

낙엽송 (*Larix leptolepis*) 배발생조직 라인에 따른 체세포배 유도 및 식물체 재분화

김 용 옥*

국립산림과학원 산림생명공학과

Somatic Embryogenesis and Plant regeneration with Embryogenic Tissue Lines in *Larix leptolepis*

Yong Wook Kim*

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

요 약: 본 연구는 낙엽송의 4가지 배발생조직(LL-L, LL-K, LL-P 및 LL-N)으로 체세포배 유도에 영향을 미치는 배지종류, 앱시식산(abscisic acid, ABA)의 농도, 삼투압제의 종류 및 농도의 효과를 평가하기 위해 수행되었다. 배지종류 비교에서 1/2LM 배지에 배양한 LL-P 조직라인(134.9개/90 mg조직)에서 가장 높은 자엽단계의 체세포배가 유도되었으나 BLG 배지의 경우 LL-P라인(32.9개)을 제외하고는 체세포배가 전혀 유도되지 않았다. 2가지 ABA농도(60 혹은 100 μM)에 대한 4가지 배발생조직의 체세포배 유도 효과를 비교 한 바 최대 체세포배는 60 μM ABA농도(142.9개)에서 나타났으나 LL-N 라인을 제외하고는 체세포배 발생에 ABA영향은 그리 크지 않은 것으로 나타났다. 삼투압제 종류 및 농도 비교에서 최고의 체세포배 발생은 LL-K 조직라인을 0.2 M maltose 첨가배지(540.5개)에 배양하였을 때 나타났다. 결론적으로 체세포배 발생 효과는 배지의 종류, 혹은 배지에 첨가된 ABA 및 삼투압제 농도보다는 배발생 조직 라인에 따라 크게 좌우되었다.

Abstract: This study was conducted to evaluate various effects of kinds of culture medium, concentrations of abscisic acid (ABA) or /kinds of osmotica on maturation of somatic embryos (SEs) with four (LL-L, LL-K, LL-P and LL-N) embryogenic tissue lines (ETLs) in Japanese larch (*Larix leptolepis*). In comparison of two culture medium, the LL-P produced the highest number of the cotyledon-staged SE (134.9/90 mg tissue) in 1/2LM medium. In contrast, no SEs were obtained except the LL-P (32.9) in medium of BLG. Effects of two concentrations of ABA in the medium with four ETL for SEs maturation were also compared. In the test of 60 or 100 μM ABA, the highest result was obtained in 60 μM ABA (142.9). However, the influence of ABA had little on SEs production except the LL-N regardless of concentrations of ABA. In comparison of different kinds/ concentrations of osmotica, the best response was obtained from the treatment of 0.2 M maltose, the LL-K (540.5). In conclusion, the effects of production of SEs were greatly rely on the ETLs, rather than kinds of medium, concentrations of ABA or osmotica which were used in maturation of SEs.

Key words : Japanese larch, somatic embryo, embryogenic tissue line, abscisic acid, osmotica

서 론

낙엽송 (*Larix leptolepis*(Sieb. et Zucc.) Gordon)은 *Larix* 속에 속하는 낙엽 침엽교목으로 1904년 일본으로부터 종자가 최초로 도입되어 전국각지에 식재되었으며, 수고 30 m, 직경 1 m까지 자라는 주요 조림 수종중의 하나로 현재 우리나라에서는 중부이남 지역에 식재되고 있다(임업연구회, 1992).

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(구영본, 1995). 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 그중 체세포배 유도법을 이용한 식물체생산이 현재 가장 널리 이용되는 기술이다(Lelu and Paques, 2009).

*Corresponding author
E-mail: dragonkim@forest.go.kr

기존의 증식의 방법인 아배양 등으로 세포분화가 힘든 침엽수 등에서는 체세포배 유도기술을 이용한 식물체재 분화가 널리 이루어지고 있는데, Hakman 등(1985)이 *Picea abies*의 미숙 종자배로부터 체세포배를 최초로 유도한 이래 많은 침엽수종에서 연구가 이루어져 왔으며, 그 중 *Larix*속 수종의 체세포배 유도연구는 Nagmani와 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 낙엽송의 경우 체세포배 유도 및 식물체 재분화에 관한 Kim 등(1999, 2007)의 연구가 있다. 특히 Kim 등(2007)의 연구보고에서는 이전의 결과(Kim 등, 1999)와는 달리 훨씬 효율적인 체세포배 유도 기술이 개발되어 더욱 실용화의 근접할 수 있는 가능성을 보여주었지만, 이 연구는 한 개의 조직라인에 국한되어 있어 체세포배 유도 효율은 조직라인에 의해 크게 좌우된다는 보고(Lelu *et al.*, 1994)를 고려하면 다양한 조직라인을 대상으로 하는 연구 필요성이 생긴다. 따라서 본 연구는 낙엽송 4종류의 배발생조직 라인을 대상으로 배지종류, 삼투압제 종류, 농도 및 ABA 농도별에 따른 체세포배 유도효율 비교에 관한 연구결과이다.

