멸종위기종인 솔나리(*Lilium cernum* Komarvo.)의 인편 유래 캘러스 유도 및 기내 식물체 재분화

배기화 · 윤의수

Plant regeneration through the callus culture induced from bulb scales of an endangered species *Lilium cernum* Komarvo.

Kee-Hwa Bae · Eui-Soo Yoon

Received: 26 April 2013 / Accepted: 13 May 2013
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract *Lilium cernum* Komarvo. is an important endangered plant belonging to the family Liliaceae. A method was developed for the rapid micropropagation of *L. cernum* through plant regeneration from bulb scales explant-derived calli. The bulb scales segments were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0, 0.5, 1.0, 3.0 mg·L⁻¹ kinetin and 0, 0.1, 0.5, 1.0 mg·L⁻¹ NAA or 2,4-D for callus induction. In media with 0.5 ~ 3.0 mg·L⁻¹ kinetin and 0.1 ~ 1.0 mg·L⁻¹ NAA and 2,4-D, 95 ~ 100% of explants produced callus. They were then transferred to MS medium supplemented with various concentrations of NAA (0, 0.01, 0.05 and 1.0 mg·L⁻¹) in combination with BA (0, 1.0 and 2.0 mg·L⁻¹) for bulbet formation. Bulbet induction (78%), weight (468 mg) and size (15.5 mm) were obtained the highest on MS medium containing 2.0 mg·L⁻¹ BA and 1.0 mg·L⁻¹ NAA. *In vitro* frequency of plant regeneration was not significantly treated in strength of MS and sucrose concentration. Chlorophyll contents in 1/2MS with 50 g·L⁻¹ sucrose treatments were higher than those in control and another treatment. This *in vitro* propagation protocol will be useful for conservation and mass propagation of this endangered plant.

Keywords callus, endangered plant, *in vitro*, *Lilium cernum*, regeneration

서론

솔나리(*Lilium cernum* Komarov.)는 식물분류학상 백합과(Liliaceae) 나리속(*Lilium* spp.)에 속하며 중국과 러시아 등지에 분포하고, 우리나라는 강원북부 지역의 해발 1000 m 이상의 산에 주로 서식하는 것으로 알려져 있다. 솔나리는 다른 나리류에 비해 크기가 작고 잎이 가늘고 좁아 분화초로서 관상가치가 매우 높으며, 꽃의 크기는 직경 3 ~ 4 cm 정도로 소화(小花) 계통의 신품종 육성에 중요한 재료가 될 것으로 예측하고 있다(Jin et al. 2001; Kim et al. 2001). 또한, 솔나리를 포함한 나리류는 화형이 아름다워 관상용으로 많이 이용되지만, 뿌리인 구근도 식용으로 중국과 한국에서 사용하였다(Seo 1979; Asano 1980; Lee 2003a; Lee 2003b). 이러한 사용근거는 본초학 및 동의민간요법에 의해 전해졌으며, 이 두 문헌에 따르면 나리류의 효능은 기관지염, 진통 및 신경통 등의 치료에 사용되어 왔다(Shin 2000). 최근 연구에서 나리류의 구근에 함유되어 있는 cochicine, ferulic acid, p-coumaric acid, aninapic acid 및 capsanthin 등 다종의 알칼로이드 등이 이러한 한방과 전통민간요법의 치료효과를 뒷받침하고 있고(Lee and Chun 1996), 이러한 효과는 기능성 식품의 신소재, 원료의약품 소재, 향장산업의 원료소재로 활용될 수 있는 가능성을 지니고 있다.

한편, 솔나리는 야생에서 지속적인 개체수의 감소로 멸종 위기에 처해있는데, 이를 방지하고자 2005년 환경부에서는 법적보호종(멸종위기야생동·식물 II)으로 지정

Eui-Soo Yoon (✉)
공주대학교 자연과학대학 생명과학과
(Department of Biology, College of Nature Sciences, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea)
e-mail: yes@kongju.ac.kr

Kee-Hwa Bae
(재)홍천메디칼허브연구소
(Hongcheon Institute of Medicinal Herb, 101 Yeonbong-ri, Hongcheon-eup, Hongcheon, Gangwon, 250-930, Korea)

