

체세포 배발생을 통한 백합나무 (*Liriodendron tulipifera* L.)의 대량증식

이재순*, 문흥규, 김용욱
임업연구원 생물공학과

Mass Propagation of *Liriodendron tulipifera* L. via Somatic Embryogenesis

Jae-Soon Lee*, Heung-Kyu Moon, Yong-Wook Kim

Biotechnology Division, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

ABSTRACT Mass propagation of tulip tree (*Liriodendron tulipifera* L.) via somatic embryogenesis was successfully achieved with immature samaras collected from adult trees. Embryogenic tissues were induced by culturing the samaras on 1/2 LM medium (Litvay's) containing 2,4-D and BA. Somatic embryos developed from the embryogenic tissues and germinated to normal plants (emblings) upon transfer onto the same medium containing either AgNO₃ or activated charcoal. So far, several factors appeared to influence both the induction of embryogenic tissues and germination of the embryos into plants. These include the collection time of samaras for the induction of embryogenic tissue, sucrose level in the culture medium, the level of both AgNO₃ and activated charcoal, and plating density of somatic embryos on germination medium for maturation and germination of somatic embryos into plantlets.

Key words: Somatic embryogenesis, tulip tree, emblings

서 론

엘로우 포플러로도 불리는 백합나무 (*Liriodendron tulipifera* L.)는 북미가 원산인 속성활엽수이다. 우리나라에 백합나무가 처음 도입된 것은 1925~1929년 사이에 조선총독부 임업시험장에서 북미산 종자를 도입하여 조립한 것으로 알려져 있다. 이 수종은 우리나라에서 다른 많은 자생 활엽수종보다 뛰어난 환경 적응성과 생장력을 보여주고 있으며, 재질이 우수하여 가구재, 건축재, 목공예재 등 80여 가지의 용도로 사용되는 부가가치가 높은 수종으로 알려져 있다 (Ryu 2003). 그러나 이 수종의 대량번식은 10~20% 정도의 낮은 총실 종자율 (Kavanach and Carleton 1990)과 발아율 때문에 양묘 전문가들에게도 쉽지 않은 것으로 알려져 있다. 현재 우리나라에서 대면적 조림을 위한 실생묘의 생산을 목적으로 집중적인 양묘기술이 개발되고 있는데 이는 그 경제성과 적응성을 인

정받았기 때문이다 (Ryu 2003).

최근에는 체세포 배배양 방법이 침엽수와 활엽수의 많은 수종을 대상으로 묘목의 대량생산을 위하여 광범위하게 시도되고 있다. 이미 많은 임목에서 이 배양 방법은 단기간에 수백만본의 동일한 클론을 생산할 수 있는 것으로 보고되고 있다 (Lee and Soh 2002; Moon and Son 1999; Sommer and Brown 1980). 체세포배 유도를 이용한 식물체 재분화는 캘러스에서 줄기유도가 되지 않는 대부분의 목본식물에 유전자총을 이용한 유전 형질전환 방법에 적절한 대안으로 인정되고 있다. 이미 이를 이용한 형질전환 사례가 목본식물에서 많이 보고되고 있다 (Aronen et al. 1998; Walter et al. 1998; Wilde et al. 1992). 그러나 체세포배 유도를 통한 대량증식 방법개발은 shoot tip 배양과는 달리 체세포배 발생조직 유도, 체세포배 성숙, 발아, 순화 등의 과정이 몹시 까다로우며 그 효율도 매우 낮고 수종 혹은 품종마다 반응이 다양한 것으로 알려져 있다. 따라서 백합나무의 체세포배 유도를 통한 대량증식은 각 단계별 적정조건의 구명이 선행되어야 가능할 것이다. 본 연구에서는 유망 조립수종으로 육성중인 백합나무 미숙배의 기내

*Corresponding author Tel 031-290-1162 Fax 031-290-1020
E-mail jasoolee@foa.go.kr

배양을 통하여 종자채취 시기, 배지 및 배지 첨가제 등의 조절을 통한 체세포배 발생과 식물체 재분화 과정을 조사하였다. 또한 각 단계별 최적화를 통하여 대량증식의 가능성을 점검하고 유전자 이식을 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료

임업연구원 구내에 식재된 30년생 백합나무 (*Liriodendron tulipifera* L.)의 종자를 개화 4주 후부터 3~4일 간격으로 날개가 붙어있는 미숙구과를 채취하여 이용하였다. 소독은 5% 과염소 나트륨용액에 10분간 표면 소독하였고 멸균수로 3회 세척하여 소독액을 제거한 후 종피는 제거하고 배지에 치상하였다. 종피가 딱딱해지기 이전인 개화 후 4~5주에는 종피를 제거한 후 치상하였고 5주 이후 종피가 딱딱해졌을 때는 종자를 횡으로 절단하여 배유를 포함한 배를 하나의 플레이트에 5점씩 배지 당 30점을 치상하였다.

