

최 종
연구보고서

체세포배 이단계 기내배양을 통한
오리엔탈 나리의 자구 생산체계 개발
Development of Oriental Lily Bulb Production
System Through a two-step in Vitro Culture of
Somatic Embryogenic Callus

연구기관
단국대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “체세포배 이단계 기내배양을 통한 오리엔탈 나리의 자구 생산체계 개발”의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 일

주관연구기관명 : 단국대학교
총괄연구책임자 : 안 병 준
연 구 원 : 김 선 기
연 구 원 : 차 봉 연
연 구 원 : 신 혜 영
연 구 원 : 현 수 정

요 약 문

I. 제목

체세포배 이단계 기내배양을 통한 오리엔탈 나리의 자구 생산체계 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

가. 연구개발의 목적

본 연구는 국내 육성된 오리엔탈 나리 신 품종 및 주요 품종의 우량 구근 대량 생산을 위한 기술의 최적화 및 규모화를 최종 목표로 한다.

나. 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

- 최근 원예연구소, 태안백합시험장 등을 중심으로 오리엔탈 나리의 신품종이 육성되고 있으나 기존의 생장점 배양을 통한 인편번식은 구근 증식 느려 품종 보급이 늦어지고 있으며, 국내 생산 또는 수입되는 구근이 바이러스에 이병된 경우가 많아 절화생산에 문제가 되고 있음.
- 나리 구근 증식을 위한 조직배양은 1)인편을 정치배양하거나 2)기내자구를 생물 반응기에서 급속 비대 시키는 방법이 이미 개발되어 있으나, 1)의 경우 인건비 과다로 생산성이 낮은 반면, 2)는 수톤 규모의 생물반응기를 설치해야 함에 따라 시설비가 과다하고 다 품종 생산에 부적합하여 시장 변화에 적응하기 어려울 수 있으며, 오염 가능성이나 배양후의 순화가 문제가 될 수 있음.
- 태안백합시험장의 경우 조직배양 된 개화구를 농가에 보급하여 인편번식을 통해 이차 증식된 구근을 활용하는 방법이 지역적으로 정착되어 있으나, 초기 공급되는 조직배양 구근의 공급이 부족하고, 이차 구근 생산에 수년이 소요되어 절화시장의 품종 변화에 적절한 대응이 어려우며, 양구 과정 중에 병해충 발생 등 문제가 발생할 가능성이 있음.

- 배 발생 세포 배양을 이용하여 자구 증식에 관한 연구는 다양한 식물에서 연구가 진행되어 왔다. 이 기술의 장점은 증식속도를 획기적으로 향상시킬 뿐 아니라 바이러스 무병묘 획득, 기내 육종 및 식물의 분화 메카니즘 등의 연구에 유용하게 이용될 수 있다.
- 특히 프리지아나 나리는 배 발생 세포 배양을 하더라도 변이 발생이 없거나 적은 것으로 알려져 있어(Kim 과 De Hertogh, 1970), 나리의 바이러스 무병묘 획득 및 대량 생산을 위해서는 배 발생 세포 배양의 적용 및 최적 기술 개발이 요구 된다.
- 나리의 배 발생 세포 배양은 대부분 나팔나리 계통에 국한되어 있으며 오리엔탈 나리의 경우 몇몇 국내 학자들에 의해 시도된바 있지만 대량 증식에 접목한 경우가 없으며, 국외의 경우도 오리엔탈 계통에 관한 배 발생 세포 배양에 관한 연구결과는 극히 드문 실정이다.

2) 경제·산업적 측면

- 나리는 구근 자급을 위해 국가적으로 많은 지원이 있었지만 2001년도 구근 수입액은 4백만불에 달하여 화훼 부문 무역적조의 큰 요인이 되고 있음.
- 나리 절화 농가의 경우 종구 구입비가 경영비의 70%를 차지하여 저렴하고 우수한 종구의 공급이 시급하며, 수입 구근의 경우도 화란의 구근생산량 감소와 국제적인 신규수요 증가로 인해 일부 품종의 경우 안정적 구근 공급이 불안정한 현실임.
- 그간 국가적 지원에 의해 개발된 인편조직배양 방법은 생산비가 수입구에 비해 경쟁적이지 못하였고, 탱크배양의 경우도 현실적 제약 때문에 연구기관의 소규모 자체 구근생산에 주로 이용되어 화훼산업 전체에는 기여하지 못한 실정임.
- 농가에서 인편을 번식하여 2차로 구근을 증식하여 활용하는 충남 태안일대의 생산체계도 일본 등의 국제시장의 경기 변화에 조속히 대응할 수 없는 문제가 있음.
- 본 연구진이 개발하는 체세포배 유래 자구를 이용하는 방법은 다수의 소규모 (5-10 리터)생물반응기에서 세포를 급속 배양하여 이차로 한천배지에서 식물

체 분화 및 자구비대를 최소의 노력으로 시행하는 이단계 기내 공정배양 체계임.

- 배발생 세포 1g이면 300개 이상의 자구로 분화할 수 있어 소형배양기를 다수 운영하여 국내외 수요를 충족 시킬 수 있음.
- 실질적 구근 비대는 온실에서 인공토와 양액을 이용한 정밀 재배를 통해 이루어 짐.
- 이러한 과정을 통해 바이러스가 없는 우량구를 500원 이하에 농가에 공급할 수 있으며, 300만구 공급시 21억원 이상의 수입대체 효과가 기대됨.
- 농가에서는 절화에만 전념하여 절화 후 2차구를 재활용하거나 따로 양구를 해야 하는 노력이 불필요하게 됨.
- 경제적인 우량 개화구의 대량 생산은 화훼재배농가의 소득증대는 물론이고 재배농가의 증가와 함께 우량 종구 전문 생산업체들이 형성되어 수입 구근을 대체 할 수 있음.
- 아울러 구근 신품종의 조기 보급이 확대되어 국내의 품종육성 노력이 활성화 됨으로써 궁극적으로 화란과 같은 국제적인 종묘생산 농업을 지향하는데 기여할 수 있을 것임.

3) 사회·문화적 측면

- 생명공학적 종묘생산 기술이 오리엔탈 나리류에서 확립되면 이같은 생산 개념이 다른 작물로 파급되어 원예산업에 길항적인 영향을 미칠 수 있으며,
- 국내 육성 신품종의 증식 및 보급에 기여하여 품종 육성 노력을 활성화하고, 나아가 세계시장에 국내 육성 품종을 포함한 우수 종묘를 중국, 일본, 유럽 등에 공급하는 기술 지향적 종묘 생산 농업을 꾀할 수 있으며,
- 전문화한 종묘 전문 벤처회사 및 전업농가를 양성함으로써 농업이 21세기 생명산업의 주역이라는 진취적 분위기를 농민은 물론 전 국민에게 주지시키는데 일조할 것임.

라. 기술도입의 타당성

- 화란 등이 가지고 있는 기술적 우위는 품종 생산 능력이며, 기타 구근 생산 등은 적합한 기후나 전반적인 사회적 체계의 우월성 때문이지 구생산 기술 자체는 우리와 차이가 없음. 오히려 우리의 기술 개발에 따라 우리의 생산 체계에 의해 그들의 품종을 대량 생산하는 기술 협력 체계로 발전시킬 수 있음.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

● 기내 자구 대량증식 기술 개발

- 주요 오리엔탈 나리 품종의 배발생 세포 유도 조건
 - 배발생 캘러스 유도를 위한 품종별 auxin 최소 요구도 조사
- 배발생 세포 급속 증식 조건 및 시스템 확립 (1단계)
 - 소형 생물반응기를 이용한 배양 조건 최적화
- 식물체 재분화 및 기내 소자구 대량생산 (2단계)
 - 배발생을 위한 전배양 조건 최적화
 - 식물체 재분화 조건
 - 식물체의 자구 형성 조건
 - 소자구의 비대 및 계대배양
- 체세포 변이 최소화 조건 규명
 - 배양 조건별 변이체 발생 정도 조사
- 자구의 바이러스 이병성 조사
 - 배양 단계별 이병성 조사 (인편, 배발생세포, 현탁배양 세포, 자구)

● 체세포배 유래 개화구의 생산성 검정

- 개화구의 절화 특성
 - 식물의 성장 및 개화 형태
 - 변이 발생 정도
 - 절화의 상품성
- 생산성 검정
 - 생산비용 (공정배양, 온실 양구)
- 농가 재배 실증 시험
 - 태안지역 절화농가의 재배 시험

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

제1절 기내 자구 대량증식 기술 개발

1) 주요 오리엔탈 나리 품종의 배 발생 세포 유도

오리엔탈 나리 품종별 기내 인편 절편체를 이용한 배 발생 캘러스 유도는 식물 생장조절물질과 농도에 따라 다양한 분화상태를 나타내었다. 배 발생 세포 유도와 기관분화에 미치는 옥신의 종류 및 농도는 품종에 따라 다른 결과를 나타내었다. 2,4-D 처리는 전반적으로 기관분화에 영향을 미치고 있었으며, 농도증가에 따라 기관분화가 줄어드는 경향이였다. Dicamba는 저농도 처리구에서 뿌리 기관 유도에 영향을 주고 있음을 확인하였다. 체세포 배 발생 세포의 형성은 Picloram 처리 시 가장 왕성하게 나타났으며, 품종별 최적 농도는 다르나 대부분의 처리구에서 체세포배 발생 세포가 형성되었다. 하지만 고농도의 옥신으로 유도된 체세포배 발생 세포는 배양시기가 길어짐에 따라 점차 갈변하여 고사함으로 인해 Picloram 3~6mg/L의 농도에서 인편을 치상하는 것이 체세포배 발생 세포를 유도에 유리한 것으로 판단되었다.

2) 배 발생 세포 급속 증식 조건 확립

배 발생세포의 무게 증가는 배양 초기 10-20일간 picloram 1mg/L 처리 시 다른 처리구에 비해 우수하였으나 50일 가량 배양시 picloram 3mg/L 처리구를 제외한 모든 처리구가 동일한 무게 증가를 나타내었다. 이에 안정적인 배 발생 세포의 급속 배양조건은 배 발생 세포유도의 최소 옥신 농도를 15일 간격으로 계대배양하는 것이 최선의 배양방법으로 사료된다.

3) 나리 계통 신 품종의 체세포배 발생 세포 유도

나리 신 품종의 체세포배 세포 유도는 나리 계통 및 품종에 따라 발생 정도에 차이가 있었다. 오리엔탈 계통의 경우 본 과제에서 확립한 체세포배 세포 유도 최적화 조건(MS, 3% sucrose, 0.4% gelrite, picloram 3mg/L)에서 대부분 용이하게 체세포배 세포가 형성되었으나 아시아틱 나리 교잡종과 FA 중간교잡종의 경

우 체세포배 세포 유도가 상대적으로 부진하였으며, 일부 형성된 체세포배 세포의 형태 및 증식 속도가 극히 떨어졌다. 그리고 신나팔나리(일명: 씨백합)의 경우 배 발생 세포 유도 배양 시 배 발생 세포형성과 형성된 배 발생 세포에서 자구의 재분화가 동시에 이루어지고 있어 체세포배 세포 유도 조건 구명과 체세포배 세포 유지가 어려웠다. 하지만 소수의 배 발생 세포를 이용하여 자구를 소량(약 3,000구)수확하였다.

4) 기내 자구 대량생산을 위한 배 발생 세포의 전배양 조건 최적화

배 발생세포의 이단계 배양을 통한 나리의 기내 자구 대량생산체계 개발을 위해 생물반응기를 이용하여 급속 대량 생산된 배발생 세포의 잉여 생산분에 대한 안정적인 저장조건이 개발이 필요하였다. 급속 증식된 배 발생 세포는 보관용 배지(MS 0.5% p-gel)에 당 농도를 6%로 하고 10℃에서 30일간 보관 시 갈변하지 않고 기관 분화 없이 안정적으로 증식되었음을 확인하였다.

제2절 체세포배 유래 개화구의 생산성 검정

1) 기내 배 발생 자구의 포장 정밀 양구

기내 배 발생 자구의 농가 실증 재배를 통한 생산성 검증을 실시한 결과 재배 농가의 재배 환경 및 재식 시기, 재배 노하우에 따라 생산성에 차이가 있었다. 자구의 정식 초기 자구의 건조를 최대한 방지하며, 발아된 인편엽이 정상적으로 생육할 때까지 배드의 수분 관리 수준에 따라 최대 93%의 순화율을 나타냈으며 정상적으로 양구 할 수 있었다. .