(MEV, 2005)하여 보호, 관리를 하였지만 2012년 경기도, 강원도, 경북 일대에 넓게 분포하며 많은 개체군과 개체수의 확인으로 해제종으로 분류하였고, 산림청에서는 희귀 및 멸종위기식물(보호 순위 37위)로 지정하여 지속적으로 보호, 관리하고 있다(Lee and Lee 1997). 이에 따라 유용생물자원 확보 및 활용을 위한 특정 종의 보존적 측면에서의 연구가 진행되어야 하지만, 나리류는 구근에 의한 영양번식 및 증식에 관해 연구가 이루어지고 있기 때문에 바이러스 감염에 대한 위험성이 높은 편이어서, 인편 조직배양시 인편 조직 내 감염된 병원균으로 인하여 초기 배양 확립이 힘들어 오염율을 감소시키고 자구 재생력이 높은 배양조직을 확보해서 배양체계를 확립할 필요가 있다고 보고된 바 있다(Peak et al. 1994). 따라서 효과적인 유전자원 보존을 위해 오염율을 감소시켜 무병주 생산을 위한 식물조직배양기술에 관한 연구가 진행되어야 한다. 캘러스 배양은 식물조직배양기술 중에 하나로 식물의 조직이나 기관유래의 식물체를 기내에서 생산하는 방법이다. 캘러스 배양을 통한 식물체 생산방법은 식물체를 연속적으로 대량증식 할 뿐만 아니라, 유용한 유전자의 삽입에 의한 새로운 품종의 생산 가능성을 제시한다(Enaksha et al. 1994). 나리류에서 캘러스 배양을 통한 식물체와 자구생산에 관한 연구는 기존 영양번식(자구번식)의 문제점이 부각되기 시작하면서부터 Easter lily (Sheridan 1968; Park et al. 1997), *Lillium Oriental Hybrids* (Simmonds and Cumming 1976)과 *Lillium longiflorum* (Stimart et al. 1980)에서 보고되었다. 또한 Easter lily의 캘러스배양을 통한 식물체의 재생이 더 빠르게 증식시키고, 안정성 있게 개화시킬 수 있었다고 보고하였고(Enaksha et al. 1994), Priyadarshi와 Sen (1992)은 Easter lily의 캘러스 배양에서 분화된 캘러스를 염색체의 변화 없이 3년 동안 안정성 있게 유지 할 수 있었으며, 3년 후에도 재생능력을 보유하고 있었다고 보고 하였다. 하지만 희귀, 특산종이면서 중요한 산업화 소재로 활용도가 높은 솔나리의 캘러스 유도를 통한 식물체 증식에 관한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구는 식물조직배양기술을 이용하여 멸종 위기에 처한 솔나리의 종자유래 인편에서 캘러스를 유도, 증식시키고, 인편유래 캘러스에서 식물체를 재분화하여 캘러스 배양을 통한 식물체를 대량증식 하고자 실시하였다. 이러한 연구는 솔나리와 같은 희귀 및 특산식물의 유전자원을 효율적으로 확보할 수 있는 방안을 제시하는 것이고 앞으로 솔나리가 보유한 다양한 기능성 물질의 확보 및 활용에 중요한 원천소재를 제공할 수 있을 것으로 기대한다.

재료 및 방법

식물재료 및 배양조건

실험에 사용한 솔나리(*Lilium cernum* Komarov.)의 종자는 공주대학교 유리온실에서 생육중인 개체에서 종자 20개를 9월에 수확하여 1달간 저온처리한 후 사용하였다. 1달간 4℃에서 저온 처리된 솔나리의 종자에서 무균인편을 확보하기 위해 멸균된 증류수로 세척한 다음 70% ethanol에 1분간 표면을, 살균한 후 1% NaOCl 용액에 침지하여 60분간 흔들어서 주었다. 표면에 묻은 NaOCl용액을 제거하기 위해 멸균된 증류수로 5회 수세한 후 멸균된 filter-paper 위에 올려놓고 수분을 완전히 제거하여 기내 파종하였다. 2개월 후 발아하여 직경 3 cm까지 성숙한 솔나리의 자구내 인편을 0.5×0.5 cm로 횡절단 하여 식물생장조절물질이 첨가된 배지에 치상하였다. 모든 배양은 온도 22 ± 1℃, 광주기 16/8시간, 광도 46 μmol m⁻²s⁻¹의 배양실에서 배양하였다. 실험에 사용한 모든 배지와 기구는 121℃, 1.5기압으로 20분간 고온, 고압 멸균하여 페트리디쉬는 30 mL, 4각 plastic 배양병(SPL, Korea)에 각각 100 mL씩 배지를 분주하여 실험에 사용하였다.