배발생 조직 유도

배발생 조직 유도를 위하여 다음과 같이 3종의 배지 [MS (Murashige and Skoog 1962), LM (Litvay et al. 1985), 1/2 LM]에 2.0 mg/L 2,4-D와 0.25 mg/L BA, 1.0 g/L casein hydrolysate, 4% sucrose를 첨가하여 멸균 소독하기 이전에 pH를 5.7로 조정하여 사용하였고 배양온도는 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 조도는 $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 16시간 일장 하에서 명 배양과 암 배양을 실시하였다. 미숙종자 채취시기에 따른 배발생 조직 형성률을 조사하였다.

체세포배의 유도 및 발아, 순화

체세포배 유도 및 발아를 위하여 2개의 체세포배 발생 cell line을 이용하여 비교하였다. 배발생 조직을 생장조절물질을 첨가하지 않은 1/2 LM 배지에 이식하였다. AgNO_3 와 활성탄 및 sucrose를 혼합 또는 단독으로 첨가하여 체세포 배발생 효율을 조사하였다. 또한 체세포배를 액체 배양하여 체로 걸러서 $38 \mu\text{m}$ 와 $140 \mu\text{m}$ 사이의 체세포배를 4종류 (50, 100, 150, 200 mg/L)로 세포밀도를 조정하여 치상 밀도에 따른 발아율을 조사하였다. 생장된 체세포배는 버미큘라이트, 펠라이트, 피트모스가 1:1:1로 혼합한 인공토양을 넣은 포트에 이식하여 온실에서 순화시켰다.

결과 및 고찰

배발생 조직의 유도

미숙종자를 배양한지 8주후에 암 조건에서 육안으로 관찰했을 때 덩어리의 캘러스 조직과는 달리 부서지기 쉬운 영성한 연녹색의 배발생 조직이 유도되었다 (Figure 1). 그러나 명배양 한 종자에서는 배발생 조직이 형성되지 않았다. 배발생 조직은 캘러스와 형태적으로 유사하였고 미숙종자의 뿌리 발생 부분에서 형성되었다. 이 배발생 조직은 부드럽고 치밀하였으며 연녹색을 띠는 부정형으로 성장하였다. 이러한 체세포배 유도 조직의 특징은 같은 백합나무에서 이미 Merkle과 Sommer (1986)가 보고한 바 있다. 3종류의 배지 (MS, LM, 1/2 LM) 사이에 배발생 조직 형성율에서 차이가 나타나지 않았다 (자료 미 제시).

최초의 배발생 조직은 개화 4주후 (처음 채취) 채취한 종자에서부터 나타났다. 그러나 배발생 조직의 형성률은 종자 채취시기에 크게 영향을 받아 개화 10주 이후까지는 시간이 지날수록 떨어지고 있어서 종자 내 배의 발달 단계와 체세포배 유도조직의 발생이 밀접한 관련이 있음을 나타내고 있다. Sotak 등 (1991)은 백합나무에서 수분 후 8주 된 미숙종자에서 28%정도의 높은 배발생 조직을 얻을 수 있었다고 보고하였으며, 이 시기의 배발달 단계는 아직 심장형에 도달하지 않았다고 하였다. 또한 Wetzstein 등 (1989)은 페킨은 자엽의 신장기가 배배양의 적기라고 하였으며, 침엽수에서는 체세포배 배양의 적기가 활발한 자엽 발달기 (Lu and Thorpe 1987; Webb et al. 1989)부터 자엽전단계의 배 (Durzan and Gupta 1987)가 가장 적절하였다고 하였다. 그러나 백합나무 종자의 시기에 따른 배 발달 과정은 이 시기가 배유 등이 액체상태이고 종피에 알콜 등의 투과가 어려워 해부학적 검정은 실패하였다. Figure 2는 배발생 조직의 형성이 종자 채취시기에 크게 영향을 받음을 나타내고 있다. 비록 배발생 조직이 개화 4주후에 채취한 미숙종자에서 유도되기는 하였지만, 개화한 지 4~9주 사이에서는 배발생 조직의 유도율이 현저히 떨어지는