2) 체세포배 유래 개화구의 특성 검정

체세포배 발생 세포에서 재분화 된 식물체의 유전적 변이 발생을 분석하기 위하여 분자생물학적인 DNA마커 수준에서의 RAPD분석을 실시하였다. 염기 10mer의 짧은 random primer 6개를 이용하여 RAPD 분석 시 재배품종과 체세포배 세포 유래 재분화 식물체의 분자생물학적 수준에서의 변이 발생은 없는 것으로 판단되었다. 또한 인편 유래 체세포배 발생 세포와 체세포배 발생 세포로부터 대량 생산된 식물체 중 'Casablanca'와 'Marco Polo'의 염색체를 관찰한 결

과, 두 품종 모두 모주의 염색체수와 동일한 $2n=24$ 로서 염색체의 수적 변화는 없었다. 그리고 표현형 검정결과, 꽃의 형태 및 색깔 그리고 식물체의 형태는 정상으로 변이의 발생이 없었다.

3) 체세포배 유래 자구의 바이러스 이병성 조사

일반적으로 포장재배 되고 있는 오리엔탈 나리 'Casablanca'의 경우 진딧물에 의해 CMV와 LSV 바이러스에 복합 감염되어 있었으며 체세포배 세포 유래 식물체의 경우 무병주임을 확인할 수 있었다. 체세포배 세포 유래 오리엔탈 나리 'Marco Polo'와 'Casablanca'의 체세포배 세포와 기내 자구 및 포장 양구하고 있는 식물체의 경우 ELISA에 의한 바이러스 검정 시 CMV와 LSV 바이러스에 전혀 이병되지 않은 우량 무병 종구임을 확인할 수 있었다.

2. 활용에 대한 건의

가. 기술적 측면

- 본 연구진의 기술은 국내외 기존 조직배양 기술과는 달리 배발생 세포를 유도하여 이용하는 새로운 개념이며, 기술을 최적화하고 변이 발생율을 최소화시킨다면 국내에서 육성된 우수 오리엔탈 나리 품종이나 도입 품종의 구근 대량생산에 이용할 수 있음.
- 우량 구근을 저가로 생산 보급하면 국내 절화농가는 절화생산에 전념할 수 있으며, 아울러 구근 생산 전문업체의 출현을 통하여 종구를 국제시장에 공급하는 종묘 생산형 선진화훼농업을 추구할 수 있음.
- 화란에서도 최근 VCI사(Vitro Center International)가 체세포배 발생 캘러스를 이용한 나리 증식에 성공하는 등 체세포배를 활용한 종묘 생산을 지향하고 있지만 오리엔탈 나리의 경우 그 진전이 더더 우리의 연구 개발 노력이 대외적으로 기술적 우위를 차지할 수 있음.

- 본 연구진에서는 오랜 준비 연구를 통해 오리엔탈 나리의 배발생세포를 유도하여 급속 증식하고, 배발생 과정을 통하여 식물체를 분화하면서 동시에 이를 소자구로 비대시키는 방법을 개발하였으며, 이를 양구하여 개화구를 생산할 수 있음을 밝혔음.

1998년부터는 'Marco Polo' 등 주요 품종에서 유도한 배발생세포를 20리터 생물반응기에서 증식하고, 이단계로 한천배지에서 자구를 고효율로 분화 및 비대시킨 후, 온실에서 개화구로 양구하는 scale-up된 생산 체계를 개발하였음.

본 연구진의 기술은 국내외 기존 조직배양 기술과는 달리 배발생 세포를 유도하여 이용하는 새로운 개념이며, 기술을 최적화하고 변이발생율을 최소화시킨다면 국내에서 육성된 우수 오리엔탈 나리 품종이나 도입 품종의 구근 대량생산에 이용할 수 있음.

나. 경제·산업적 측면

- 본 과제와 완료와 활용에 따라 국내 품종의 조기 활용이 가능하며, 주요 구근의 자급을 통하여 수백만불에 달하는 수입구근을 대체할 수 있으며, 외국 품종의 경우 라이선스 생산방식을 통한 해외 수출 모색도 가능할 것임.

- 절화농가에 저렴하고 우량한 국산 구근을 안정적으로 공급함으로써 농가에서는 절화에만 전념하여 상등품의 절화를 생산할 수 있으며 2차구근을 양성하는 노력을 경감할 수 있음.

- 생명공학적 종묘생산 기술이 오리엔탈 나리류에서 확립되면 이같은 생산 개념이 다른 작물로 파급되어 원예산업에 길항적인 영향을 미칠 수 있으며, 국내 육성 신 품종의 증식 및 보급에 기여하여 품종 육성 노력을 활성화하고, 나아가 세계시장에

국내 육성 품종을 포함한 우수 종묘를 중국, 일본, 유럽 등에 공급하는 기술 지향적 종묘 생산 농업을 꾀할 수 있으며,

- 전문화된 종묘 전문 벤처회사 및 전업농가를 양성함으로써 농업이 21세기 생명산업의 주역이라는 진취적 분위기를 농민은 물론 전 국민에게 주지시키는데 일조할 것임.

SUMMARY

Lilium is one of the important flower cultivars of which export is expected to be promising. However, the bulbs are mostly imported from overseas, which causes increase in production cost and loss of compatibility in the international market. Studies have been carried out in various ways to establish domestic production of lilium bulbs but it has not been completed yet. Reasons are: propagation of in vitro bulblets was dependent on conventional tissue culture methods. As a result, bulblet propagation rate was extremely low and it required a long time to grow the bulblets to the bulbs that induce flowering. These are another reasons for high production cost. We have conducted these experiments to improve bulblet production method by mass production of bulblet via embryogenic cell culture so that the production cost could be significantly reduced.

1. Mass production of flower bulb via embryogenic cell culture in Oriental lily

For the mass production of bulblets in Oriental lilies methods of embryogenic callus induction, multiplication and bulblet production were investigated. The sliced bulb scales of Oriental lily hybrids 'Marco Polo', 'Casa Blanca' and 'Siberia' were cultured on MS solid medium (3% sucrose, 0.3% gelrite) supplemented with 2,4-D, dicamba or picloram at the concentrations of 1, 3, 6, 9 mg/L. The most embryogenic calli were produced with 3 mg/L of picloram in the Oriental hybrids. Reduce auxin concentration and subculture an interval of 2 weeks were vary effective for embryogenic cell culture in bioreator. Different responses were observed among the cultivar and group when embryogenic cell was induced in the MS medium(3% sucrose, 0.4% gelrite) containing picloram 3mg/L. Most Oriental hybrids were induced embryogenic cell but Asiatic group and FA hybrids

were poor progressed.

About 3,000 bulblets produced via embryogenic cell culture of *L. formolongi* 'Raizen'. In case of Oriental lily, total 600,000 bulblets produced via embryogenic cell culture system. Using this methodology, more than 400,000 bulblets have been produced in major Oriental lily 'Sorbonne'.

The embryogenic cells of the Oriental hybrid 'Marco Polo' and 'Casa Blanca' were cultured in an air-lift-type 5-L bioreactor using liquid MS medium (5% sucrose, pH 5.8) supplemented with 1 mg/L of picloram, and transferred to culture boxes (96x96x90 mm) containing 80 ml of hormone-free MS agar medium (0.3% gelite, 6% sucrose) for bulblet formation. Bulblets larger than 5 mm in diameter were produced in 20 weeks and planted in greenhouse after 8 weeks of 4°C storage. They made bulbs of 6 to 9 cm in circumference in a greenhouse in 8 months. Therefore, bulblets of Oriental lilies can be produced in quantity relatively in short periods using embryogenic cell cultures.

2. Productivity examination of somatic embryo cell derived flower bulb

In plantlets regenerated from embryogenic cell, in 'Casablanca' and 'Marco Polo', CMV and LSV-free clones of 100% in both cultivars were obtained. Chromosome number of plants regenerated from callus subcultured for 3 months in 'Casablanca' and 'Marco Polo' was $2n=24$, as the mother plants, and those plants in both cultivars grew in a greenhouse until flowering 2 years later. They flowered with true-to-type shape and colour.

The result of this study is useful to production of virus-free plants of *Lilium* Oriental hybrids.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction of research development	-----15
Section 1. Aim of research development	-----15
Section 2. Background of research development	-----15
Section 3. Necessity of research development	-----20
Section 4. Range of research development	-----23
Chapter 2. Status of the current of research development	-----24
Chapter 3. Contents and results of research development	-----28
Section 1. Mass production of bulblet via embryogenic cell culture	
-----	28
1-1. Materials and methods	-----28
1-2. Results and discussion	-----31
Section 2. Productivity examination of somatic embryo cell derived	
flower bulb	-----51
2-1. Materials and methods	-----51
2-2. Results and discussion	-----53
Chapter 4. Achievement and contribution of research	-----71
Chapter 5. Future application	-----73
Chapter 6. Informatin of overseas science and technology	-----75
Chapter 7. References	-----77

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	15
제1절 연구개발의 목적	15
제2절 연구개발의 배경	15
제3절 연구개발의 필요성	20
제4절 연구개발의 범위	23
제 2 장 국내외 기술개발 현황	24
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	28
제1절 기내 자구 대량증식 기술 개발	28
가. 재료 및 방법	28
1) 주요 오리엔탈 나리 품종의 배발생 세포 유도 및 급속 증식	28
2) 나리 계통 신 품종의 체세포배 발생 세포 유도	29
3) 기내 자구 대량생산을 위한 배 발생 세포의 전배양 조건 최적화	29
4) 배 발생 캘러스 생물반응기 배양과 자구 생산	30
5) 배 발생 세포 유래 기내 자구의 포장 재배	30
나. 결과 및 고찰	31
1) 주요 오리엔탈 나리 품종의 배 발생 세포 유도	31
2) 배발생 세포 급속 증식 조건 확립	38
3) 나리 계통 신 품종의 체세포배 발생 세포 유도	40
4) 기내 자구 대량생산을 위한 배 발생 세포의 전배양 조건 최적화	42
5) 배 발생 캘러스 생물반응기 배양과 자구 생산	44
6) 배 발생 세포 유래 기내 자구의 포장 재배	49
제2절 체세포배 유래 개화구의 생산성 검정	28
가. 재료 및 방법	51
1) 기내 자구의 포장 정밀양구	51
2) 체세포배 유래 식물 특성 검정	51
3) 체세포배 유래 자구의 바이러스 이병성 조사	52
나. 결과 및 고찰	53
1) 기내 자구의 포장 정밀양구	59
2) 체세포배 유래 개화구의 특성 검정	67

3) 체세포배 유래 자구의 바이러스 이병성 조사 -----	51
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	71
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	73
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	75
제 7 장 참고문헌 -----	77

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적

본 연구는 오리엔탈 나리의 배 발생 켈러스 배양을 통한 기내 자구 대량 생산기술을 개발하고, 이를 통해 단기간 자구 대량 생산체계를 확립하여 이들 자구를 토양에서 양구하여 개화구를 대량 생산하는 새로운 종구 생산체계를 확립하고자 하였다.

제2절 연구개발의 배경

우리나라의 나리는 90년대 초반 수출경쟁력이 있는 중요한 작물로 평가를 받으면서 1990년 재배 면적이 84ha에서 2004년 230ha로 크게 증가 하였으며, 2000년 439만불이던 수출액이 2004년 1,333만불로 증가하며 절화수출 1위를 차지함으로써 농가의 고소득 화훼작물로 각광받고 있다(농림부, 2004). 현재 국내에서 재배 되고 있는 나리류는 거의 수입종을 사용하고 있으며 인기있는 품종은 매년 구근을 종묘 회사를 통해 재배농가가 구입하여 상용하고 있는 실정이다. 최근 중국의 급격한 경제성장과 2006년 베이징 올림픽 등 대형 행사 등이 맞물려서 중국 내 나리 수요가 크게 증가되면서 국제 시장에서 나리 종구를 대량으로 수입하여 2003년 오리엔탈 계통은 종구 1개당 가격이 400~500원이었지만 점차 가격이 상승하여 800원대 까지 올랐다. 또한 네덜란드의 나리 종구 생산면적은 2000년 4,520ha에서 2004년 3,699ha로 점차 줄어든 탓으로 물량 또한 부족한 실정이다. 따라서 나리 재배농가들은 전체 생산비의 절반이상을 종구비에 지출하기에는 부담스러운 재배를 포기해야 할 현실에 있다.

나리는 영양번식을 하는 작물로 일정기간 재배하게 되면 생산성이 매우 떨어져 주기적으로 종구 교체가 반드시 필요하며, 고품질 안정생산과 수출경쟁력 향상을 위해서는 우량종구 자급체계 구축이 시급한 실정이다.

따라서 나리 자구 생산을 위한 그 동안 연구개발을 정리하면 다음과 같다.

나리의 조직배양

나리의 조직배양은 Rob(1957)에 의해 최초로 시도되었으며, Emsweller(1957)에 의해 상업적인 생산 가능성이 알려지면서부터 급속한 발전을 이루었다.