식물생장조절물질 처리에 따른 솔나리 종자발아체 유래 인편으로부터 캘러스 유도

솔나리의 종자발아체 유래 인편으로부터 캘러스를 유도하기 위해 인편을 0.5×0.5 cm의 크기로 횡절단하였다. Auxin류는 0, 0.1, 0.5, 1.0 mg·L⁻¹ NAA (Naphthalene acetic acid)와 0, 0.1, 0.5, 1.0 mg·L⁻¹ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)에 cytokinin류는 0, 1.0, 3.0 mg·L⁻¹ Kinetin을 혼용 처리한 MS (Murashige and Skoog 1962)배지 (30 g·L⁻¹ sucrose, 7 g·L⁻¹ agar, pH 5.7)를 제조하여 페트리디쉬(12 × 5 cm)에 30 mL씩 분주하였다. 각각의 페트리디쉬에 솔나리 자구유래 인편을 20개씩 치상하여 8주 후 처리구당 캘러스 유도율, 무게와 크기를 조사하였다.

BA와 NAA 처리에 따른 캘러스 유래 자구형성

솔나리의 캘러스 유래 자구 형성 조건을 조사하기 위해 홀몬이 첨가되지 않은 MS배지에서 2회에 걸쳐 계대배양한 캘러스를 핀셋을 이용하여 100 ~ 200 mg 취해 0, 1.0, 2.0 mg·L⁻¹의 BA와 0, 0.01, 0.05 mg·L⁻¹의 NAA가 각각 혼합 첨가된 MS배지에 20개씩 5반복으로 치상하여 12주 동안 배양한 후 처리구당 자구 유도율, 무게와 크기를 조사하였다.

배지조성 및 sucrose 농도에 따른 자귀유래 기내 식물체 재분화

토양순화 전 기내 건전 식물체의 생산 조건을 확인하기 위해 배지조성 및 sucrose의 영향을 조사하였다. 솔나리 캘러스 유래 자귀를 꺼내 증류수로 세척하여 표면에 묻은 배지를 제거하여 실험에 사용하였다. 배양배지의 조성은 1/2MS, MS, 2MS (30 g·L⁻¹ sucrose, 7 g·L⁻¹ agar, pH 5.7) 배지에 sucrose가 각각 0, 30, 50 g/L를 첨가하여 배지를 제조한 다음 사각 plastic 배양병(SPL, Korea)에 100 mL씩 분주하여 배지를 제조하여 솔나리 자귀를 처리구당 5개체씩 5반복 하여 치상하였다. 배양 8주 후에 솔나리 기내 식물체의 지상부(잎무게, 잎수, 잎길이)와 지하부(뿌리무게, 뿌리수, 뿌리 길이)로 나누어 조사하였다. 또한 배지조성 및 sucrose농도가 솔나리의 자귀로부터 유래한 유식물체의 생리적 건전도에 미치는 영향을 확인하기 위해 각각의 배양조건에서 성장한 솔나리의 잎부분만을 2 g 취하여 잘게 절단한 다음 80% acetone 용액에 침지하였다. 4°C 암조건에서 48시간 추출하고 chlorophyll a, b의 함량은 분광광도계(MQX 200R, Biotek, America)를 이용하여 흡광도 663 nm, 645 nm에서 흡광도를 측정하여 엽록소의 함량을 조사하였다(Lichtenthaler 1987).

통계적인 분석

모든 데이터는 means ± standard deviation으로 표시하였다. 변인들의 집단간 차이를 알아보기 위해서 ANOVA를 실시하였고, 유의성이 있는 경우 Duncan's multiple range test로 사후검증을 하였다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 로 설정하여 분석하였다.

결과 및 고찰

식물생장조절물질 처리에 따른 솔나리 종자발아체 유래 인편으로부터 캘러스 유도

솔나리의 종자유래 인편에서 캘러스의 유도에 미치는 식물생장조절물질의 영향을 조사하기 위해 NAA, 2,4-D와 kinetin이 조합처리된 MS배지에 솔나리 인편을 절단하여 치상한 후 4주후에 캘러스 형성율을 조사한 결과, 생장조절물질이 전혀 첨가되지 않은 배지에서도 22.5%의 캘러스 유도율을 보였으며, NAA, 2,4-D에 kinetin이 혼합 처리된 배지에서는 노란색의 캘러스가 100% 유도 되었다(Table 1). 유도된 캘러스의 생중량은 1.0 mg·L⁻¹의 2,4-D와 3.0 mg·L⁻¹

Table 1 Effect of auxins (NAA, 2,4-D) and cytokinins (Kinetin) on callus formation from bulb scales of *L. cernum* on MS medium including 30 g·L⁻¹ sucrose after 5 weeks of culture