재료 및 방법

1. 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 수차례 세척 후 배양에 이용하였다.

2. 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 배지 교환 없이 이루어졌다. 배발생조직 증식은 유도배지 조성 과 동일하였고 약 0.5 cm 정도 크기의 조직을 새로운 배지로 이식함으로써 증식시켰다.

3. 체세포배 유도

체세포배 유도를 위한 기본배지 조성은 염류의 반을 줄

인 1/2LM 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 gum이 첨가한 반고형 배지에 치상하여 체세포배를 발생시켰다. 배양조건은 25±1°C, 암소에서 8주간 새로운 배지로의 교환 없이 연속배양법으로 이루어졌다.

1) 배발생조직 라인 및 배지종류 효과

체세포배 유도에 영향을 미치는 두 종류의 배지를 비교하였다. 첫 번째는 염류의 양을 반으로 줄인 1/2LM 배지를 기본으로 하였고 다른 한 가지는 BLG(Verhagen and Wann, 1989) 배지이다. 위의 두 종류의 배지를 기본으로 하고 60 µM, 0.2 M maltose 및 0.8% gellan gum이 첨가된 반고형 배지에 치상하여 체세포배를 발생시켰으며, 배지종류에 따른 체세포배 유도효과는 배양 8주 후에 해부현미경 하에서 자엽단계 이상의 체세포배 만을 선별하여 조사하였다. 이 실험에 사용된 배발생조직 라인은 LL-L, LL-K, LL-P 및 LL-N 등 총 4가지의 조직라인을 가지고 수행하였다.

2) 배발생조직 라인별 ABA농도 효과

상기(上記)한 4종류의 배발생조직라인을 대상으로 최적 체세포배 유도를 위한 ABA 농도효과를 알아보기 위하여 수행되었다. 본 실험에 비교된 ABA농도는 60 혹은 100 µM였으며 1/2LM 기본배지에 0.2 M maltose, 6.8 mM L-glutamine 그리고 0.8% gelrite를 첨가하였다. 특히 배지로의 ABA 용액 첨가는 배지 열소독 후 50°C 정도 식혀서 필터멸균 후 이루어졌으며, ABA 농도 및 배발생조직 라인에 따른 체세포배 유도효과는 배양 8주 후에 해부현미경 하에서 자엽단계 이상의 체세포배 만을 선별하여 조사하였다.

3) 배발생조직 라인별 삼투압제 종류 및 농도 효과

본 실험은 4종류의 배발생조직 라인을 대상으로 최적 체세포배 유도를 위한 삼투압제 종류 및 농도효과를 알아보기 위하여 수행되었다. 본 실험에 비교된 삼투압제는 0.2 M sucrose 혹은 maltose, 그리고 0.1 M sucrose+0.1 M maltose 혹은 0.1 M sucrose+7.5% polyethyleneglycol (PEG, Sigma, MW 3,350) 등의 조합으로 이루어졌다 (Figure 3). 배발생조직 라인별 삼투압제 종류 및 농도 효과에 따른 체세포배 유도 효과는 배양 8주 후에 해부현미경 하에서 자엽단계 이상의 체세포배 만을 선별하여 조사하였다.

4) 체세포배 발아 및 식물체 순화

체세포배 발아는 배발생조직으로부터 유도된 자엽단계 체세포배만을 분리하여 1/2LM 배지에 2.0% sucrose 및 0.4%의 gellan gum을 첨가한 발아배지 위로 평행으로 배양하였고, 발아조건은 25±1°C, 18/6 광주기를 가진 광조건 (50 μEm⁻²s⁻¹, Philips, F40 CW, 40 watt) 하에서 이루어졌다. 8주 배양 후 식물체를 perlite:peatmoss:vermiculite(1:1:1, v/v/v)의 배양토로 옮겨 25±1°C, 18/6 광주기를 가진 광조건(50 μEm⁻²s⁻¹, Philips, F40 CW, 40 watt) 하에서 순화가 이루어졌고 관수는 매일 한 차례씩, 4주간 이루어졌고 그 후 완전히 순화된 식물체를 온실로 옮겼다.