나리의 조직배양은 경정(shoot apex), 인편 등의 외식체로부터 소인경(bulblet)이나 shoot를 유도하는 직접적인 방법과 캘러스(callus)를 경유하는 간접적인 방법으로 나눌 수 있다(Kim & De Hertogh,1997). 직접적인 방법은 인편을 배양재료로 가장 많이 이용하고 있음이 보고 된 바 있으며(Takayama & Misawa, 1979; Niimi & Watanabe, 1982; Kim et al., 1995, 1996, 1998; Park et al., 1997, 1998), 인편에서 부정아를 직접 유기기시키는 인편배양은 인편에서 많은 자구를 생산하고 형성된 자구를 빠르게 비대 시키는데 목적을 두고 있다(Stimart & Acher, 1978; Leshem et al., 1982). 기내 오염을 피하고, 절편체당 많은 자구를 분화시키기 위해서 기내에서 배양된 자구의 인편을 재배양하는 것이 효율적이라고 보고 된 바 있다(Takayama & Misawa, 1979). 그러나, 기내 인편배양에 의한 나리의 증식은 절편체당 증식되는 자구수가 적고(Niimi & Onozawa, 1977), 생성된 자구가 작으며, 자구가 충분하게 성숙하기까지는 3~4개월의 긴 시간이 소요된다고 보고 하였으며(Takayama & Misawa, 1979; Niimi, 1984b), 최근 Kim 등(1999)은 오리엔탈 나리에서 다신초(multiple shoots) 유도를 보고 하였으나, 경아직까지 산업적 생산단계로 발달하지 못하였다.

캘러스 유도 배양

캘러스 배양을 통한 자구 유도는 직접적인 방법에 비해 증식속도를 월등히 향상시킬 수 있으며, 외래 유전자의 도입을 용이하게 함으로써 기내 육종에도 유용하게 이용될 수 있는 장점을 가진다고 보고 하였으며(Enakasa et al., 1994), 바이러스에 감염되지 않은 식물체를 획득할 수 있는데 Xu 등(2000)은 나팔나리 'Georgia'의 캘러스에서 유래된 자구는 바이러스에 감염되지 않았다고 보고 하였다.

또한 나리를 비롯한 몇몇 구근류의 경우 캘러스로부터 재생된 식물체는 변이발생 빈도가 매우 낮거나 없는 것으로 보고 되었으나(Simmonds & Cummings, 1976; Wickremesinhe et al., 1994; Kim & De Hertogh,1997), 나리의 캘러스 배양 시 재분화 된 식물체에서 변이체 발생이 보고 된 바 있다(Van Harmelen et al., 1997).

한편, 나팔나리의 캘러스 배양 시 분화된 캘러스를 염색체 변화 없이 3년 동안 안정성 있게 유지할 수 있었으며, 이러한 캘러스는 3년 후에도 재생능력을 보유하고 있었음이 보고 되었다(Priyadarshi & Sen,1992). 그러나 이러한 캘러스를 영유한 간접적인 식물체 재생방법은 배양조건을 구명하기까지 기간이 오래 걸리고, 종에 따라서는 배양기간이 길어지면 유전적으로 불안정할 수 있다는 등의 문제로 실용화되지 못하고 있다.

캘러스 유도에 관한 연구는 나팔나리 계통을 중심으로 여러 절편체를 이용하여 시도되었다. Van Aartrijk 등(1990)은 인편으로부터 캘러스를 유도할 경우에는 직접 부정아를 유도 할 때보다 상대적으로 고농도의 옥신(IAA, NAA, 2,4-D: 5-25 μM)과 사이토키닌(Kinetin, BA: 5-25 μM)이 필요하다고 보고하였으며, Wickremesinhe 등(1994)은 나팔나리의 미성숙 잎과 줄기를 이용하여 배양 8주경에 캘러스를 유도 할 수 있었다고 보고 하였다. 나팔나리의 약(anther)을 지닌 수술대(filament)에서 배 발생 캘러스를 유도하였고(Arzate-Fernandez et al., 1997), Niimi 등(2001)은 L. \times 'Enchantment'의 약 배양시 2mg/L picloram과 zeatin을 첨가하여 배 발생 캘러스 유도 및 자구 재분화를 보고하였다. 오리엔탈 나리에서의 캘러스 유도는 인편 조직으로부터 캘러스 유도 시 배양 2~4개월에 캘러스를 획득하였다고 보고 하였으며(Simmonds & Cumming, 1976), 오리엔탈 나리 기내 소인편을 이용하였을 때 저농도의 2,4-D에 저농도의 BA를 혼합하여 처리 시 비교적 높은 캘러스 유도가 용이하였다고 보고 하였다(박 등., 2000).

캘러스는 미분화된 세포괴를 총칭하고, 외생 또는 내생 식물생장조절제의 과다 발현으로 인해 발생하며, 조직배양 시 식물 절편체에서 캘러스 유도는 외생 식물조절제의 종류 및 농도, 식물 절편체의 종류에 따라 그 반응 정도가 다양하게 나타난다. 인편에서 캘러스 유도 시 dicamba가 5~50 μM 농도에서 구근의 인편에 유독함이 보고 된 바 있고(Famelaer et al., 1996), 저 농도(2 μM)의 dicamba는 나팔나리와 오리엔탈 나리의 암술대와 소화경(flower pedicel)으로부터 friable 캘러스를 유도하고, ELS(embryo like structure)로 유기함을 보고하였다(Tribularo et al.,1997). Picloram을 이용한 compact yellow 캘러스 형성은 L. formolongi (Mii et al. 1994; Godo et al. 1996), L. longiflorum, Oriental hybrids 와 Asiatic hybrids(Famelaer et al. 1996)에서 보고 되었다.

Friable 캘러스 형성능력은 종(species)과 hybrid group에 따른 차이 보다 각 식물이 갖고 있는 유전적 형태와 보다 연관되었음이 보고 된 바 있다(Tribularo et

al., 1997). Arzate-Fernandez 등(1997)은 나팔나리의 수술대에서 캘러스 유도 시 약이 없는 경우 캘러스 형성이 전혀 일어나지 않았으며 오직 약이 있는 수술대에서만 캘러스가 형성되었음을 보고 하였으며, 오리엔탈 나리 캘러스의 유도는 품종 및 배양된 외식체의 종류에 따라 민감한 결과를 나타냈으며(박 등., 2000), BA와 2,4-D를 각각 5 μ M 동량 처리하여 multiple shoots와 캘러스를 유도함으로써 식물 성장조절물질에 대한 형태형성 반응이 종에 따라 큰 차이가 나타난 것은 유전자형에 따라 체내 호르몬의 발란스 또는 민감성이 각기 다르기 때문이라고 보고하였다(김 등., 1999).

배 발생 캘러스 급속증식

캘러스는 배양초기에 뛰어난 식물체 재생능력을 가지고 있어 캘러스의 유지 및 증식이 어려웠다고 보고하고(Simmonds & Cumming, 1976; Kato & Yasutake, 1977; 박 등., 2000), 일단 유도된 캘러스는 성장조절제가 첨가되지 않은 배지에서도 왕성하게 증식되었다고 보고 된 바 있으며(Simmonds & Cumming, 1976), Stimart 등 (1980)도 동일한 결과를 보고 하였다. Tribulato 등(1997)은 캘러스의 증식은 캘러스유도 배지보다 식물성장조절제가 첨가되지 않은 배지에서 2주 간격으로 계대배양하며 회전 진탕 배양 하는 것이 세포 증식에 용이 하였다고 보고하였다.

이와 반면에 *L. longflorum*(Sheridan, 1968)과 *Lilium hybrid* (Simmonds & Cumming, 1976)의 캘러스 배양에서 액체 배양보다는 고체배양에서 캘러스의 증식 및 신초 수 증가가 촉진된다고 보고하고, 나팔나리 'Gelria'의 캘러스 배양 시 동일한 결과를 보고하였다(Han et al., 2000). 박 등(2000)은 순수한 캘러스만의 증식은 어려웠지만 캘러스 유도 초기에 식물체를 제거해 줌으로써 캘러스 증식을 향상시켰다고 보고 하였다.

제3절 연구개발의 필요성

국내 나리 재배면적, 생산량 및 생산액은 1990년도 84.1ha, 38,408천본, 7,781백만원에서 2004년도 228.8ha, 92,014천본, 338억원으로 급증하고 있다(농림부,

2004). 나라의 절화 수출은 매년 증가하여 1993년 821천불에서 2004년도 1,334만불 수출을 이루었으며, 이는 우리나라 절화 수출의 1위를 차지한 것이다. 나라의 수출은 이와 같이 꾸준한 증가세를 보이고 있어 농가의 고소득 화훼작물로 각광받고 있다(농림부, 2004). 국내에서 생산된 나라 일부는 주로 일본시장으로 수출되고 있는데 오리엔탈나라 위주에서 최근에는 신나팔나라가 추가되어 수출량이 증가하고 있다. 아울러 나라 종구 수입은 IMF 이후 일시적으로 감소하였으나 최근에는 증가되어 연간 약 350만불(관세청, 2003)이 수입되고 있다. 또한 나라 재배 경영비 중 종구 구입비가 약 51%를 차지하기 때문에(농촌진흥청, 2003) 종구 국간 자급화는 절대 필요하며, 조직배양에 의한 구근 생산기술 또한 외국의 기술을 그대로 모방하여 우리나라의 실정에 맞지 않아 나라 재배 농가에서 많은 어려움을 겪고 있다.

이에 나라 신품종 육성 및 우량 종구 자급화를 목적으로 그 동안 많은 정부 지원정책과 기술이 개발되어 왔으나, 아직까지 개발 신품종의 농가 보급도 미비한 편이고, 일부 지자체를 중심으로 시행되고 있는 종구 생산 보급사업도 투자 성과는 기대에 못 미치는 편이다. 이렇게 된 주된 이유는 노동력이 집중 소요되는 경정배양을 통해 무병주를 획득하고, 이를 배양한 기내 소자구의 인편을 이용한 인편배양과 기내 자구 비대를 위한 계대배양으로 자구 생산단가가 상승하여 우량 자구 자급화가 어려운 실정이다.

따라서 본 과제의 생산 개념은 생물반응기에서는 배발생능이 있는 세포를 급속 배양하고, 식물체 분화와 소자구(직경 5mm 이하) 비대는 고체배지를 이용하는 정지배양 과정에서 이루어 지는 2단계 공정배양을 기초로 하고 있으며, 본격적인 양구 과정은 온실에서 인공토와 양액을 이용한 초밀식 정밀 재배 과정을 통해 우량한 개화구를 생산하는 것을 목표로 하고 있다. 세포를 배양하기 때문에 생물반응기는 5-10리터 규모를 2-3개 사용하면 수백만의 자구를 형성하는데 필요한 세포 증식에 충분하고, 정지배양 과정도 세포를 치상하면 더 이상의 인력이 소요되지 않기 때문에 계대배양에 따른 인건비가 필요 없으며, 수 만개의 배양박스가 소요되나 온도만 유지되는 30평 정도의 창고형 시설이면 자구 생산이 가능하여 생산비를 최소화할 수 있다.

화훼는 농작물중 가장 많은 소득을 올릴 수 있는 작목중의 하나로 관련 산업 역시 21세기의 유망 고부가가치 산업으로 각광을 받고 있다. 그러나 현재 우리나라의 경우, 이 분야 산업은 아직 걸음마 단계를 면치 못하고 있는 실정으로 세계 화

훼시장의 대부분을 몇몇 선진국들이 점유하고 있다. 실제로 우리 한반도 면적의 5분의 1도 안되는 네덜란드는 꽃 수출로 연간 60억불의 외화 수익을 올리고 있다.

우리는 배발생 세포 유래 자구 대량 증식으로 생산한 우량 구근을 저가로 생산 보급하면 국내 절화농가는 절화생산에 전념할 수 있으며, 아울러 구근 생산 전문업체의 출현을 통하여 종구를 국제시장에 공급하는 종묘 생산형 선진 화훼농업을 추구할 수 있을 것이다. 또한 국내에서 육성된 신품종을 단기간에 대량으로 생산하여 재배 농가 공급함으로써 세계시장에 우리 품종을 알릴 수 있는 계기를 마련 하게 된다.