Plant growth regulators (mg·L ⁻¹)			Frequency of callus formation		
Kinetin	NAA	2,4-D	Callus induction (%)	Weight of callus (mg)	Size of callus (mm)
0	0	0	22.5	55.8 ± 2.1*r	3.3 ± 0.8ef
	0.1	-	95.7	106.8 ± 4.2pq	3.5 ± 0.4de
0.5	0.5	-	97.7	105.4 ± 3.2pq	3.4 ± 0.6ef
	1.0	-	97.1	111.4 ± 2.8o	3.6 ± 0.4d
1.0	0.1	-	100	121.8 ± 3.6n	3.4 ± 0.3ef
	0.5	-	100	129.6 ± 6.4m	3.5 ± 0.7de
	1.0	-	100	133.3 ± 8.5l	3.6 ± 0.4d
3.0	0.1	-	100	158.6 ± 3.6ij	3.4 ± 0.3ef
	0.5	-	100	181.2 ± 8.6d	3.6 ± 0.1d
	1.0	-	100	166.9 ± 4.2g	3.6 ± 0.6d
0.5	-	0.1	100	150.6 ± 2.5k	3.4 ± 0.4e
	-	0.5	100	159.6 ± 2.9i	3.6 ± 0.2d
	-	1.0	100	165.4 ± 3.8gh	3.5 ± 0.6de
1.0	-	0.1	100	158.5 ± 4.4ij	3.8 ± 0.4a
	-	0.5	100	169.8 ± 9.9f	3.7 ± 0.3bc
	-	1.0	100	178.6 ± 4.5e	3.6 ± 0.3d
3.0	-	0.1	100	198.6 ± 5.6c	3.8 ± 0.1ab
	-	0.5	100	218.6 ± 7.8b	3.7 ± 0.2bc
	-	1.0	100	226.3 ± 8.1a	3.8 ± 0.4a

*Data are the means ± SD, of three experiments. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at $\alpha \leq 0.05$.

의 kinetin이 첨가된 MS배지에 226.3 mg으로 가장 무거웠고, kinetin의 농도가 점차 증가할수록 캘러스의 무게가 증가하는 경향을 보였다. 나리류는 식물체 각각의 부위에서 비교적 쉽게 캘러스를 유도 할 수 있으며, 이러한

Fig. 1 Callus induction and plant regeneration from bulb scales explants *L. cernum*. Callus were induced from bulb scale. (A) on the medium 1.0 mg·L⁻¹ NAA and 3.0 mg·L⁻¹ kinetin (B) after 8 weeks culture. C: Yellowish Calli were induced from whiteness calli cultured on the medium lacking plant growth regulators. D : Adventitious buds (white arrows) were induced from yellowish calli cultured on the medium supplemented with 1.0 mg·L⁻¹ NAA and 3.0 mg·L⁻¹ BA. E: Formation of bulbet were induced adventitious buds cultured on the same medium after 12 weeks, white square box was mean shoot primordia. F: *In vitro* regenerated plantlet from callus of *L. cernum*. Scale bars, 1,5 mm (A-E), 2 cm (F).

결과는 Stimart와 Asher (1978)에 의해서도 발표된 바 있다. 또한 Enaksha 등(1994)은 Easter lily의 캘러스 배양에서 잎과 줄기조직을 0.1 mg·L⁻¹의 2,4-D와 1.0 mg·L⁻¹의 BA가 첨가된 배지에서 8주간 배양하여 캘러스를 유도하였고, Stimart 등(1980)도 나리류 교잡종인 Black Beauty의 인편을 2개월간 배양하여 캘러스를 유도하였으며, 유도된 캘러스는 생장조절물질이 첨가되지 않은 배지에서 양호한 증식을 보였다고 보고한 바 있다. 본 실험에서는 인편으로부터 캘러스를 유도하기 위해 종자유래 인편을 절단하여 배양재료로 사용하였고 배양은 광주기 16/8시간, 광도 46 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 하에서 수행을 하여 인편배양 1주일 후에 흰색의 인편이 초록색으로 변하는 것을 관찰하였다(Fig. 1A). 3주째 인편 절단면에서 유백색의 탈분화조직이 형성(Fig. 1B)되기 시작하였고 4주째 노란색의 캘러스로 증식하였다(Fig. 1C).