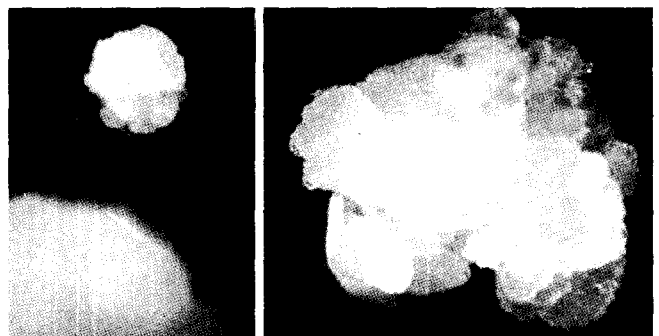


Figure 1. Embryogenic tissue induction from an immature seed of tulip tree. The tissue arose when the seed was cultured on 1/2 LM medium with 2,4-D 2.0 mg/L, BA 0.25 mg/L for 8 weeks.

현상이 관찰되었다. 가장 높은 배발생조직 유도율은 개화 후 11~15주 사이에 채취한 종자에서 관찰되었다. 개화 후 6~9주 사이의 낮은 배발생 조직 유도율은 배유가 고체화되지 않았기 때문에 미숙종자에서 종피를 제거한 건전한 전배조직을 분리하여 배양할 수 없었기 때문일 수도 있다. 또한 초기에 배발생조직 유도율이 높게 나타난 이유는 이 시기에는 쉽게 종피가 분리되기 때문에 종자를 절단하지 않고 치상하였기 때문에 물리적 피해를 덜 받았기 때문일 것으로 생각된다.

체세포배 발생

배발생조직을 체세포배 분화 배지인 성장조절물질이 포함되지 않은 1/2 LM에 이식한 후 2주일이 경과하였을 때 체세포배가 발생하였다 (Figure 3). 배발생 조직에서 다른 특별한 처리 없이도 체세포배가 분화되었다. Park 등 (1993)은 새머루의 배발생 캘러스를 MS 기본배지로 이식하였을 때 정상적인 식물체로 발달하는 것을 보고하였고 Moon 등 (1999)도 두릅나무의 동아에서 유도된 캘러스를 MS 기본배지에 이식하였을 때 체세포배가 발생함을 보고하였다. 그러나 Nishiwaki 등 (2000)은 당근 실생묘에 ABA를 처리하였을 때 체세포배가 형성됨을 보고하고 있어서 수중에 따라서 체세포배의 유도조건이 다를 수 있다. 배발생 조직에서 체세포배가 발

생되는 빈도는 세포주 (하나의 미숙배에서 분화된 조직들을 한 세포주로 명명함)에 따라서도 다르게 나타났다. 세포주 6에서는 8.8% 발생되었는데 세포주 7에서는 11.7%의 체세포배가 발생하였다. 이러한 현상은 다른 식물에서도 많이 목격되었는데 Fuentes 등 (2000)은 커피에서 유전자형에 따라서 체세포 배발생 빈도가 20~100%까지 다르게 나타난다고 보고하였으며, Moon 등 (2001)도 두릅나무에서 유전자형에 따라서 배발생 빈도가 0~100%의 변이를 보인다고 보고하고 있다. 많은 수의 체세포배가 분화되었으나 형태적으로 비정상적인 체세포배도 높은 빈도로 관찰되었다. 정상적인 체세포배는 종자에서 발아된 식물체와 같이 자엽이 2개로 서로 대칭으로 붙은 것으로 그 빈도는 46.8%로 나타났다. 그러나 비정상 체세포배는 원통 형태의 자엽으로 그 빈도는 무려 50.2%에 이르고 있다. 다른 종류의 비정상 체세포배로는 하나의 자엽을 가진 형태가 있으며 대략 3%로 나타났다. Park 등 (1993)도 새머루에서 한쪽 자엽이 발달하지 못한 여러 가지 형태의 비정상적인 체세포배의 관찰을 보고하였고, Merkle과 Sommer (1986)는 백합나무의 경우 90% 이상의 체세포배가 정상적으로 발달하지 못했다고 보고하였다. 따라서 정상 체세포배 발생효율을 높이려면 비정상 체세포배의 비율을 낮추어야 함을 시사한다.