제4절 연구개발의 범위

● 기내 자구 대량증식 기술 개발

- 주요 오리엔탈 나리 품종의 배발생 세포 유도 조건
 - 배발생 캘러스 유도를 위한 품종별 auxin 최소 요구도 조사
- 배발생 세포 급속 증식 조건 및 시스템 확립 (1단계)
 - 소형 생물반응기를 이용한 배양 조건 최적화
- 식물체 재분화 및 기내 소자구 대량생산 (2단계)
 - 배발생을 위한 전배양 조건 최적화
 - 식물체 재분화 조건
 - 식물체의 자구 형성 조건
 - 소자구의 비대 및 계대배양
- 체세포 변이 최소화 조건 규명
 - 배양 조건별 변이체 발생 정도 조사
- 자구의 바이러스 이병성 조사
 - 배양 단계별 이병성 조사 (인편, 배발생세포, 현탁배양 세포, 자구)

● 체세포배 유래 개화구의 생산성 검정

- 개화구의 절화 특성
 - 식물의 성장 및 개화 형태
 - 변이 발생 정도
 - 절화의 상품성
- 생산성 검정
 - 생산비용 (공정배양, 온실 양구)
- 농가 재배 실증 시험
 - 태안지역 절화농가의 재배 시험

제2장 국내외 기술개발 현황

1) 국내 기술 현황

- 국내에서는 근년들어 구근을 자급하려는 노력들이 시도되고 있지만 아직도 연간 4백만불에 달하는 구근을 수입하고 있는 실정임이며, 90년대에 강원도와 모닝팜(주)에 의해 수입 자구를 양구하여 개화구를 생산한 바 있으나, 여러 사정으로 중단된 바 있음.
- 지자체 농업기술원(전남, 강원, 경기 등)이나 특화시험장에서 인편을 조직배양하여 자구를 생산하고 이를 양구하여 농가에 공급하는 체계를 운영중이나 생산비가 비싸 농가 보조의 성격이 강한 편이며 일부 기관에서는 생산을 중단한 상태임.
- 정부의 연구비 지원을 통해 여러 연구기관에 의해 나리 구근 생산 방법이 연구된 바 있는데 그 생산 체계가 기존의 인편 조직배양을 개선하거나 인편조직을 생물반응기에서 배양하여 자구를 비대하는 방법으로 본 연구과제와는 방법이 크게 다름. 이들 연구 결과들은 각 기관의 자체 구근 생산에 주로 활용되고 있으며, 국내 구근생산에 산업적으로 활용되었지만 시설 투자 및 인건비 상승에 따라 채산성 약화로 현실적으로 적용 되지 않고 있음.
- 태안백합시험장에 의해 조직배양 유래 우량 구근을 생산하여 인근 농가들에 원종으로 공급되어 인편번식을 통해 2차로 구근을 증식하는 체계가 정착되었으나 품종이 ‘카사블랑카’ 등 특정 품종에 국한되고 있어, 유색백합을 선호하는 국내시장의 수요 충족에는 미흡한 형편임.
- 국내에서 생산되는 수출용 오리엔탈 나리 절화 품종은 모두 네덜란드에서 육성된 품종으로 국내 신품종 개발 및 증식이 절실한 실정이다. 이에 국내에서 육성된 신품종은 2004년 말 까지 37품종이 등록되어있으나(국립종자관리소, 2004), 재배 농가에 보급된 것은 전무한 실정임.

2) 국외 기술 현황

- 네덜란드의 경우 무병 원원종 생산에서 최종 개화구 및 절화 생산, 유통, 저장에 이르는 체계적인 생산기술을 확립하여 전 세계 구근 및 절화 수출시장을 석권하고 있으며, 네덜란드의 구근 생산은 인편번식 및 인편배양에 의한 자구를 양구하는 전통적 생산 체계에 의존하나 구근재배에 적합한 기후와 함께 저임금 노동력을 이용한 주변국에서의 개화구 재배와 기계화를 통한 대규모 생산을 통하여 세계적인 경쟁력을 가지고 있음
- 나리의 체세포배 발생 캘러스를 이용한 나리의 자구생산에 관한 연구는 이미 나팔나리를 중심으로 연구되어 왔으며, 최근 VCI사(Vitro Center International)가 체세포배 발생 캘러스를 이용한 나리 증식에 성공하였으며, 이 기술은 기존의 기내 인편조직배양이 아닌 세포배양을 이용한 증식기술로 조직배양에 비해 노동력 절감에 큰 효과가 있는 것으로 알려져 있음
- 오리엔탈 나리의 경우 배 발생 세포의 유도가 까다로와 화란의 경우도 아직은 산업화 단계는 아니지만 일반적인 기술의 발전 추세는 체세포배를 활용한 증식 생산을 지향하고 있어서 우리의 연구 개발 노력이 대외적으로 기술적 우위를 차지할 수 있음.

3) 현재기술상태의 취약성

- 국내 오리엔탈 나리의 구근 증식은 1)수입 자구 양구, 2)기내 인편번식, 3)기내 자구 탱크 배양 방법 등이 개발 되어 있음.

1)의 경우는 지자체 연구기관이나 일반 농가에서 주로 실행되며, 소규모로 자구를 수입하여 증구 및 개화구를 고령지에서 포장 양구하는 방법. 자구를 수입해야 하며, 자구의 품질이나 포장 양구 과정의 문제로 전문적인 구생산이 현재 어려운 상황임.

2)는 각 지자체의 농업기술원이나 연구센터에서 주로 활용하고 있는 보편적 기술. 기내배양에 따른 인편의 치상이나 배양체의 계대배양 등에 인력이 과다 소요하여 이에따른 생산비가 수입 자구에 비해 훨씬 비싼 형편임.

조직배양된 원종 구근을 농가에서 인편번식을 통해 자구를 증식하여 수년의 양구 과정을 거쳐 개화구를 생산하는 체계가 일부 지역에 정착되고 있으나, 양구기간이 오래 소요되고 2차 병해충 오염에 따른 문제가 있으며, 국내외 시장의 품종 선호도 및 가격 변화에 적절하게 대처하는데 어려움이 있음.

3)의 경우는 중구를 급속 대량 생산하는데 효과적일 수 있지만, 양구를 반응기 내에서 하기 때문에 수십 톤의 시설을 갖추어야 하며, 오염에 따른 위험성이나 양구 후의 순화과정이 문제될 수 있음. 품종의 선호가 다양하며 시기적으로 변화하는 국내외 시장 상황에 부응하여 다양한 품종을 생산하기에 부적절할 수 있음.

- 본 과제 of 생산 개념은 생물반응기에서는 배발생능이 있는 세포를 급속 배양 하고, 식물체 분화와 소자구(직경 5mm 이하) 비대는 고체배지를 이용하는 정치배양 과정에서 이루어 지는 2단계 공정배양을 기초로 하고 있음. 본격적인 양구 과정은 온실에서 인공토와 양액을 이용한 초밀식 정밀 재배 과정을 통해 우량한 개화구를 생산하게 됨.

세포를 배양하기 때문에 생물반응기는 5-10리터 규모를 2-3개 사용하면 수백 만의 자구를 형성하는데 필요한 세포 증식에 충분하고, 정치배양 과정도 세포를 치상하면 더 이상의 인력이 소요되지 않기 때문에 계대배양에 따른 인건비가 필요없음. 수만개의 배양박스가 소요되나 온도만 유지되는 30평 정도의 창고형 시설이면 자구 생산이 가능하여 생산비를 최소화 할 수 있음.

가장 우려되는 문제는 세포배양에 따른 변이체 발생이지만, 나라의 경우 genome 크기가 3×10^{11} bp(사람의 100배)로 거대한 때문인지 변이 발생이 거의 없음이 보고된 바 있으며, 배발생세포의 유도 조건이나 배양 방법 등을 최적화하는 연구를 지속하여 우려되는 문제를 최대한 제거할 계획임.

다. 앞으로의 전망

- 대부분 나리품종들은 주로 네덜란드 등의 도입 품종이지만, '98년부터 원예연구소에서 틸나리 신품종들이 육성되어 현재 12품종이 등록되어 있으며, 태안 백합시험장과 함께 오리엔탈 나리의 품종도 곧 등록될 예정임. 구근 증식 기술의 개발에 따라 국내 신품종의 국내외 보급이 활성화되리라 예상됨.
- 지리적으로는 세계 최대의 화훼소비국인 일본과 함께 중국이 인접해 있으며, 오리엔탈나리는 일본에서 가장 선호하는 화훼류의 하나임.

오리엔탈나리는 단가가 높고 병충해에 비교적 강하며 검역에서도 그다지 문제되지 않아 우리나라의 수출경쟁력 있는 유망 화훼.

따라서 일본뿐 아니라 국제적 기호에 적합한 오리엔탈나리 신품종 육성과 국내 종구생산이 선결과제임.

- 우량 구근을 저가로 생산 보급하면 국내 절화농가는 절화생산에 전념할 수 있으며, 아울러 구근 생산 전문업체의 출현을 통하여 종구를 국제시장에 공급하는 종묘 생산형 선진화훼농업을 추구할 수 있음.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 기내 자구 대량증식 기술 개발

가. 재료 및 방법

1) 주요 오리엔탈 나리 품종의 배발생 세포 유도 및 급속 증식

오리엔탈 나리의 배 발생 캘러스 유도를 위한 품종은 절화로써 널리 애용되는 'Marco Polo', 'Casa Blanca' 그리고, 'Siberia' 세 품종을 이용하였으며, 이후 적색 계열의 오리엔탈나리 'Sorbonne', 'Con Amore', 'Acapulco', 'Stargager'를 추가적으로 공시하였다. 배 발생 캘러스유도를 위해 각 공시 품종별 기내 배양중인 소자구의 인편을 이용하였으며, 배 발생 캘러스 유도를 위한 최적 성장조절제 농도 및 종류를 조사하기 위하여 MS 기본 고체배지(3% sucrose, 0.4% gelrite, pH 5.8)에 2,4-D, dicamba, picloram을 1, 3, 6, 9mg/L의 농도로 첨가하였다.

기내 소자구의 인편은 5×5mm 크기로 썰어 petridish당 10절편체를 치상하였으며, 각 처리별 5반복 하였다. 배양실은 23℃ 항온으로 유지하며 암배양 하였다. 매 4주마다 계대배양하며, 16주 배양 후 식물성장조절제 처리에 따른 오리엔탈 나리 품종별 배 발생 캘러스 형성과 기관 분화에 대해 조사하였다.

배 발생 캘러스의 급속 증식을 위해 오리엔탈 나리 'Marco Polo' 배 발생 캘러스를 이용하여 250ml 삼각플라스크에 MS 액체 배지(5% sucrose)를 50ml 넣고 125rpm속도로 회전 진탕배양 하였다. MS 액체 배지(5% sucrose)는 picloram 과 zeatin을 0, 0.3, 1, 3mg/L의 다양한 농도로 처리하였으며, 배양 기간에 따라 각 처리에 따른 캘러스 생체 중 변화를 조사하였다.

2) 나리 계통 신 품종의 체세포배 발생 세포 유도

본 실험은 주요 오리엔탈 나리 품종에서 실증된 배 발생 세포 유도 배양 조건을 이용하여 다양한 나리 계통 및 국내 육종 등록된 신 품종의 배 발생 세포 유도를 위해 최적 auxin종류와 농도를 구명하고자 실시하였다. 나리재배 농가에서 의뢰한 오리엔탈나리 'Anais Anais', 'Bellimzon' 두 품종과 원예연구소에서 제공한 오리엔탈나리계통 'O-964401', 아시아틱 나리 교잡종 'A98-89', 'A03-73', FA 중간교잡종 'FA00-23', FA'03-5'을 분양받아 공시재료로 사용하였다.

MS 기본 고체배지(3% sucrose, 0.4% gelrite, pH 5.8)에 옥신 picloram과 dicamba의 농도를 2수준(3, 6 mg/L)으로 달리하여 치상하였으며, 유도된 배 발생 세포는 옥신의 농도를 줄인 동일한 액체를 이용하여 진탕 배양하였다. 기내 소자구의 인편은 5×5mm 크기로 썰어 petridish당 10절편체를 치상하였으며, 각 처리별 5반복 하였다. 배양실은 23℃ 항온으로 유지하며 암배양 하였다. 매 4주마다 계대배양하며, 16주 배양 후 식물생장조절제 처리에 따른 나리 계통별 배 발생 세포 형성과 기관 분화에 대해 조사하였다.

3) 기내 자구 대량생산을 위한 배 발생 세포의 전배양 조건 최적화

본 실험은 배 발생 세포를 이용한 이단계 기내 자구 대량생산 체계를 안정적으로 확립하기 위하여 실시하였다. 생물반응기를 이용하여 급속 증식된 배 발생 세포는 그 수량이 자구 재분화를 위한 이단계 배양에 사용되는 배 발생 세포보다 많이 증식됨에 따라 과잉 생산된 배 발생 세포의 안정된 저장 조건을 확립이 절실히 요구 되었다.