BA와 NAA 처리에 따른 캘러스 유래 자구형성

식물생장조절제에 따른 솔나리의 캘러스 유래 자구형성에 미치는 BA와 NAA의 영향을 알아보기 위해, BA (0, 1.0, 2.0 mg·L⁻¹)와 NAA (0, 0.01, 0.05, 1.0 mg·L⁻¹)를 각각 조합한 MS배지를 제조하여 솔나리 캘러스를 치상한 후 12주 후에 자구형성율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 자구유도율은 2.0 mg·L⁻¹의 BA와 1.0 mg·L⁻¹의 NAA를 조합 처리한 배지에서 78%로 가장 높은 유도율을 보였으며, 자구의 무게도 468.5 mg으로 가장 무거웠다(Table 2). 하지만 자구의 크기는 대조구 대비 3 mm 클 뿐 BA와 NAA 조합 처리구 모두 14 ~ 15 mm의 크기로 조사되어 유의적 결과를 나타내지는 않았다. 본 연구에서 BA와 NAA를 혼합처리하여 자구의 형성과 무게, 크기를 조사하였지만, 결과적으로 유의성 없이 모든 조건에서 양호한 자구생산을 보였다. 이는 cytokinin류는 지하부의 발육보다는 지상부의 발육을 촉진시키는 역할을 한다는 보고(Short and

Table 2 Effect of BA and NAA on bulbet formation from callus of *L. cernum* on MS medium including 30 g·L⁻¹ sucrose after 12 weeks of culture

Plant growth regulators (mg·L ⁻¹)		Frequency of bulbet formation		
BA	NAA	Bulbet induction (%)	Weight of bulbet (mg)	Size of bulbet (mm)
0	0	12	250.7 ± 2.6*g	12.5 ± 2.2e
	0.01	33	289.4 ± 3.9f	14.4 ± 1.9bc
1.0	0.05	45	332.4 ± 10.3e	15.5 ± 1.8ab
	1.0	55	415.5 ± 2.8d	13.4 ± 2.8d
	0.01	44	419.1 ± 5.6c	14.9 ± 3.2b
2.0	0.05	68	442.9 ± 6.9b	15.4 ± 2.4ab
	1.0	78	468.5 ± 6.6a	15.5 ± 2.2a

*Data are the means ± SD, of three experiments. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncun's multiple range test at $\alpha \leq 0.05$.

Torrey 1972)가 있는 바, 솔나리의 지상부 분화에 관한 결과를 향후 다시 도출할 필요가 있다고 사료된다. 또한, 본 연구에서는 자구의 형성에 미치는 Tidiazuron (TDZ)의 효과를 확인하지는 않았지만, TDZ는 목본식물을 포함한 대부분의 식물체의 대량증식에 효과적이며(Lu 1993) 재분화에 어려운 식물체의 체세포배 형성에 효과적이라는 보고된 바 있고, Cho 등(1999)과 Seo 등(2009)의 연구에서도 나리류의 구근형성에 NAA와 BA를 혼합처리한 실험군보다 NAA와 TDZ를 혼합 처리한 처리구에서 구근형성에 가장 효과적이라는 연구결과와 보고한 바 있어 향후 TDZ의 효과를 조사해 볼 필요가 있을 것으로 사료된다.

배지조성 및 sucrose농도에 따른 자구유래 식물체 재분화

배지 및 sucrose농도가 솔나리 자구유래 식물체의 기내 식물체 분화에 미치는 영향을 조사하기 위해 기내 유도된 솔나리의 자구를 1/2, 1, 2 MS배지에 0, 30, 50 g·L⁻¹의 sucrose를 각각 첨가하여 제조된 배지 위에 치상하여 8주후에 분화효율을 확인한 결과, 2MS에 sucrose를 50 g·L⁻¹ 첨가한 실험구에서 shoot의 길이(9.1 cm)와 roor의 길이(4.6 cm)로 가장 높게 조사가 되었지만 모든 실험구는 대조구에 비해 유의적인 결과를 나타내지는 못했다(Table 3). Sucrose는 대사활동에 필요한 에너지원으로 세포벽 구성물질 등으로 이용될 뿐 아니라 식물체 및 배양체의 삼투조절제로서의 역할을 수행한다. 기내 배양시 sucrose 농도의 감소는 고농도의 sucrose에 비해 CO₂를 증가시켜 광합성능을 향상시키는 역할을 수행하며 독립영양체 식물로서의 발달을 도모한다(Gabriela et al. 2005). 고농도 sucrose는 잎이 발생되지 않고 구근의 비대가 촉진되거나 캘러스가 다량 발생하는 반면 저농도의 sucrose는 배지 내 영양분

