0 ± 20.8ab*
20% PEG**	289.7 ± 26.7a
cooling rate : - 0.5°C/min	
0.4M sorbitol	187.7 ± 18.1bc
20% PEG	189.0 ± 4.6bc
cooling rate : - 1.0°C/min	
0.4M sorbitol	193.0 ± 27.8bc
20% PEG	131.0 ± 22.7c

* Means with the same letter are not significantly different as determined by an analysis of variance with Duncan's Multiple Range Test.

Pr>F : 0.004, F value: 6.41.

** Polyethylene glycol.

동결온도 하강률 및 삼투압제 효과 비교

-0.33°C, -0.5°C 및 -1.0°C/min 등 3가지의 조직 동결온도 하강률에 따른 0.4 M sorbitol 및 20% polyethylene glycol (PEG, 분자량 3,350, Sigma)로 삼투압제 전처리하여 초저온 보존 후 배발생조직 재생장시 동결온도 하강률 및 삼투압제 종류에 따른 조직 재생장량을 4주배양 후 측정, 비교하였다.

Sorbitol 과 PEG 삼투압제 효과 비교

동결 온도하강률은 -0.33°C/분으로 고정하고 0.4 M sorbitol 및 20% PEG 전처리 한 다음 초저온보존 후 조직을 재생장시 2종류의 삼투압제 처리에 대한 조직 성장량을 1주간격으로 배양 6주까지 측정, 비교하였다.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

배발생조직을 액체질소로부터 초저온보존 기간별 (1일, 1주 및 4주)로 회수한 다음 증식배지에서 재생장시킨 배발생조직 0.5 g을 액체질소를 첨가하여 파쇄한 후 DNA를 분리하였다. DNA 분리와 정제는 DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN, Germany)를 이용하였으며 그 방법은 제조회사의 설명서에 따랐으며 정제된 DNA는 멸균증류수에 녹여 -20°C에 보관하여 사용하였다. DNA 증폭에 사용된 primer는 10개의 염기로 이루어진 random primer (OPERON, USA)인 OPA-02 (5'-TGCCGAGCTG-3'), OPA-07 (5'-GAAACGGGTG-3') 및 OPA-09 (5'-GGGTAACGCC-3')을 사용하였다. PCR의 각 반응액은 3.0 ng (1.0 ng/μL) template DNA, 1.0 μL (1 ng/μL) primer, 1.5 unit (5 unit/μL) Taq polymerase, 2.4 μL MgCl₂ (25 mM), 3 μL 10×buffer (500 mM KCl, 140 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1% Triton X-100), 0.6 μL dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 등을 첨가 후 tube당 30 μL로 최종부피를 맞추었다. PCR조건은 94°C에서 40초, 35°C에서 40초, 72°C에서 1분20초를 하나의 cycle로 하여 총 40 cycle을 반복한 후 72°C에서 10분간 더 유지시켜 주었다. 증폭이 완전히 종료된 다음에는 2% agarose gel에서 전기영동한 다음 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator상에서 polaroid camera로 촬영하였다.

결과 및 고찰

식물조직을 성공적으로 초저온보존하기 위해서는 세포내 얼음결정 형성을 최대한 억제시켜야 하는데 조직동결 동안 얼음결정 형성은 세포를 파괴시켜 결국 조직을 고사시킨다. 따라서 세포내 수분을 제거하기 위해서는 고농도의 sorbitol 혹은 PEG와 같은 삼투압제가 고농도로 첨가된 배지를 이용

한 전처리과정이 필요하며 그 후 (DMSO) dimethyl sulfoxide와 같은 초저온 보존제를 첨가한다. 또한 조직을 -196°C 액체질소에 보존하기전 programmable freezer를 이용하여 -40°C까지 서서히 동결시켜야 하는데 이 과정동안 세포내 얼음결정 형성을 최소화시킬 수 있는 동결온도 하강률 결정은 매우 중요하다.