체세포배의 성숙, 발아 및 이식

배발생 조직에서 분화된 체세포배는 낮은 농도의 sucrose (2%)에 활성탄이나 또는 AgNO₃를 첨가한 배지에 이식하였을 때 발아되었고 발아율은 20%였다. AgNO₃ 1.0 mg/L을 배지에 첨가하였을 때 체세포배 발생이 촉진되었으나 높은 농도 (2 mg/L)에서는 오히려 체세포배 발생이 억제되었다. Al-Khayri와 Al-Bahrany (2001)는 야자나무에서 AgNO₃를 첨가하였을 때 캘러스의 성장도 양호하였고 체세포배의 발생 및 발달에 효과가 있었다고 하였으나, 수중에 따라서 효과가 다르게 나타난다는 보고들이 있다.

sucrose를 2% 첨가한 것이 1%를 첨가한 것에 비하여 체세포배 발아를 2~3배 정도 향상시켰는데 이것도 처리한 두 cell line의 반응이 다르게 나타났다. sucrose 농도를 3%이상 첨가한 경우에는 체세포배가 갈변하고 전혀 발아되지 않았다. Nhut 등 (2001)은 백합 구근 배양에서 sucrose의 농도가 3~4% 첨가한 조합이 줄기 형성률이 높았으나 발근이 전혀 이루어지지 않고 2% 첨가 시에 줄기 형성률은 다소 낮았지만 발근이 정상적으로 이루어졌다고 하였다. 이것은 sucrose가 체세포배 발아 시 탄소원으로서의 역할보다 삼투압 조절에 더 큰 기능을 하고 있음을 암시한다.

체세포배의 치상 밀도도 발아율에 영향을 주었는데, 50 mg의 체세포배를 치상하였을 때 3000개 이상의 체세포배가 발아되었다. 50 mg보다 더 높은 치상밀도는 체세포배의 발아에 적당하지 않았다. 2개의 자엽을 가진 대부분의 정상 체세포배

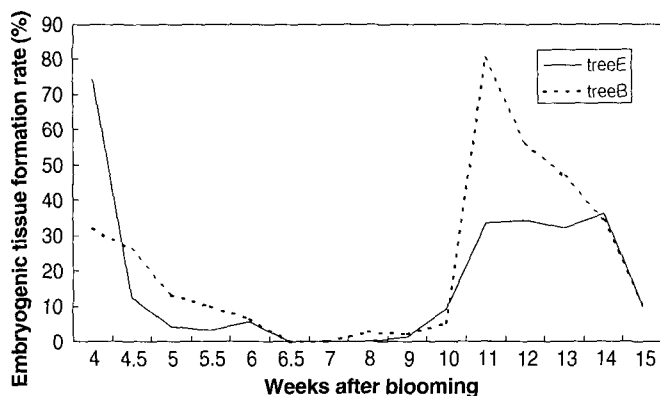


Figure 2. Effect of collection dates on the efficiency of embryogenic tissue formation from samaras taken from two individual trees

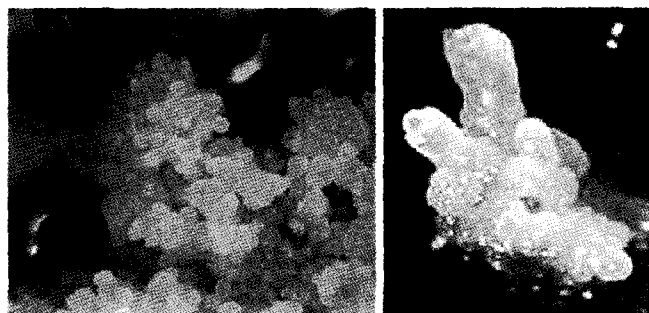


Figure 3. Somatic embryos formed from the embryogenic tissues. The embryos were developed from embryogenic tissue when transferred to 1/2 LM medium

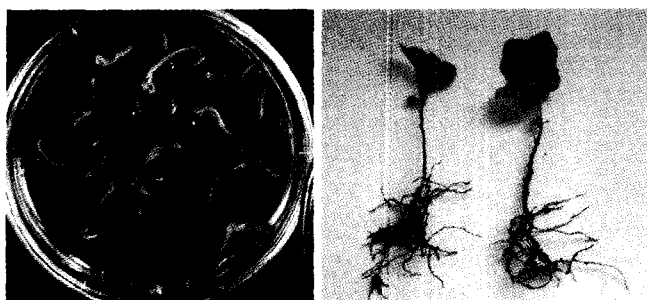


Figure 4. Somatic embryo germination on 1/2 LM media with 0.05% activated charcoal and subsequent transplantation to artificial soil mix.

식물체는 토양에 이식되었을 때 정상적으로 생장 (Figure 4)하였으나 비정상 체세포배 식물체를 토양에 이식하였을 때에는 줄기가 신장하지 않고 모두 고사하였다. 차후 비정상적인 체세포배 발생요인을 구명하여 이의 발생빈도를 감소시키는 것이 효율 제고의 지름길이라고 생각된다.