흡수를 촉진시키고 생장억제물질의 생성을 감소시킴으로써 구근의 형성 및 엽상 인편의 발달을 촉진하는 역할을 수행한다(Takayama and Misawa 1979; Magdalena and Anna 2005). 이러한 연구결과를 바탕으로 솔나리의 기내 식물체 재분화에 중요한 영향을 미칠 것으로 예상을 하였으나 배양배지의 농도, sucrose의 농도는 솔나리 기내 식물체 재분화에 크게 영향을 주지 않는 것으로 보여진다(Table 3). 한편, 본 연구에서는 솔나리의 기내 식물체 분화에 미치는 활성탄(Activated charcoal, AC)의 영향에 대해서는 연구하지 않았지만, Bacchetta 등(2003)의 연구에 의하면 나리류의 기내배양시 AC 첨가는 구근 유도에 효과적일 뿐 아니라 구근의 크기 또한 향상시킬 수 있다고 보고하였다. 또한 배지 내에 AC를 첨가함으로써 불투명한 환경을 조성하여 자연적 토양과 유사한 특성으로 조성할 수 있는 장점이 있다(Wang and Huang 1976). AC의 첨가는 조직배양시 autoclave 처리 후 gelling제에 의해 pH가 낮아지는 현상을 방지하며 배지의 pH를 안정화 시켜 세포의 생장과 발달의 영향을 줄 뿐 아니라(Eymar et al. 2000; Pan and van staden 1998) 싹 형성 및 뿌리 유도를 촉진하는 역할을 한다고 보고 하였다(Dumas and Monteuiis 1995). 이러한 선행연구 결과를 바탕으로 차후 실험에서는 활성탄의 효과를 확인하는 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

한편, 외부적으로 확인되는 생장 외에 생리적 생장지표라 할 수 있는 엽록소 함량을 측정한 결과, 1/2 MS배지에 30 g·L⁻¹의 sucrose 처리구(1.83 mg/g)에서 유의적으로 총 엽록소 함량이 높게 나타났다(Table 4). 이는 고농도의 배지와 sucrose농도보다 저농도의 배지와 sucrose농도에서 생리적 장애를 덜 받는 것으로 보여진다(Table 4). 고농도의 sucrose는 다량의 이산화탄소를 발생시켜 sucrose를 50

Table 3 Effect of medium strength and sucrose concentration on plant regeneration from bulbet of *L. cernum* on medium including 30 g·L⁻¹ sucrose after 8 weeks of culture

Treatment		Frequency of shoot development		Frequency of root development	
MS strength	Sucrose (g·L ⁻¹)	No. of shoot	Length of shoot (cm)	No. of root	Length of root (cm)
1/2	0	5.3 ± 0.8*e	7.7 ± 1.3a	8.4 ± 1.2a	4.2 ± 0.9a
	30	5.5 ± 0.5cd	7.4 ± 1.5a	7.8 ± 1.7a	4.3 ± 0.7a
	50	5.6 ± 0.2c	8.1 ± 1.9a	8.6 ± 1.1a	4.4 ± 1.2a
1	0	6.2 ± 1.1b	7.8 ± 1.2a	8.4 ± 1.6a	4.1 ± 1.3a
	30	6.8 ± 1.3a	8.3 ± 1.6a	9.1 ± 1.4a	4.3 ± 0.9a
	50	6.1 ± 0.9b	7.9 ± 1.3a	9.3 ± 0.8a	4.2 ± 1.1a
2	0	6.2 ± 0.8b	8.8 ± 1.6a	8.8 ± 1.3a	4.6 ± 1.4a
	30	6.7 ± 0.4ab	7.9 ± 1.3a	8.4 ± 0.6a	4.2 ± 1.3a
	50	6.3 ± 1.2b	9.1 ± 1.2a	8.6 ± 0.7a	4.6 ± 1.1a

*Data are the means ± SD, of three experiments. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncun's multiple range test at $\alpha \leq 0.05$.

Table 4 Effect of medium strength and sucrose concentration on chlorophyll contents from bulbet of *L. cernum* on medium including 30 g·L⁻¹ sucrose after 8 weeks of culture

Treatment		Chlorophyll contents (mg/g)		
MS strength	Sucrose (g·L ⁻¹)	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll
1/2	0	1.11 ± 0.12*g	0.44 ± 0.14e	1.54 ± 0.11h
	30	1.22 ± 0.88d	0.54 ± 0.13a	1.77 ± 0.13c
	50	1.43 ± 0.36be	0.49 ± 0.14c	1.92 ± 0.14a
1	0	1.12 ± 0.48f	0.41 ± 0.16fg	1.56 ± 0.11fg
	30	1.33 ± 0.65b	0.36 ± 0.13h	1.74 ± 0.17cd
	50	1.45 ± 0.64a	0.47 ± 0.11cd	1.84 ± 0.13b
2	0	1.04 ± 0.47hi	0.51 ± 0.12b	1.58 ± 0.12f
	30	1.22 ± 0.89bc	0.42 ± 0.14f	1.63 ± 0.11e
	50	1.35 ± 0.77h	0.41 ± 0.11fg	1.72 ± 0.13d