본 실험에서 낙엽송 배발생조직의 초저온보존에 필요한 몇 가지 요인을 조사한 바 table 1은 낙엽송 배발생조직의 초저온보존 전처리시 삼투압제 종류 및 동결온도 하강률에 따른 조직재생장 비교 결과로서 20% PEG로 전처리 후 -0.33°C/min의 동결 온도하강률을 적용시 4주배양 후 가장 높은 289.7 mg의 조직생중량을 보여 조직 재생장시 가장 효과적인 처리구로 나타났다. 다음으로 243 mg 생중량을 보인 -0.33°C/분 + 0.4 M sorbitol의 처리구였으며 두 처리구간에는 통계적 유의성 (Pr>F : 0.004, F value : 6.41)은 인정되지 않아 초저온보존 후 두처리 모두 조직재생장 효과가 비슷한 것으로 나타났다. 그러나 -1.0°C/min+20% PEG 처리구에서는 가장 낮은 131 mg의 조직생중량을 보였다 (Table 2, Figure 1). 또한 -0.33°C/min 온도하강률의 경우 삼투압제 종류에는 관계없이 높은 조직 재생장량을 보였으나 그의 처리구에서는 삼투압제 종류보다는 동결온도 하강률 차이에 다소 영향을 받는 것으로 보이는데 (Table 2) 대개 -0.3°C/min (Kartha et al. 1988; Klimaszewska et al. 1992), -0.5°C/min (Find et al. 1993; Laine et al. 1992), -1.0°C/min (Gupta et al. 1987)등의 범위에서 수중에 따라 최적 동결온도 속도를 정하고 있다. 또한 초저온보존제에 첨가하는 sorbitol 및 PEG 농도가 중요한데 sorbitol의 경우 대부분 수중에서 0.4 M 농도를 첨가하지만 (Kartha et al. 1988; Klimaszewska et al. 1992; Norgaard and Duran 1993) PEG를 첨가 경우는 드물다. Sorbitol 및 PEG는 prefreezing첨가물로도 널리 이용되며 그 기능은 세포내의 탈수를 촉진하여 세포 평균크기를 줄임으로써 동결시작때 세포내에서 얼음결정 형성을 억제시키는 역할을 한다 (Klimaszewska et al. 1992). 따라서 본 실험의 경우도

Table 3. Comparison of sorbitol and PEG on regrowth of *L. leptolepis* embryogenic tissue from one-day cryopreservation.

Culture period (weeks)	Fresh weight (mg) (Mean ± SE)	
	0.4 M sorbitol	20% PEG
1	224.0 ± 23.2f*	241.7 ± 4.9f
2	527.3 ± 63.3ef	536.3 ± 40.8ef
3	889.0 ± 141.9de	1030.3 ± 121.5de
4	1456.7 ± 168.0c	1790.0 ± 17.3c
5	2218.0 ± 230.0b	2312.3 ± 121.4b
6	3018.0 ± 239.1a	2926.7 ± 242.0a

* Means with the same letter are not significantly different as determined by an analysis of variance with Duncan's multiple range test. Pr>F : 0.0021, F value : 4.04.

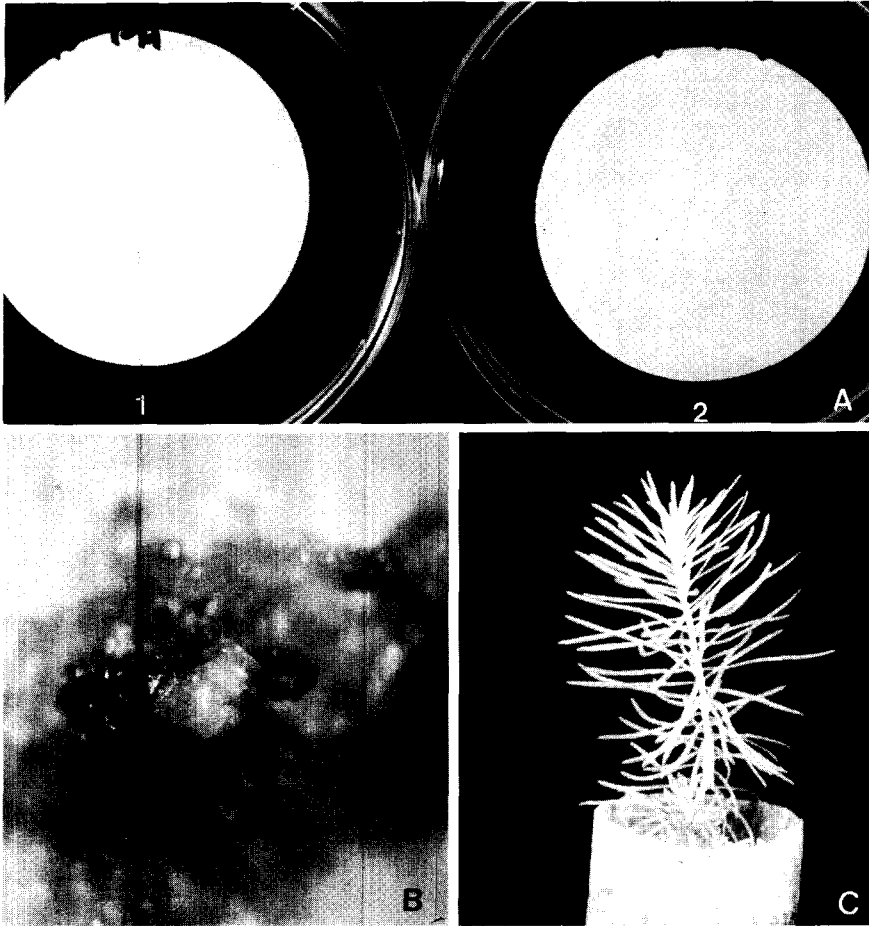


Figure 1. Regrowth of *L. leptolepis* embryonic tissue recovered from cryopreserved tissue and plant regeneration. (A1) $-0.33^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 0.4M sorbitol; (A2) $-1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 20% PEG; (B) somatic embryo induction; (C) Regenerated plant.