생물반응기를 이용하여 생산된 'Casablanca'의 배 발생 세포덩어리를 이용하였으며, 배 발생 세포 저장용 배지는 MS 고체배지(0.4% gelrite, pH 5.8)를 기본 배지로 하였으며, 당 농도를 0, 6%로 처리하고, 저장온도를 10℃, 23℃로 달리하여 30일간 암보관 한 후 배 발생 세포의 변화를 조사하였다.

4) 배 발생 켈러스 생물반응기 배양과 자구 생산

배 발생 켈러스의 대량 급속 증식 시 배양 환경을 scale up하기 위해 생물반응기를 이용하였다. 오리엔탈 나리 'Marco Polo', 'Casa Blanca', 'Sorbonne', 'Con Amore', 'Acapulco', 'Stargager', 'O-964401'의 배 발생 세포괴를 이용하여 5-L air-lift-type 생물반응기에서 배양하였다. 배 발생 세포의 증식은 MS 액체 배지에 5% sucrose와 1mg/L picloram으로 처리하고, 배지의 optical density가 600nm에서 약 0.6수준이 되도록 유지하며 배지를 첨가하며 배양하였다. 배 발생 켈러스는 약 2개월간 생물반응기에서 배양하고 수확하였다. 급속 증식된 배 발생 세포괴는 잘게 부쇄 식물생장조절제가 첨가되지 않은 재분화용 MS 배지 (5% sucrose, 0.5% gelrite)를 80ml 넣어준 배양용기 (96×96×90mm vitro vent box, Duchefa Co.)에 0.2g씩 치상하였다. 배 발생 켈러스로부터 소자구의 재분화를 유도하기 위해 배양온도 23℃를 유지하며 암배양 하였다.

재분화된 자구의 비대를 위해 염 농도를 반으로 줄인 MS 배지에 9% sucrose가 첨가된 액체배지를 한 달 간격으로 배양 용기 당 20ml 씩 분주하였다. 자구 재분화와 구비대 배양 4개월 후 기내 소자구를 수확하였으며, 수확한 소자구는 4℃ 저온창고에서 8주간 저장하며 춘화 처리하였다.

5) 배 발생 세포 유래 기내 자구의 포장 재배

배 발생 켈러스로부터 재분화된 오리엔탈 나리 'Marco Polo'와 'Casa blanca'의 소자구는 8주간의 저온(4℃)처리 이후 45 × 60 cm 삼목상자에 상토 (peat moss: perlite: vermiculite = 1:1:1)를 담아 파종하고, 완효성 비료인 오스모코트(N:P:K=14:14:14)(Scotts Co., Heerlen)를 40g/m² 씩 9주 간격으로 시비하였다. 8개월간 포장재배 이후 6-9size 크기의 구근은 나리전용상토(신성미네랄 (주))로 배드를 만들어 백합 재배용 표준양액(원예시험장)으로 시비하며 재배하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 주요 오리엔탈 나리 품종의 배 발생 세포 유도

오리엔탈 나리 품종별 기내 인편 절편체를 이용한 배 발생 캘러스 유도는 식물생장조절물질과 농도에 따라 다양한 분화상태를 나타내었다(Fig. 1). 주요 오리엔탈 나리 7 품종 ‘Marco Polo’, ‘Casablanca’, ‘Siberia’, ‘Sorbonne’, ‘Con Amore’, ‘Acapulco’, ‘Stargager’의 배 발생 세포 유도를 위한 실험 결과는 Table 1과 같다. Table 1에서와 같이 배 발생 세포 유도와 기관분화에 미치는 옥신의 종류 및 농도는 품종에 따라 다른 결과를 나타내었다. ‘Marco Polo’는 3mg/L picloram이 첨가된 배지에서 약 60%의 배 발생 세포가 형성되었으나 6, 9mg/L 첨가 시 비 배발생 세포유도가 증가 되었다. Dicamba 1mg/L 첨가된 배지에선 비 배발생 세포만 100% 유도되었으며, 농도가 증가 할수록 비 배발생 세포의 유도가 감소 하였다. 2,4-D 처리는 전반적으로 기관분화에 영향을 미치고 있었으며, 농도증가에 따라 기관분화가 줄어드는 경향이였다. ‘Casablanca’는 picloram 1~6mg/L처리시 70%이상의 배 발생 캘러스가 유도 되었으나, 9mg/L 처리구에선 비 배발생 세포만이 유도되었다. dicamba와 2,4-D 처리구는 배발생 세포 형성이 거의 일어나지 않았으며, dicamba 1, 3mg/L 처리구에서 70%이상의 비 발생 세포가 형성되었다. Dicamba는 저농도 처리구에서 뿌리 기관 유도에 영향을 주고 있음을 확인하였다. ‘Siberia’도 dicamba 1 mg/L 처리구에서 비 배발생 캘러스 유도가 많았으며, picloram 3mg/L 처리시 배 발생 세포 형성이 가장 우수 하였다. 2,4-D처리구는 저농도에서 뿌리와 소자구 형성이 우수하였으나 6mg/L 이상 처리시 기관 형성이 50% 이하로 감소하는 경향을 보였다.

오리엔탈 나리 유색계열 품종 ‘Sorbonne’, ‘Con Amore’, ‘Acapulco’, ‘Stargager’의 체세포배 발생 세포 유도 시 Table 1에서와 같이 배 발생 유도와 기관분화에 미치는 옥신의 종류 및 농도는 품종에 따라 다른 경향을 나타내었다.

모든 품종은 2,4-D 1~3mg/L 처리 시 기관분화에 의한 자구형성이 되었으며 Dicamba, picloram 1mg/L 처리구도 같은 경향을 보였다. Dicamba와 2,4-D 처리구는 배 발생 세포 형성이 거의 일어나지 않았으며, dicamba 처리구는 비 배발생 세포 발생이 일어남으로 인해 dicamba 와 2,4-D 1~3mg/L의 처리 시 자구와 뿌리의 기관형성에 영향을 미치는 것으로 판단되었다. 체세포 배 발생 세포

의 형성은 picloram 처리 시 가장 왕성하게 나타났으며, 품종별 최적 농도는 다르나 대부분의 처리구에서 체세포배 발생 세포가 형성되었다. 하지만 고농도의 옥신으로 유도된 배 발생 세포는 배양시기가 길어짐에 따라 점차 갈변하여 고사함으로 인해 picloram 3~6mg/L의 농도에서 인편 배양을 통해 체세포배 발생 세포를 유도하는 것이 유리한 것으로 판단되었다. Simmonds와 Cumming(1976)은 오리엔탈 나리의 인편 조직으로부터 캘러스 유도시 배양 2~4개월에 캘러스를 획득할 수 있었으며, Wickremesinhe 등(1994)은 나팔나리의 미성숙 잎과 줄기를 이용하여 배양 8주경에 캘러스를 유도 할 수 있었다. 본 실험의 경우 3~4개월의 배양기간이 경과한 후 인편의 절단면으로부터 캘러스가 형성되어 이들의 결과와 일치하였다.

Table 1. Effect of 2,4-D, Dicamba and Picloram of various concentrations on callus or and organ formation from bulbscales of *Lilium Oriental Hybrids*

Cultivar	PGR (mg · L ⁻¹)	Organogenesis (%)		Total callus formation (%)		
		Bulblet	Root	Non embryogenic callus	Embryogenic callus	
Marco Polo	2,4-D	1	83 a ^z	46 b	3 fg	0 c
		3	23 b	26 bcd	0 g	0 c
		6	10 bcd	13 bcd	0 g	0 c
		9	10 bcd	10 cd	0 g	0 c
	Dicamba	1	0 d	100 a	100 a	0 c
		3	16 bc	40 bc	83 ab	13 c
		6	3 cd	10 cd	53 cd	0 c
		9	0 d	0 d	6 fg	0 c
	Picloram	1	10 bcd	40 bc	30 def	30 b
		3	3 cd	13 bcd	23 efg	56 a
		6	0 d	0 d	43 cde	13 c
		9	0 d	0 d	63 bc	6 c
Casa Blanca	2,4-D	1	86 a	50 b	6 ef	0 e
		3	90 a	86 a	3 f	0 e
		6	50 a	50 b	45 c	10 d
		9	13 cd	13 cd	26 d	10 d
	Dicamba	1	0 d	100 a	100 a	0 e
		3	16 cd	26 c	76 b	6 de
		6	3 d	3 d	3 f	0 e
		9	0 d	0 d	0 f	0 e
	Picloram	1	46 b	10 cd	3 f	90 b
		3	26 b	0 d	0 f	100 a
		6	3 d	0 d	20 ef	80 c
		9	0 d	0 d	95 a	5 de

continue

Cultivar	PGR (mg · L ⁻¹)		Organogenesis (%)		Total callus formation (%)		
			Bulblet	Root	Non embryogenic callus	Embryogenic callus	
Siberia	2,4-D	1	100 a	100 a	0 f	0 d	
		3	90 a	100 a	10 ef	0 d	
		6	50 b	65 b	35 de	10 d	
		9	26 bcd	60 b	76 abc	10 d	
	Dicamba	1	0 d	100 a	100 a	0 d	
		3	16 cd	16 c	63 bcd	10 d	
		6	3 cd	3 c	6 ef	0 d	
		9	0 d	0 c	0 f	0 d	
	Picloram	1	50 b	56 b	20 ef	70 b	
		3	35 bc	0 c	0 f	100 a	
		6	13 cd	0 c	56 cd	43 c	
		9	0 d	6 c	93 ab	6 d	
Sorbonne	2,4-D	1	100 a ^z	46 bc	0 g	0 c	
		3	87 b	26 cd	0 g	0 c	
		6	10 cd	13 cd	20 bcd	0 c	
		9	0 d	10 cd	20 bcd	0 c	
	Dicamba	1	100 a	100 a	10 bcd	0 c	
		3	22 c	40 bc	45 bc	0 c	
		6	7 cd	10 cd	70 a	0 c	
		9	5 cd	0 d	6 dg	0 c	
	Picloram	1	100 a	40 bc	30 bcd	52 b	
		3	60 bc	13 cd	23 bcd	89 a	
		6	17 cd	0 d	43 bc	97 a	
		9	5 d	0 d	63 ab	92 a	
		Non	0	100 a	10 cd	0 g	0 c
	Acapulco	2,4-D	1	100 a	97 ab	0 c	0 d
3			100 a	85 bc	0 c	0 d	
6			37 cd	65 c	0 c	0 d	
9			7 d	12 df	0 c	0 d	
Dicamba		1	100 a	100 a	0 c	0 d	
		3	45 cd	65 c	25 bc	0 d	
		6	7 d	15 df	100 a	0 d	
		9	15 cd	10 df	20 bc	0 d	
Picloram		1	100 a	100 a	0 c	70 bc	
		3	70 b	7 df	0 c	100 a	
		6	22 cd	0 g	0 c	62 c	
		9	10 d	0 g	3 c	38 cd	
		Non	0	100 a	97 ab	0 c	0 d

continue

Cultivar	PGR (mg · L ⁻¹)		Organogenesis (%)		Total callus formation (%)	
			Bulblet	Root	Non embryogenic callus	Embryogenic callus
Stargazer	2,4-D	1	100 a ^z	100 a	0 d	0 d
		3	25 d	47 bc	0 d	0 d
		6	0 d	5 d	0 d	0 d
		9	0 d	0 cd	0 d	0 d
	Dicamba	1	100 a	90 ab	27 c	0 d
		3	100 a	70 bc	72 ab	13 cd
		6	0 d	12 c	100 a	0 d
		9	0 d	0 d	0 d	0 d
	Picloram	1	65 bc	47 bc	23 c	30 bc
		3	77 bc	0 d	5 d	56 b
		6	47 cd	0 d	0 d	85 a
		9	20 d	0 d	13 cd	82 a
		Non ^y	0	100 a	15 c	0 d
Con Amore	2,4-D	1	100 a	95 a	0 d	0 c
		3	82 bc	100 a	0 d	0 c
		6	20 d	67 bc	20 cd	0 c
		9	3 d	60 bc	20 cd	0 c
	Dicamba	1	67 cd	95 a	10 cd	0 c
		3	72 cd	27 d	45 b	0 c
		6	12 d	0 f	70 a	0 c
		9	15 d	0 f	6 d	0 c
	Picloram	1	77 bc	75 bc	10 cd	52 b
		3	100 a	0 f	0 d	90 a
		6	42 cd	0 f	0 d	97 a
		9	52 cd	0 f	13 cd	90 a
		Non	0	100 a	10 d	0 d

^zMean separation in columns by Duncan's multiple range test, 5% level

오리엔탈나리 공시 품종 모두 2,4-D 1mg/L 처리구에서 자구 분화가 80% 이상 높게 나타났으며 2,4-D 처리 시 배 발생 켈러스유도가 거의 일어나지 않았다. 이는 Arzate-Fernandez 등(1997)이 나팔나리의 anther를 지닌 filament에서 2,4-D 저 농도 처리 시 배 발생 켈러스를 유도하였고, van Aartrijk 등(1990)이 인편으로부터 직접 부정아를 유도 할 때보다 켈러스를 유도할 경우에는 상대적으로 고농도의 옥신(IAA, NAA, 2,4-D: 5-25 μ M)과 사이토키닌(Kinetin, BA: 5-25 μ M)이 필요하다는 보고와 상반된 결과를 나타냈다.