*Data are the means ± SD, of three experiments. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncun's multiple range test at $\alpha \leq 0.05$.

g·L⁻¹ 첨가한 배지에서 배양한 식물체가 30 g·L⁻¹의 sucrose를 첨가하여 배양한 식물체보다 양호한 생리적 생장을 보였다(Table 4). 이러한 연구결과는 음나무(*Kalopanax septemlobus*) 광독립배양에서도 이산화탄소를 공급해줄 경우가 생장이 우수하다는 연구결과가 유사하고(Park et al. 2011), 카네이션(*Dianthus caryophyllus*)과 스타티스(*Limonum* spp.) 기내배양시 이산화탄소 농도가 높을수록 식물체의 생장이 좋았으며, 이산화탄소의 농도가 1000 ppm에서 배양된 식물체가 엽록소 함량이 가장 높은 것으로 보고(Jeong et al. 1996)와 비슷한 결과이다. 또한, 광독립배양이 거베라(*Gerbera jamesonii*) 생육에 미치는 영향에 대한 연구에서도 이산화탄소 1000 ppm 처리구가 다른 처리구들에 비해 엽수, 엽장, 근장, 생체중, 엽록소 함량 등이 우세하다고 보고하고 있다(Shon et al. 1997). 이는 고농도 sucrose의 처리는 고농도의 이산화탄소 공급으로 이어져 식물체가 스스로 광합성을 더욱 원활하게 할 수 있도록 하여 엽록소의 함량이 증가하는 것으로 사료된다.

적 요

본 연구의 목적은 희귀 및 멸종위기식물인 솔나리(*Lilium cernum* Komarov.) 기내 종자발아체의 인편으로부터 캘러스 유래의 식물체 재분화 조건을 확립하고자 하였다. 식물생장조절물질인 kinetin과 NAA 또는 2,4-D를 조합한 MS 배지에 인편절편을 배양하였다. Kinetin과 NAA, 2,4-D를 혼합하여 처리한 모든 처리구에서 95% 이상의 캘러스 형성율을 보였으며, 3.0 mg·L⁻¹의 kinetin과 1.0 mg·L⁻¹의 NAA를 조합처리한 MS배지에서 캘러스의 무게가 226 mg으로 가장 무거웠고, 캘러스 크기도 가장 우수하였다. 솔나리

의 인편유래 캘러스로부터 자구형성에 미치는 BA와 NAA의 효과를 알아보기 위해 BA와 NAA를 조합한 MS배지에 캘러스를 배양하였다. 그 결과, 2.0 mg·L⁻¹ BA와 1.0 mg·L⁻¹ NAA 혼합한 MS배지에서 78%의 높은 자구유도율을 보였다. MS배지 및 sucrose의 농도가 기내 건전 식물체 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 실험한 결과, 유의적 차이는 없이 모든 대조구와 실험구에서 건전한 유식물체를 생산할 수 있었고, 엽록소의 함량은 sucrose의 농도가 증가할수록 높아짐을 확인하였다.

인용문헌

- Asano Y (1980) Study on crosses between distantly related species of Lilies. V. Characteristics of newly obtained hybrids through embryo culture. J Jpn Soc Hor Sci 49:392-396
- Bacchetta L, Remoti PC, Bernardini C, Saccardo F (2003) Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of *Lilium*. Plant Cell, Tissue and Org Cult 74:37-44
- Cho WJ, Park HB, Choi EG (1999) Effects of growth regulators and sucrose on plant differentiation and bulblet formation of *Lilium cernum* Komarov. Bulletin of the Agricultural College, Chonbuk National University 30:22-32
- Dumas E, Monteuis O (1995) *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants influence of activated charcoal. Plant Cell, Tissue and Org Cult 40:231-235
- Enaksha RM, Wickremesinhe E, Holcomb EJ, Artega RN (1994) A practical method for the production of flowering Easter lilies from callus cultures. Sci Hort 60:143-152
- Eymar E, Alegre J, Toribio M, Lopez-vela D (2000) Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. Plant Cell, Tissue and Org