sorbitol과 PEG 삼투압제효과 비교시 초저온보존 후 4주배양으로 조직 성장 속도는 PEG에서 다소 높은 경향을 보였지만 두 삼투압제 처리간의 차이는 별로 없는 것으로 나타났다 (Table 2).

Table 3은 $-0.33^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 동결하강율을 정하고 0.4 M sorbitol 및 20% PEG를 삼투압제로 사용하여 24시간 초저온보존 후 배양 1주부터 6주까지 초저온보존된 조직의 생중량을 비교한 것으로 배양 1주 후 sorbitol 처리구에서는 224 mg, PEG 처리구에서는 241 mg의 생중량을 보여 두 처리간 조직 생중량은 거의 유사함을 보였다. 그리고 배양 2-5주까지 두 처리간에는 조직 생중량의 큰 차이를 보이지 않았지만 배양 6주에는 sorbitol 처리구에서 3,018 mg, PEG 처리구에서는 2926.7 mg으로 0.4 M sorbitol 처리구에서 다소 높은 생중량을 보였다. 그러나 배양기간에 따른 두 삼투압제 처리간의 조직생중량에 대한 통계적 유의성 ($\text{Pr}>\text{F}$: 0.0001, F value: 48.09)도 인정되지 않아 초저온보존 전처리시에 사용한

sorbitol 및 PEG의 효과는 거의 비슷한 것으로 나타났다.

일반적으로 조직배양물은 2-4주간격으로 계대배양해줌으로써 계속 활력을 유지할 수가 있지만 많은 인건비와 경비가 소요된다. 또한 빈번한 계대배양으로 곰팡이와 세균 오염, 체세포배 발생능력 감소 및 체세포변이 (somaclonal variation) 등과 같은 유전자변형 문제가 생길 가능성이 있지만 초저온보존중에는 체세포변이와 같은 DNA염기 변형을 거의 유기시키지 않는 것으로 알려져 있다. Figure 2는 액체질소에서 배발생조직을 각 보존시간별 (1일, 1주 및 4주)로 회수한 다음 조직을 재생장시켜 DNA 변이를 조사한 결과로서 세종류의 OPA-02, OPA-07 및 OPA-09 random primer 등에서 DNA 변이가 전혀 발견되지 않았다. 물론 본 실험의 경우 짧은 기간동안의 초저온보존으로 DNA변이가 유기될 가능성은 없지만 *Picea glauca*의 초저온보존된 조직 유래 식물체의 DNA fingerprinting 조사에서 7가계 (family) 모두 DNA변이가 관찰되지 않았으며 (Cyr et al. 1994), *Pinus caribaea* 초

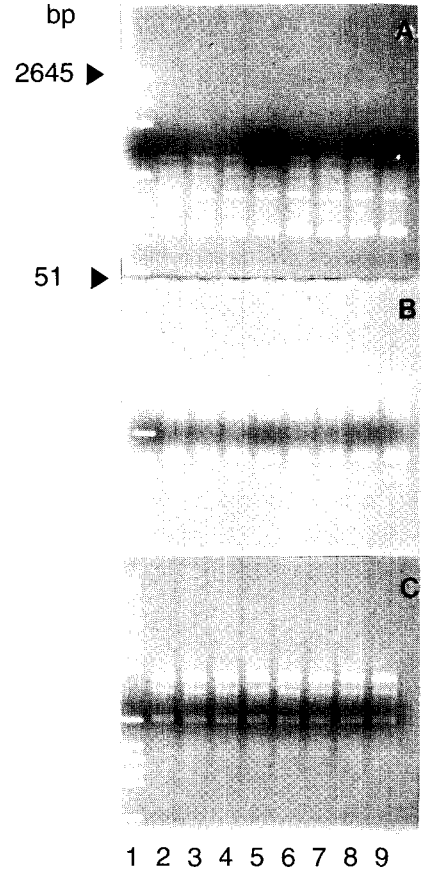


Figure 2. Random amplified DNA from cryopreserved and non-cryopreserved embryonic tissue (ET) of *L. leptolepis*. (A) Primer OPA-02, B: Primer OPA-07, C: Primer OPA-09. lane 1: pGEM size marker; lanes 2-3: non-cryopreserved ET; lanes 4-5: one-day cryopreserved ET; lanes 6-7: one-week cryopreserved ET; lanes 8-9: one-month cryopreserved ET.