박 등(2000)은 오리엔탈 나리 기내 소인편을 이용하였을 때 저농도의 2,4-D에 저농도의 BA를 혼합하여 처리 시 비교적 높은 켈러스 유도가 용이했던 것은 이전의 연구자들이 켈러스 유도를 위해 인편 외식체를 재료로 사용한 반면, 박 등(2000)은 기내 소인경의 소인편을 사용했기 때문이라고 보고하였다.

오리엔탈 나리 공시 품종 모두 배 발생 켈러스는 picloram 1, 3mg/L 처리구에서 형성율이 높았으며, 고농도(6, 9mg/L) 처리시 켈러스 형성이 억제되는 경향이였다. 품종에 따라 배 발생 켈러스 형성율에 차이가 나타났으며, 'Marco Polo'가 상대적으로 낮은 경향이였다. Dicamba 처리구는 공시 품종 모두 비 배 발생 켈러스가 형성되었으며, 1mg/L 처리시 모든 인편으로부터 뿌리가 형성되었다. 1, 3mg/L picloram 처리시 얻어진 배 발생 켈러스는 구형(nodular)의 compact한 yellow 빛을 지닌 형태를 보여, 비 배 발생 켈러스와는 시각적으로 구분할 수 있었다 (Fig. 16A, 16B). Tribularo 등(1997)은 켈러스 형성능력은 각 식물이 갖고 있는 유전적 형태와 연관되었음을 보고 하였으며, 김 등(1999)도 식물생장물질에 대한 형태형성 반응은 종에 따라 큰 차이가 있었으며 이것은 유전자형에 따라 체내 호르몬의 발란스 또는 민감성이 각기 다르기 때문이라고 하였다. 박 등(2000)도 켈러스의 유기는 품종 및 배양된 외식체의 종류에 따라 민감하다고 한 보고와 같이 본 실험에서, 품종에 따른 배 발생 켈러스 형성의 차이는 이전의 연구와 같은 경향이였다.

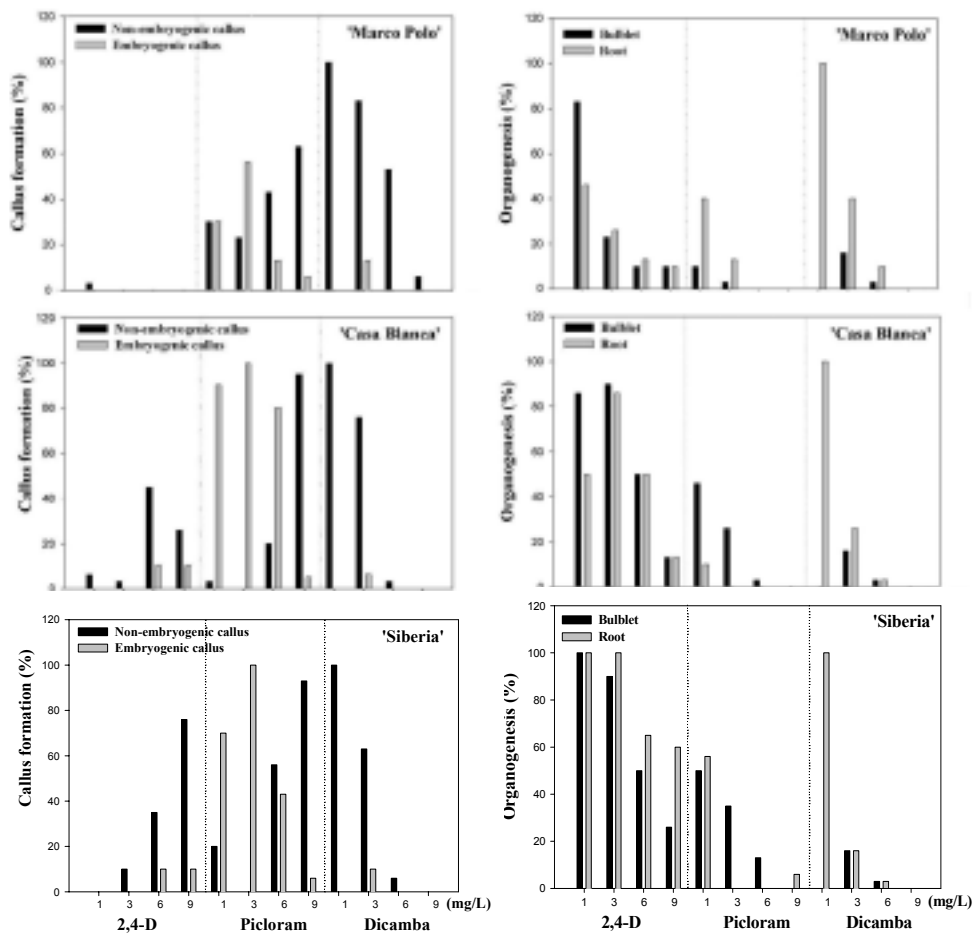


Figure 1. Effect of 2,4-D, Picloram and Dicamba of various concentrations on callus formation and organogenesis from bulb scales of Lilium Oriental Hybrids

2) 배발생 세포 급속 증식 조건 확립

기내 인편에서 유도된 배 발생 세포는 급속 대량 증식을 위해 배 발생 세포 유도 시 사용한 옥신의 농도로 진탕배양 하는 것이 일반화 되어 있다. Simmonds와 Cumming(1976), Kato와 Yasutake(1977) 그리고 박 등(2000)은 배 발생 캘러스는 배양초기에 뛰어난 식물체 재생능력을 가지고 있어 캘러스의 유지 및 증식이 어려웠다고 하였다. Simmonds와 Cumming(1976)은 일단 유도된 캘러스는 성장조절제가 첨가되지 않은 배지에서도 왕성하게 증식되었다고 보고하였고, Stimart 등(1980)도 동일한 결과를 보고 하였다. 배 발생 세포는 장시간 배양시 변이체 발생의 위험이 있는 것으로 보고 되었으며, 이에 배 발생 유래 식물체의 변이 발생 요건을 최대한 억제하며 세포를 급속 증식하기위한 식물성장 조절제와 최소 농도를 구명하고자 본 실험을 실시하였다.

Picloram과 zeatin을 농도별로 처리하고 10일간격으로 배 발생 세포의 생체중을 조사한 결과는 Figure 3과 같다. 배 발생세포의 무게 증가는 배양 초기 10~20일간 picloram 1mg/L 처리시 다른 처리구에 비해 우수하였으나 50일 가량 배양시 picloram 3mg/L 처리구를 제외한 모든 처리구가 동일한 무게 증가를 나타내었다. 본 실험에선 식물성장조절제가 첨가되지 않은 배지만만 아니라 식물성장조절제가 첨가된 배지에서도 캘러스가 왕성하게 증식되었으나 배양 초기 증식이 촉진된 것은 picloram이 1mg/L 첨가된 배지에서 가장 왕성하였다. 이에 안정적인 배 발생 세포의 급속 배양조건은 배 발생 세포유도의 최소 옥신 농도를 15일 간격으로 계대배양하는 것이 최선의 배양방법으로 사료된다.

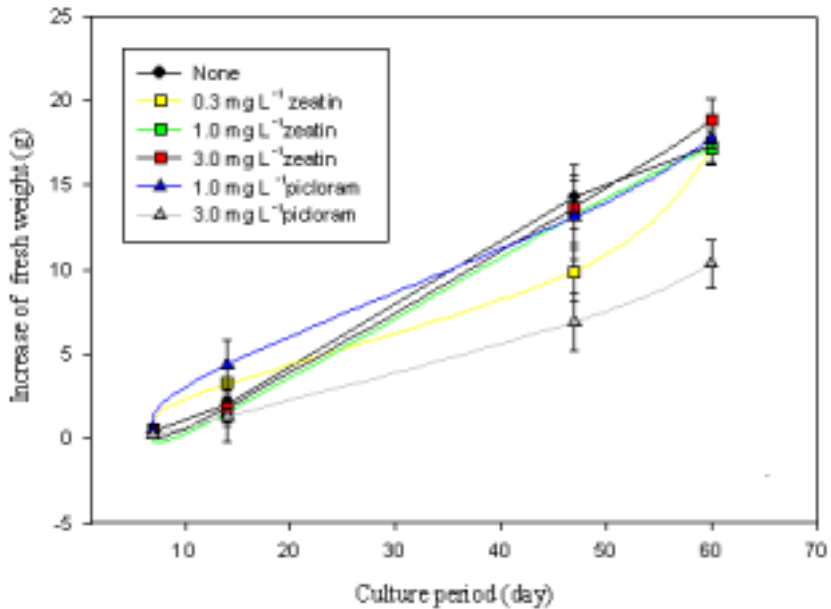


Figure 2. Fresh weight increase of embryogenic callus in liquid agitation cultures of 250ml flasks with liquid MS media containing either picloram or zeatin.

Tribulato 등(1997)은 2주 간격으로 계대배양 하였으며, 캘러스유도 배지를 이용한 회전 진탕 배양보다 식물생장조절제가 첨가되지 않은 배지에서 세포 증식이 용이하다고 보고하였으며, 이는 본 연구에서 확인된 배 발생 세포유도 최적농도인 picloram 3mg/L 첨가된 배지에서 배 발생 세포의 생육이 부진한 결과와 동일하였다. 대부분의 처리에서 60일 배양 시 최종적인 배 발생 세포 증식은 별 차이가 없었으나, 배 발생 세포 급속증식을 위해 배양 2주 내에 picloram 1mg/L 첨가된 액체배지를 이용하여 계대배양하는 것이 효율적인 방법으로 사료된다. 즉 배 발생 세포 유도 과정에서는 상대적으로 높은 고농도의 외생 식물생장조절물질이 필요하지만 한 번 형성된 배 발생 세포의 증식 및 계대배양시 이들의 요구도가 낮아지는 것은, 캘러스의 습관성(habituation)에 의한 것으로 판단되었다(Tribulato et al., 1997).

3) 나리 계통 신 품종의 체세포배 발생 세포 유도

나리 계통별 신 품종의 급속 증식을 위해 농가로부터 오리엔탈나리 'Anais Anais', 'Bellimzon' 두 품종과 원예연구소의 오리엔탈 나리 신 품종 'O-964401'와 아시아틱 나리 교잡종 'A98-89', 'A03-73', FA 중간교잡종 'FA00-23', 'FA03-5'의 기내 배양중인 소 자구를 분양받아 체세포배 세포 유도를 실시하였다. 오리엔탈 나리 계통의 경우 Picloram 3mg/L 첨가된 MS 기본배지에서 체세포배 발생 세포가 왕성하게 유도되었다. 체세포배 발생 세포는 옥신의 농도를 절반 이하로 줄인 동일한 액체배지를 이용하여 진탕 배양 하였으며, 2004년 8월 분양 받은 원예연구소의 오리엔탈 나리 신 품종 'O-964401'는 분양받은 두 개의 기내 자구에서 유도한 체세포배 세포를 5L급 생물반응기를 이용하여 증식하였고, 대부분의 체세포배 세포는 저온 저장하여 유지하고 있으며, 일부는 자구 재분화용 배지(MS 배지, 0.5% p-gel, 5% sucrose)에 치상하였다. 300여개의 배양용기에 치상한 'O-964401'는 재분화 및 초기생육이 왕성하여 총 18,000여개의 소자구가 형성되었다. 2005년 1월 말 농가에서 분양 받은 오리엔탈나리 'Anais Anais', 'Bellimzon'은 체세포배 세포를 유도하여 현재 250ml 삼각플라스크를 이용하여 현탁 배양하였으며(fig. 3), 'Anais Anais' 품종의 경우 생물반응기를 이용하여 배 발생 세포를 급속 증식하여 자구를 대량 생산 할 수 있었다.