적 요

20년 이상된 백합나무의 성숙목에서 채취한 미숙구과의 배를 배양하여 체세포배를 유도하고 식물체를 생산하는 대량증식의 기초를 확립하였다. 미숙종자를 1/2 LM (Litvay) 배지에 식물생장조절물질인 2,4-D와 BA를 첨가한 반고체배지에 치상하여 배발생 조직을 유도하였다. 배발생 조직을 배발생 조직 유도와 같은 조건의 배지에서 생장조절물질을 제거하고 AgNO₃ 또는 활성탄을 첨가한 배지에 이식하였을 때 체세포배가 발달하고 정상적인 식물체로 발아되었다. 배발생 조직의 유도와 체세포배의 발아에서 식물체로 발달하는 데 영향을 끼치는 몇 가지 요인이 밝혀졌다. 여기에는 배발생 조직의 유도를 위한 미숙종자의 채취시기, 배지의 sucrose 농도, AgNO₃와 활성탄의 농도 및 체세포배에서 식물체로 발달하기 위한 배의 성숙과 발아를 위하여 발아 배지에 체세포배의 치상밀도 등이 포함된다.

인용문헌

- Al-Khayri JM, Al-Bahrany AM (2001) Silver nitrate and 2-isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Sci Hort* 89: 291-298
- Aronen T, Nikkanen T, Hggman H (1998) Compatibility of different pollination techniques with microprojectile bombardment of Norway spruce and Scots pine pollen. *Can J For Res* 28: 79-86
- Durzan DJ, Gupta PK (1987) Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in Douglas fir cell suspension cultures. *Plant Sci* 52: 229-235
- Fuentes SRL, Calheiros MBP, Manetti-Filho J, Vieira LGE (2000) The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 60: 5-13
- Kavanach K, Chrleton TJ (1990) Seed production and dispersal patterns in populations of *Liriodendron tulipifera* at the northern edge of its range in southern Ontario, Canada. *Can J For Res* 20: 1461-1470
- Lee KS, Lee JC, Soh WY (2002) High frequency plant regeneration from *Aralia cordata* somatic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 68: 241-246
- 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
- Lu CY, Thorpe TA (1987) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in cultured immature embryos of *Picea glauca*. *J Plant Physiol* 128: 297-302
- Merkle SA, Sommer HE (1986) Somatic embryogenesis in tissue cultures of *Liriodendron tulipifera*. *Can J For Res* 16: 420-422
- Moon HK, Hong YP, Kim YW, Lee JS (2001) Genotype effect on somatic embryogenesis and plant regeneration of 15 *Aralia elata*. *J Kor For Soc* 28: 129-134
- Moon HK, Oh KE, Son SH (1999) Factors influencing somatic embryo induction and plant regeneration in *Aralia elata* Seem. *Kor J Plant Tiss Cult* 26: 275-280
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Nishiwaki M, Fujino K, Koda Y, Masuda K, Kikuta Y (2000) Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedling in culture. *Planta* 211: 756-759
- Nhut DT, Le BV, Fukai S, Tanaka M, Van KTT (2001) Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture. *Plant Grow Reg* 33: 59-65
- Park HB, Choi EG, Park BM (1993) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature ovule of *Vitis flexuosa* Thunberg. *Kor J Plant Tiss Cult* 20: 109-112
- Ryu KO (2003) Adaptability of *Liriodendron tulipifera* Linne in Korea and techniques for producing its seedlings. PhD thesis, Chungbuk National University, Cheongju, Korea
- Sommer HE, Brown CL (1980) Embryogenesis in tissue culture of sweetgum. *Forest Sci* 26: 257-260
- Sotak, RJ, Sommer HE, Merkle SA (1991) Relation of the developmental stage of zygotic embryos of yellow-poplar to their somatic embryogenic potential. *Plant Cell Rep* 10: 175-178
- Walter C, Grace IJ, Wagner A, White DWR, Walden AR, Donaldson SS, Hinton H, Gardner RC, Smith DR (1998) Stable transformation and regeneration of transgenic plants of *Pinus radiata* D. Don. *Plant Cell Rep* 17: 460-468

Webb DT, Webster F, Flinn BS, Roberts DR, Ellis DD (1989) Factors influencing the induction of embryogenic and caulogenic callus from embryo of *Picea glauca* and *P. engelmannii*. Can J For Res 19: 1303-1308

Wetzstein FH, Ault JR, Merkle SA (1989) Further characterization of

somatic embryogenesis and plantlet regeneration in pecan (*Carya illinoensis*). Plant Sci 64: 193-201

Wilde HD, Meagher RB, Merkle SA (1992) Expression of foreign genes in transgenic yellow-poplar plants. Plant Physiol 98: 114-120

(접수일자 2003년 10월 30일, 수리일자 2003년 11월 28일)