저온보존을 한 배발생 조직으로부터 재분화된 식물체 또한 실생묘와의 성장율과 표현형 비교시 유사함을 보고하고 있어 (Laine et al. 1992) 초저온보존을 통한 침엽수종의 장기간의 조직보존은 매우 안정적임을 알 수 있다.

본 연구를 통하여 낙엽송 배발생조직의 초저온보존시 조직의 재생장 및 체세포배 형성이 안정적으로 유도되는 방법을 구명함으로써 향후 목본식물뿐만 아니라 초본류의 생식질 장기보존, 배발생조직 및 세포주 선발에 유용하게 적용될 수 있을 것이라 생각된다.

적 요

본 연구에서는 낙엽송 배발생조직의 장기저장을 위한 가능성에 대하여 조사하였다. 0.4 M 혹은 20% PEG로 24시간 전 처리하여 $-0.33^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 동결온도 하강율로 초저온시켰을 때 높은 조직생중량을 보인 반면 -0.5 혹은 $-1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 경우 초저온 후 조직의 생중량이 저조한 것으로 나타났다. 1, 7, 및 28일간 초저온보존된 조직을 회수하여 재생장시킨 다음 PCR을 이용하여 변이분석을 한 결과 초저온보존 기간에 관계없이 DNA변이는 전혀 나타나지 않았다. 초저온보존된 배발생 조직으로부터 체세포배 유도 및 식물체 재분화를 유도할 수 있었다.

사 사 - 본 연구는 '97년 단기 공무원 훈련과제의 연구결과입니다. 캐나다 Atlantic Forestry Centre의 박일성 박사, Mrs. Weiming께 감사의 뜻을 전합니다. 그리고 PCR을 수행해준 임업연구원 최영임씨께도 감사드립니다.

인용문헌

Bercetche J, Galeme M, Dereuddre J (1990) Efficient regeneration of plantlets from embryogenic callus of *Picea abies* (L.) Karst after freezing in liquid nitrogen. CR Acad Sci Ser **310**:357-363

Charest PJ, Klimaszewska K (1995) Tree germplasm preservation using biotechnology. In: Charest PS, Duchesne LC, (eds), Recent Progress in Forest Biotechnology in Canada, Petawawa National

Forestry Institute Information, Rep PI-X-120, pp 10-15

Chen THH, Kartha KK (1987) Cryopreservation of woody species. In: Bonga JM, Durzan DJ, (eds), Cell and Tissue. Culture in Forestry, Vol 2, Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp 305-319

Cyr DR, Lazaroff WR, Grimes SMA, Quan G, Bethune TD, Dunstan DI, Roberts DR (1994) Cryopreservation of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) embryogenic cultures. Plant Cell Rep **53**:574-577

Find JI, Floto F, Krogstrup P, Moller JD, Norgaard JV, Kristensen MH (1993) Cryopreservation of an embryogenic suspension culture of *Picea sitchensis* and subsequent plant regeneration. Scand J For Res **8**:156-162

Gupta PK, Durzan DJ (1987) Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. Bio/Tech **5**:148-151.

Gupta PK, Durzan DJ, Finkle BJ (1987) Somatic polyembryogenesis in embryogenic cell masses of *Picea abies* (Norway spruce) and *Pinus taeda* (loblolly pine) after thawing from liquid nitrogen. Can J For Res **17**:1130-1134

Kartha KK, Fowke LC, Leung NL, Caswell KL, Hakman I (1988) Induction of somatic embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*). J Plant Physiol **132**: 529-539

Klimaszewska K, Ward C, Cheliak WM (1992) Cryopreservation and plant regeneration from embryogenic cultures of larch (*Larix x eurolepis*) and black spruce (*Picea mariana*). J Exp Bot **43**:73-79

Laine EP, Bade P, David A (1992) Recovery of plants from cryopreserved embryogenic cell suspensions of *Pinus caribaea*. Plant Cell Rep **11**:295-298

Litvay JD, Verma DC, Johnson MA (1985) Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). Plant Cell Rep **4**:325-328

Norgaard JV, Duran V (1993) Variations in cryotolerance of embryogenic *Picea abies* cell lines and the association to genetic morphological, and physiological factors Can J For Res **23**: 2560-2567

Park YS, Pond SE, Bonga JM (1994) Somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control in somatic embryos exposed to storage, maturation treatments, germination, and cryopreservation. Theor Appl Genet **89**:742-750

(접수일자 1999년 7월 6일)