나리 신 품종의 체세포배 발생 세포 유도는 나리 계통에 따라 발생 정도에 차이가 있었다. 오리엔탈 계통의 경우 본 과제에서 확립한 체세포배 세포 유도 최적화 조건(MS, 3% sucrose, 0.4% gelrite, picloram 3mg/L)에서 대부분 용이하게 배 발생 세포가 형성되었으나 아시아틱 나리 교잡종과 FA 중간교잡종의 경우 배 발생 세포 유도가 상대적으로 부진하였으며, 일부 형성된 배 발생 세포의 형태 및 증식 속도가 극히 떨어졌다. 그리고 신나팔나리(일명: 씨백합)의 경우 배 발생 세포 유도 배양 시 배 발생 세포형성과 형성된 배 발생 세포에서 자구의 재분화가 동시에 이루어지고 있어 체세포배 세포 유도 조건 구명과 체세포배 세포 유지가 어려웠다. 하지만 소수 배 발생 세포를 이용하여 자구를 소량(약 3,000구)수확 할 수 있었다(fig. 4). 신 나팔나리 계통은 좀 더 추가적인 연구를 수행하여 최적화 한다면 기내 소자구에서 당해 년도에 바로 개화구를 생산 할 수 있는 계기를 마련하게 될 것이다.

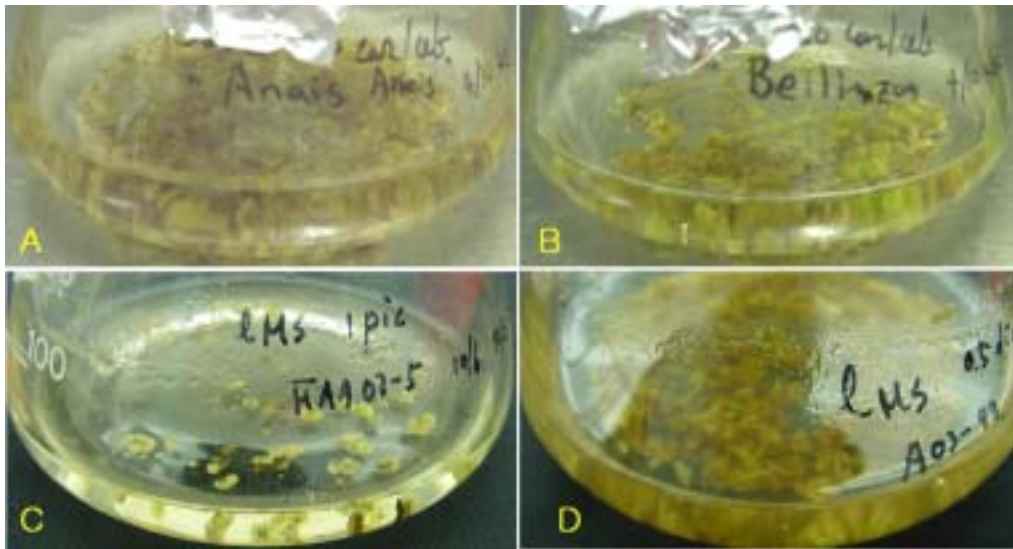


Figure 3. Suspension culture of lily new cultivars. (A) Oriental lily 'Anais Anais', (B) Oriental lily 'Bellinzon', (C) Interspecific hybrid of lily; *L. formolong* x Asiatic lily, (D) Asiatic lily hybrid



Figure 4. Mass production of bulblet through embryogenic callus culture in *L. formolong* 'Raizan'.

4) 기내 자구 대량생산을 위한 배 발생 세포의 전배양 조건 최적화

Simmonds와 Cumming(1976), Kato와 Yasutake(1977) 그리고 박 등(2000)은 배 발생 캘러스는 배양초기에 뛰어난 식물체 재생능력을 가지고 있어 캘러스의 유지 및 증식이 어려웠다고 하였다. 이와 같이 왕성한 식물체 재생능력을 지니고 있는 배 발생 세포는 이를 이용한 자구 증식 체계를 확립하기 위해 배 발생 세포의 뛰어난 재생 능력을 지닌 안정한 수준에서의 보관에 관한 연구가 필요하다. 따라서 생물반응기를 이용하여 급속 대량 생산된 배발생 세포의 잉여 생산분에 대해 안정적인 저장 방법을 확립하고자 본 실험을 수행하였다.

소형 탱크 배양기를 이용해 급속 증식된 'Casablanca'의 배 발생 세포를 저장온도 (10℃, 23℃)와 보관용 배지(MS 0.5% p-gel)의 당 농도(0, 6%)를 달리하여 30일 간 보관한 후 세포의 변화를 조사하였다. 처리 30일 후 보관 조건에 따른 배 발생세포의 상태는 저장 온도에 따라 큰 차이가 있었다(fig. 5). 10℃에서 보관한 callus는 처음 상태를 거의 유지하고 있었으나 상온(23℃)에서 보관한 callus는 심하게 갈변되어 있었다. 보관용 배지의 당 농도가 callus의 보관에 미치는 영향은 온도 처리에 비해 미비하였으나 상온 보관시 약간의 뿌리발육이 형성되었음을 관찰하였고, 저온보관 시 기관 분화 없이 callus가 증식되었음을 확인하였다.

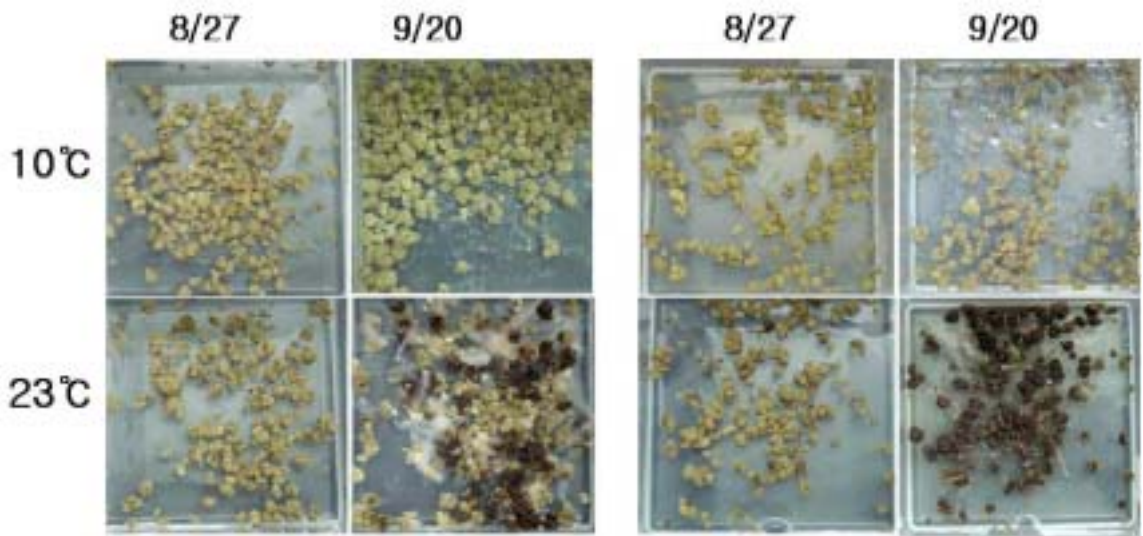


Figure 5. Effect of temperature and sucrose on preservation in embryogenic cell of Oriental lily 'Casablanca'. Left : MSØ 6% sucrose, 0.5% p-gel, right : MSØ 0% sucrose, 0.5% p-gel.

5) 배 발생 캘러스 생물반응기 배양과 자구 생산

식물체 재분화 및 기내 소 자구 대량 생산 체세포배 세포 유도 및 재분화를 이용하여 오리엔탈 나리 유색계열 ‘Sorbonne’, ‘Con Amore’, ‘Acapulco’, ‘Stargazer’ 와 원예시험장 신품종 ‘O-964401’의 기내 소자구 생산 현황은 Table 2와 같다.

Table 2와 같이 체세포배 세포 유도 배양 및 급속증식을 통해 오리엔탈 나리 7 품종의 자구 대량 생산이 가능하였으며, 오리엔탈 나리의 경우 자구생산을 위한 품종 선택 시 시장성 있는 품종을 선별하여 대량 생산을 할 수 있음으로 인하여 소비자 기호에 맞는 신품종을 조기에 공급할 수 있는 체계를 갖추게 되었다.

Table 2. Production of bulblet via somatic embryogenic cell culture in Oriental lilies.

Cultivar	Number of culture box	Number of bulblet ^z
Con Amore	784	54,880
Stargazer	644	47,880
Acapulco	474	33,180
Sorbonne	8,540	420,100
‘O-964401’	325	22,750
Marco Polo	247	12,300
Casablanca	232	11,600
Sum	11,246	602,690

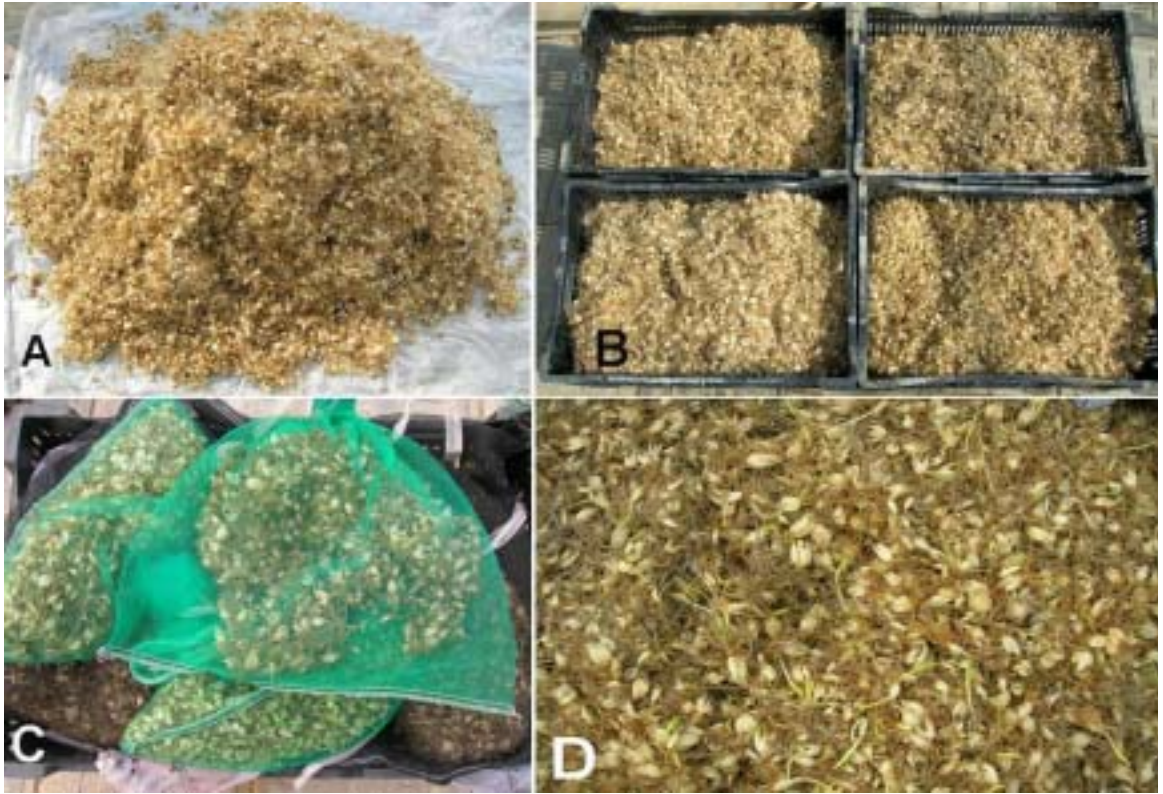


Figure 6. Mass production of bulblet through embryogenic callus culture in Oriental lily 'Sorbonne'. (A),(B);Mass production of small bulblets harvested after culture for 4 months in vitro about 150,000 bulblets on 2005 (C),(D); about 60,000 bulblets on 2006

오리엔탈나리의 기내 자구 대량 생산을 산업적으로 이용하기 위해서 가장 먼저 고려해야 할 것은 해외 화훼시장 조사 및 나리 절화 재배농가와의 지속적인 대화를 통해 시장성 있는 품종을 선택하는 것이다. 본 과제의 수행 시 주요 오리엔탈나리 품종 7종을 선택하여 연구를 진행하였지만 나리 절화 재배농가는 'Sorbonne' 품종을 가장 선호하였다. 다른 품종의 경우 이미 유행이 지났거나 농가에서 선호하는 재배 작형에 맞지 않거나 경제성이 떨어지는 이유 등으로 선호하지 않았다. 따라서 기내 자구 대량 생산용으로 'Sorbonne' 품종을 선정하여 주력하였다. 이에 2006년 6월 현재 'Sorbonne' 품종의 수확한 기내 자구수는 25만구이며, 현재 기내 배양 중인 15만구를 포함 하여 총 40여만구를 생산하였다(Table 2, fig. 6).