결과 및 고찰

1. 배지종류 및 배발생조직 라인 효과

본 실험에 사용된 배발생조직은 총 4종류로 이 조직라인 모두 최초 유도는 배양된 각각의 접합자배의 하배측 부위로부터 이루어졌다. 유도된 각각의 배발생조직 라인의 특성으로는 무수히 작은 원배(原胚, proembryo)들로 이루어져 있으며 조직라인 간의 외형적인 특성은 거의 구별할 수 없이 유사함을 보였다.

낙엽송 체세포배 유도를 위한 최적의 배지비교에서는 염류의 반을 줄인 1/2LM배지에서 4종류 배발생조직 라인 모두 BLG배지보다 체세포배 유도 수가 높게 나타났으며, 특히 LL-P라인에서 134.9개(90 mg 조직 기준) 체세포배를 유도되어 가장 높았고(Figure 1) 다음으로는 LL-K(57개) 라인이었으나 LL-L 및 LL-N라인에서는 34.9 및 42.9개로 비슷하게 나타나 배발생조직 라인에 따라 체세포배 발생정도 다소 차이를 보였다. 그러나 BLG배지의 경우 LL-P라인에서만 32.9개의 체세포배를 유도하였을 뿐 그 외 라인에서는 전혀 유도되지 않아 배지 종류 간에 큰 차이를 보였다(Figure 1). BLG 배지의 경우 NH₄NO₃은 완전히 제외되고(½LM: 825 mg/L), KNO₃는 100 mg/L 정도로 첨가(½LM: 950 mg/L)되어 질산태 염류가 많이 감소된 특징을 보이는데, 특히 독일가문비 나무(Verhagen and Wann, 1989) 혹은 전나무속(*Abies*)에 속하는 *A. balsamea*

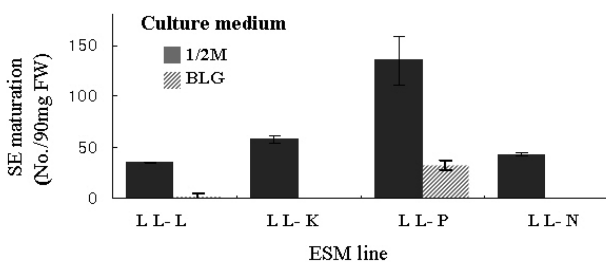


Figure 1. Comparison of 2 kinds of culture medium on somatic embryo maturation with 4 ETLs in *L. leptolepis*. (±: standard error).

(Guevin *et al.*, 1994), *Abies nordmanniana*(Nørgaard, 1997) 등의 수종에서 체세포배 발생에 아주 효과적인 배지로 보고되고 있는데 이러한 배지종류에 따른 다양한 염류의 차이가 체세포배 유도에 큰 영향을 미친 것으로 보인다. *Larix occidentalis*의 경우 여러 농도의 NH₄NO₃ 첨가에 따른 체세포배 발생정도를 조사한 바 5~25 mM사이의 농도별 첨가 시에는 별 차이를 보이지 않아 수종에 따른 아질산태 요구도는 다르게 나타나는 것으로 보인다 (Thompson and von Aderkas, 1992). 이외에도 *Larix*속 수종의 체세포배 유도에는 다양한 종류의 배지가 사용되는데 *Larix leptolepis*×*L. decidua*의 체세포배 유도에는 염류의 양을 반으로 줄인 ½MSG배지가 사용되었으며 (Klimaszewska, 1989), *L. occidentalis*(Thompson and von Aderkas, 1992)에는 1/2LM배지가 사용되어 침엽수종 체세포배 유도에는 MSG 혹은 LM배지가 가장 보편적으로 이용되고 있다.

2. 배발생조직 라인별 ABA농도 효과

Figure 2는 두 종류의 ABA농도(60 혹은 100 μM) 및 4종류의 배발생조직 라인에 대한 체세포배 발생 효과를 조사한 것으로 가장 높은 체세포배 발생은 60 μM ABA를 첨가한 LL-L라인(142.9/90 mg조직)이었으며, LL-K (129.8개) 및 LL-P(127.9개)라인에서는 유사하게 나타났다. 그러나 LL-N라인의 경우 91.9개로 조직라인에 관계없이 다른 3라인에 비해 가장 낮은 ABA반응 효과를 보였다. 대체로 ABA 100 μM 첨가 시 60 μM ABA 첨가보다 다소 유도 효과가 낮았는데(Figure 2), 60 μM ABA 이상의 고농도에서는 체세포배 발생이 저해되는 것으로 판단된다. 특히 LL-N 라인의 경우 100 μM ABA 첨가로 겨우 9.9개만이 유도되어 고농도 ABA 첨가로 체세포배 유도가 심하게 억제됨을 알 수 있다. 김 등(2007)에 따르면 낙엽송 체세포배에는 ABA농도뿐만 아니라 배지의 고형제로 첨가되는 gelrite의 농도에 따라서 큰 영향을 미치는 것으로 나타났는데, 특히 60 μM ABA+0.8% gelrite 첨가로 가장 높은 체세포배 유도가 이루어져 ABA첨가 이외에도 다른 요인