- Cult 63:57-65
- Gabriela F, Carlos T, Carlos O, Yves D, Jorge MS (2005) Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. In Vitro Cellular and Developmental Biology 41:69-76
- Jeong BR, Lee EJ, Chin HK (1996) Photoautotrophic growth of *Dianthus caryophyllus* and *Limonium* spp. *in vitro* as affected by CO₂ concentration and air exchange rate. J Kor Soc Hort Sci 14:414-415
- Jin YH, Park SH, Kim HH, Lee CH (2001) Several Factors on *in vitro* bulblet production from native *Lilium cernuum* and *L. callosum* leaf explants. The Plant Res Soc of Korea 14:104-105
- Kim HK, Lim JD, Hyun TK, Lee HY, Lee JH, Yu CY (2001) *In vitro* culture and acclimatization of regenerated plants of *Lilium cernuum* Komarov. J of Med Crop Sci 9:310-317
- Lee JY (2003a) Utilization of Korea Wild Lily. Korea Academy of Native Specie, Korea PP 47-58
- Lee JY (2003b) Studies on morphological characteristics and interspecific hydride of the genus *Lilium*. Ph.D thesis, Department of Horticulture, Chungnam National University, Daejeon, Korea
- Lee JA, Chun HP (1996) Comparison of essential oil components according to extraction solvents in three *Lilium* cultivars. J Korean Soc Hort Sci 43:343-346
- Lee YM, Lee WY (1997) Illustrated rare and endangered species in Korea. Korea National Arboretum. Po-cheon, Korea p 41
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Meth Enzymol 148:350-382
- Lu CY (1993) The use of thidiazuron in tissue culture. In Vitro Cellular and Developmental Biology. 29:92-96
- Magdalena K, Anna B (2005) Morphogenesis of *Lilium martagon* L. explants in callus culture. Acta Biologia Cracoviensia Series Botanica 47:65-73
- Ministry of Environment (MEV) (2005) Enforcement decrees drafted for the Wildlife Protection Act. Gwacheon, Korea p 83
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-479
- Pan MJ, van Staden J. (1998) The use of charcoal in *in vitro* culture-a review. Plant Growth Regulator 26:155-163
- Park SY, Kim SD, Kyun SS, Lee CH, Paek KY (1997) Several factors on bulblets regeneration from callus culture in *Lilium longiflorum* 'Gelria'. Kor J Plant Tissue Cult 24(3):183-188
- Park SY, Moon HK, Kim YW (2011) The photoautotrophic culture system promotes photosynthesis and growth of somatic embryo-derived plantlets of *Kalopanax septemlobus*. J Kor For Soc 100:212-217
- Peak KY, Yu KJ, Seong NS, Choi IS, Cho JT (1994) Micropropagation through stem, node-bud shoot tip and bulblet scale culture in *Fritillaria thunbergii* Miq. J of Med Crop Sci 2:154-161
- Priyadarshi S, Sen S (1992) A revised scheme for mass propagation of Easter Lily. Plant Cell Tiss and Organ Cult 31:193-197
- Seo JN, Kim HY, Lee SG, Kang HD (2009) Effects of plant growth regulators on bulblets regeneration of *Lilium cernuum* K. Journal of Agriculture and Life Science. 43:29-33
- Seo CB (1979) Illustrated Flora of Korea, Hyangmoonsa, Seoul, Korea pp 206-209
- Sheridan WF (1968) Tissue culture of monocot *Lilium*. Planta 82:189-192
- Shin JY (2000) Synonymity of Folk Remedies, Kookil Media, Seoul, Korea pp 58-59
- Shon YG, Kim SR, Park JC (1997) Photoautotrophic growth of *Gerbera jamesonii* *in vitro* as affected by PPFD, CO₂ and sucrose concentration. Kor J Hort Sci 15:640-642
- Short KC, Torrey JG (1972) Cytokinins in seedling roots of pea. Plant Physiology. 49:155-160
- Simmonds JA, Cumming BG (1979) Propagation of *Lilium* hybrids. II. Production of plantlets from bulb-scale callus cultures 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 5:161-170
- Stimart DP, Ascher PD, Zagowski JS (1980) Plant from callus of the interspecific hybrid *Lilium* 'Black Beauty'. Hort Sci 15:313-315
- Takayama S, Misawa M (1979) Differentiation in *Lilium bulbocaulis* grown *in vitro*. Effect of various cultural conditions. Physiology Plantarum 46:184-190
- Wang PJ, Huang LC (1976) Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ cultures. *In vitro* 12:260-262