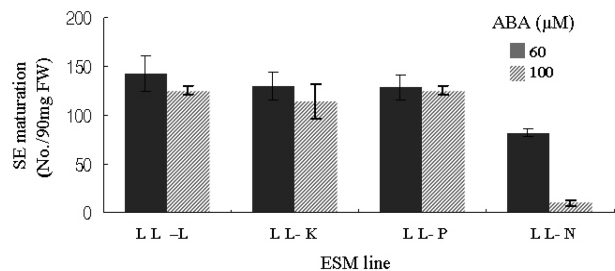


Figure 2. Comparison of 2 kinds of ABA concentrations on somatic embryo maturation with 4 ETLs in *L. leptolepis*. (±: standard error).

이 체세포배 유도에 영향을 끼치는 것을 보여준다.

침엽수종의 체세포배 유도의 ABA첨가 효과에 관한 연구는 폭 넓게 이루어져 왔는데, 특히 ABA첨가로 유도된 체세포배의 조직발아 억제 및 저온에 견딜 수 있는 LEA 단백질 합성(Beardmore and Charest, 1995), triglycerides 및 lipids(Attree et al., 1992) 축적을 위한 자극을 가장 큰 효과로 들 수 있다. *Larix*속 수종의 체세포배 유도를 위한 적정 ABA농도에 관한 연구보고로서는 Lelu 등(1994)은 잡종 낙엽송(*L.×leptoeuropaea*)의 7종류의 배발생조직 대상으로 한 체세포배 유도에서 60 μM ABA 처리구가 가장 높은 체세포배 유도 수를 보여 본 실험의 결과와 일치하였다. 또한 ABA 농도와는 달리 배지내 당성분의 농도를 높임으로써 체세포배 유도가 촉진된다는 연구 결과 또한 *Pinus strobus*(Finer et al., 1989), *Picea mariana* 및 *P. rubens*(Tremblay and Tremblay, 1991)등의 수종에서 보고되고 있다.

3. 배발생조직 라인별 삼투압제 종류 및 농도 효과

Figure 3은 배발생조직 4계통을 대상으로 4종류의 삼투압제에 대한 체세포배 유도 효과 비교를 조사한 것으로서 그 결과는 배발생조직의 라인에 따라 다양하게 나타났다. 가장 높은 체세포배 유도는 LL-K 조직라인을 0.2 M maltose에 배양하였을 때 540.5개로 나타났으며, 최저 수는 LL-P 라인(34.9개, 0.1 M sucrose+0.1 M maltose)에서였다(Figure 3). 대체로 LL-L 혹은 LL-P라인에서 삼투압제 종류 및 농도에 관계없이 체세포배 유도 정도가 낮은 반면 LL-K라인에서 높은 체세포배 발생정도를 보여 배발생조직 라인계통에 따라 체세포배 발생정도는 크게 달라지는 것으로 나타났다. 낙엽송 단일 조직라인의 체세포배 발생에 관한 김 등(2007)의 보고에 따르면 0.2 M maltose 단일 첨가구에서도 가장 많은 자엽단계의 체세포배가 발생되어 본 연구결과와 일치함을 보였다. 침엽수종의 체세포배 유도 시 maltose 첨가가 매우 효과적인 것으로 알려져 있는데 그 이유는 sucrose보다 대사 분해속도가 서서히 이루어져 배지 내 삼투압 유지가 보다 유리하며,

또한 sucrose 첨가로 야기되는 저산소증(hypoxia)과 세포내 에탄올 침적이 덜한 것으로 보고하고 있다 (Scott et al., 1995). 그러나 다른 *Larix*속 수종 중 *L.×leptoeuropaea*(Lelu et al., 1994; Lelu and Label, 1994) 및 *L.×eurolepis*(Lelu and Paques, 2009)의 체세포배 유도에는 0.2 M sucrose 첨가가 선호되며, 특히 *L. laricina*(Klimaszewska et al., 1997)의 경우 0.4 M sucrose 고농도 및 0.2 M sucrose+5, 10% polyethylene glycol(PEG) 첨가 또한 효과적인 것으로 보고하고 있어 수종에 따른 최적 삼투압제 종류 및 농도는 매우 다양하며 가장 최적적인 조건은 실험을 통해 구명되어야 할 것으로 사료된다.

인용문헌

1. 구영본, 1995. 낙엽송의 삼목에 의한 대량증식과 발근 기구 구명. 서울대학교 박사학위논문. pp. 53-54.
2. 임업연구원, 1992. 한국수목도감. pp. 14.
3. Attree, S.M., Pomeroy, M.K. and Fowke, L.C. 1992. Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. *Planta* 187: 395-404.
4. Beardmore, T. and Charest, P.J. 1995. Black spruce somatic embryo germination and desiccation tolerance II. Effect of an abscisic acid treatment on protein synthesis. *Canadian Journal of Forest Research* 25: 1773-1782.
5. Finer, J.J., Kriebel, H.B. and Becwar, M.R. 1989. Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.) *Plant Cell Reports* 8: 203-206.
6. Hakman, I., Fowke, L.C., von Arnold, S. and Eriksson, T. 1985. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Science* 38: 53-59.
7. Guevin, T.G., Micah, V. and Kirby, E.G. 1994. Somatic embryogenesis in cultured mature zygotic embryos of *Abies balsamea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 37: 205-208.
8. Kim, Y.W., Youn, Y., Noh, E.R. and Kim, J.C. 1999. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 55: 95-101.
9. Kim, Y.W. and Moon, H.K. 2007. Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 88: 241-245.
10. Klimaszewska, K. 1989. Plantlet development from immature zygotic embryos of hybrid larch through somatic embryogenesis. *Plant Science* 63: 95-103.
11. Klimaszewska, K., Devantier, Y., Lachance, D., Lelu, M.A. and Charest, P.J. 1997. *Larix laricina* (tamarack): somatic

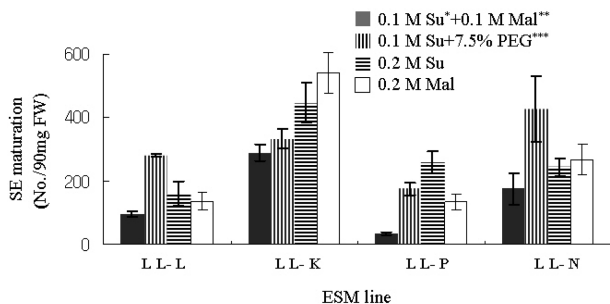


Figure 3. Comparison of 4 treatments of osmotica on somatic embryo maturation with 4 ETLs in *L. leptolepis*. (±: standard error). *Sucrose, **Maltose, ***Polyethylene glycol

- embryogenesis and genetic transformation. Canadian Journal Forest Research 27: 538-550.
12. Lelu, M.A., Klimaszewska, K., Ward, C. and Charest, P.J. 1994. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix×leptoeuropaea*): Part 1. Somatic embryo maturation. Plant Cell Tissue and Organ Culture 36: 107-115.
 13. Lelu, M.A. and Label, P. 1994. Changes in the levels of abscisic acid and its glucose ester conjugate during maturation of hybrid larch (*Larix×leptoeuropaea*) somatic embryos, in relation to germination and plantlet recovery. Physiologia Plantarum 92: 53-60.
 14. Lelu, M.A. and Paques, L. 2009. Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix×eurolepis* and *Larix×marschlinsii*). Perspectives for breeding. Annual Forest Science 104: 1-10.
 15. Litvay, J.D., Verma, D.C. and Johnson, M.A. 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 Reports. 4: 325-328.
 16. Nagmani, R. and Bonga, J.M. 1985. Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. Canadian Journal Forest Research 15: 1088-1091.
 17. Nørgaard, J.V. 1997. Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies nordmanniana* LK. Plant Science 124: 211-221.
 18. Scott, P., Lyne, R.L. and Rees, T.A. 1995. Metabolism of maltose and sucrose by microspores isolated from barley (*Hordeum vulgare*). Planta 197: 435-441.
 19. Thompson, R.G. and von Aderkas, P. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of western larch. Plant Cell Reports 11: 379-385.
 20. Tremblay, L. and Tremblay, F.M. 1991. Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana*(Mill.)B.S.P.) and red spruce (*P. rubens* Sarg.) somatic embryos. Plant Cell Tissue and Organ Culture 27: 95-103.
 21. Verhagen, S.A. and Wann, S.R. 1989. Norway spruce somatic embryogenesis: High frequency initiation from light-captured mature embryos. Plant Cell Tissue and Organ Culture 16: 103-111.

(2010년 6월 16일 접수; 2010년 9월 3일 채택)