실험에 사용한 오리엔탈 나리 품종 모두 체세포배 발생 세포 유도 최적화 조건의 배지를 이용 하였을 때 체세포배 발생 세포가 왕성하게 분화하였으며, 이를 5L급 생물반응기에 옥신의 농도를 절반이하로 줄인 동일한 액체배지를 첨가하여 2개월간 급속 증식 배양하였다(fig. 7). 수확한 체세포배 발생 세포는 옥신이 배제된 보관용 배지에 담아 10℃에서 암 보관하며, 재분화용 배지(MS, 5% sucrose, 0.5% gelrite)에 치상하여 자구형성을 유도 하였다. 체세포배 발생 세포의 재분화는 초기 소수의 자구만이 형성되기 시작하였으나 배양 기간이 증가함에 따라 배양용기 당 50~70여개의 소자구가 형성되었다(fig. 8). 재분화 된 기내 자구는 자구 비대용 배지를 4주 간격으로 넣어 주며 기내에서 구 비대를 유도 하였다.



Figure 7. Bio-reactor culture of somatic embryogenic cell of Oriental lily 'Casablanca'(left), 'Marco Polo'(right).

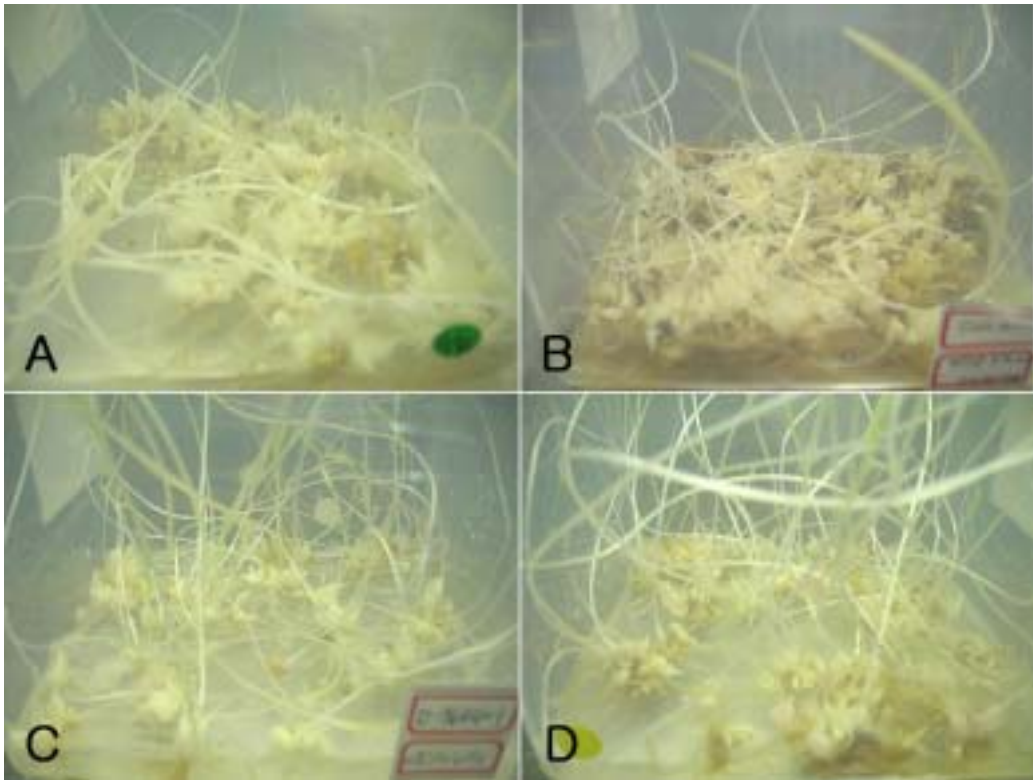


Figure 8. Somatic embryogenic cell derived bulblets formed on hormone-free medium. (A) Oriental lily 'Sorbonne', (B) Oriental lily 'Con Amore', (C) New Oriental lily cultivar 'O-964401', (D) Oriental lily 'Acapulco'

일반적인 나리의 기내 무병주 생산은 성장점 배양을 이용하여 기내 무병 종구를 1차적으로 획득한 후에 그 인편을 떼어 내어 증식하는 방법을 이용하나 인편 계대배양 시 인력수요가 많아 기내 종구 생산단가가 높아져 경제적이지 못하다. 또한 대형 생물 배양기를 이용한 자구 급속 비대의 경우 액체배지에서 장기간 성장한 관계로 생물 배양기에서 수확 후 구근 순화에 어려움이 있으며, 오염 및 초기 시설투자비 부담이 문제시 되며, 다양한 품종을 생산할 경우 추가적인 시설 투자비 지출이 문제로 발생한다. 하지만 다양한 나리 품종을 동시에 대량 생산하기 위해서는 5L급 생물반응기를 이용하여 배발생 세포만을 급속 증식 시킴으로써 오염에 의한 피해를 최소한으로 줄일 수 있으며, 단기간에 대량의 기내 자구를 생산할 수 있다.

이와 같이 본 연구 결과 체세포배 세포 유도 및 급속증식을 통해 품종당 소수의 자구에서 연간 10만 단위 이상의 자구 생산이 가능하였으며, 소수의 인원으로 오리엔탈 나리의 다 품종 급속 대량 생산이 가능함을 확인하였다. 따라서, 오리엔탈 나리 수입종 및 국내 육성 품종의 무병 종구생산에 본 시스템을 활용 하면 국내 나리 종구 자급화 문제를 해결할 수 있을 것으로 판단되며, 오리엔탈 나리 무병 종구 생산이 종자산업의 한 분야로써 산업적인 경쟁력을 지닐 수 있을 것으로 사료된다.

6) 배 발생 세포 유래 기내 자구의 포장 재배

배 발생 캘러스로부터 재분화된 오리엔탈 나리 'Marco Polo'와 'Casa blanca'의 소자구는 8주간의 저온(4℃)처리 이후 45 × 60 cm 삼목상자에 상토 (peat moss: perlite: vermiculite = 1:1:1)를 담아 파종하고, 완효성 비료인 오스모코트(N:P:K=14:14:14)(Scotts Co., Heerlen)를 40g/m² 씩 9주 간격으로 시비하였다. 8개월간 포장재배 이후 6-9size 크기의 구근은 나리전용상토(신성미네랄 (주))로 베드를 만들어 백합 재배용 표준양액(원예시험장)으로 시비하며 재배하였다.

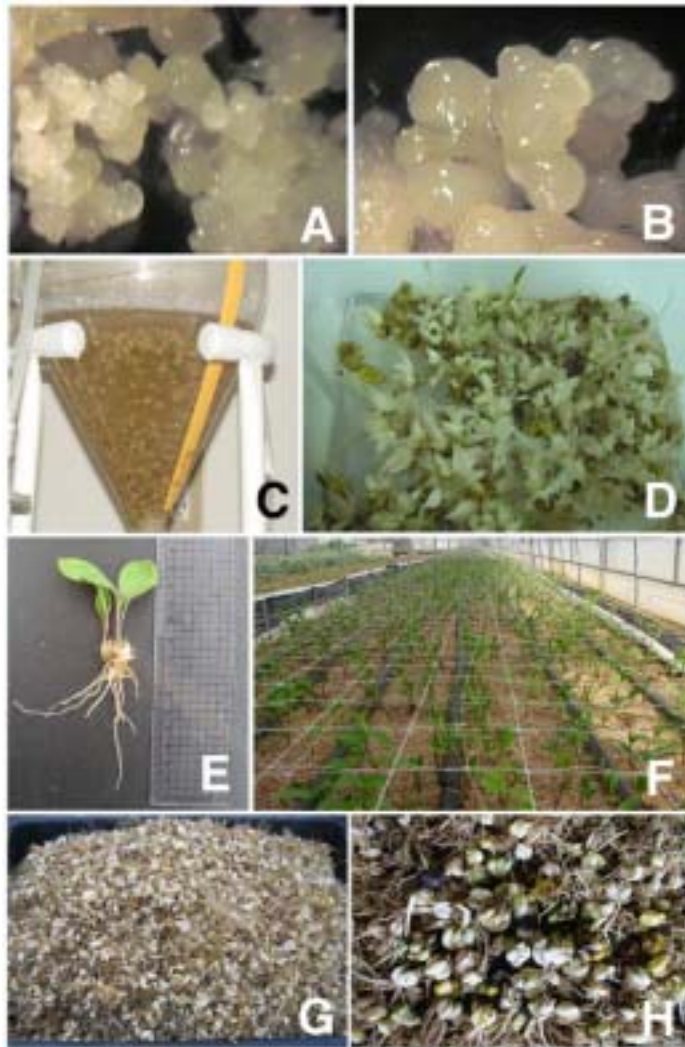


Figure 9. Mass production of bulblet through embryogenic callus culture in Oriental lily 'Marco Polo'. (A) Non embryogenic callus, (B) Globular type hard callus of Embryogenic callus (C) Embryogenic callus culture in 5-L air-lift bioreactor using liquid MS medium supplemented 1mg/L picloram, 5% sucrose, (D) Embryogenic callus-derived bulblets formed on hormone-free MS agar medium supplemented 0.3% gelrite and 9% sucrose, (E) Sprouted bulblets in bed soil 1 months after planting in a greenhouse and (F) Bulblet-derived plants growing in a greenhouse, (G) Mass production of small bulblets harvested after culture for 4 months in vitro, (H) Bulbs harvested after growing for 8 months in a greenhouse

제2절 체세포배 유래 개화구의 생산성 검정

가. 재료 및 방법

1) 기내 자구의 포장 정밀양구

체세포배 발생 세포를 이용하여 단기간(8개월) 급속 대량 생산한 'Sorbonne' 기내 소 자구는 나리 재배 농가의 포장 실증 재배를 통해 기내 소자구의 생산성 검사를 위하여 본 실험을 실시하였다. 오리엔탈나리 'Sorbonne' 품종은 나리 재배 농가로부터 가장 선호하는 품종으로 2004년 말 본격적으로 대량 생산용 품종으로 선정하여 배양하기 시작하였으며 배양시작 9개월만인 2005년 8월 기내 소자구 13만구를 수확할 수 있었다. 수확한 자구는 벤레이트 1,000배액으로 2시간 침지 소독 후 하루 동안 음건 하고 피트모스(습도 70%)를 충전하여 저온 창고에 저장하였다. 4℃에서 2개월간 저장한 소자구는 2005년 10월 제주도, 2006년 2월 말 태안과 홍성의 농가에 10,000구 씩 분양하였다. 기내 소자구의 파종과 양구는 재배 농가의 관행 조건에 따라 실시하였으며, 파종 3개월 후 농가를 방문하여 자구의 생육 상태를 조사하였다.

2) 체세포배 유래 식물 특성 검정

가. RAPD 분석

체세포배 발생 세포에서 재분화 된 식물체의 유전적 변이 발생을 분석하기 위하여 분자생물학적인 DNA마커 수준에서의 검증은 RAPD분석을 실시하였다.

오리엔탈 나리 'Casablanca'의 포장 재배 2년차 체세포배 유래 개체와 재배품종을 공시재료로 사용하였다. 공시재료를 이용한 RAPD 분석은 OPB primer 6종(OPB-3, 5, 8, 13, 16, 20)을 이용하여 1x buffer, 1.5mM MgCl₂, 0.8mM dNTP, 1unit Taq DNA polymerase, 0.1pmole primer, DNA 250ng 농도로 최종 20 μ l 반응액으로 조성하였다. PCR 반응은 94℃에서 4분 동안 예열한 다음 94℃에서 30초간 denaturation, 38℃에서 1분간 annealing, 그리고 72℃에서 2분간의 extension을 35cycle 반복한 후 72℃에서 7분 동안 마지막 extension을 하였다. PCR산물은 1.5% agarose gel[TBE buffer(pH8.0)]에서 80V로 1시간 30분 동안

전기영동 하여 분리하였다.

나. 핵형 분석 및 변이 조사

오리엔탈 나리 'Casablanca', 'Marco Polo'의 배 발생 세포 유래 식물의 핵형 확인을 위해 왕성하게 자라고 있는 배 발생 세포와 체세포 유래 식물의 뿌리를 이용하였다. 체세포 유래 식물의 뿌리에서 왕성하게 분열하는 근단과 배 발생 세포는 0.002M 8-hydroxyquinoline 용액에 담아 18℃에서 4시간 동안 전처리 하였다. 4℃의 45% acetic acid 용액에 10분간 고정한 후 1N HCl로 60℃에서 약 15초간 가수분해하고 흐르는 물에 씻어서 1% aceto orcein에 담아 밤새 염색 하였다. 충분히 염색된 조직은 45% acetic acid와 glycine의 혼합액(1:1)을 한 방울 떨어뜨리고 squash기법으로 세포를 압착시킨 후 광학현미경 600배로 염색체를 관찰하였다. 공시 식물의 개화 검정은 배 발생 세포 배양을 통해 재분화 된 소자구를 온실에서 2년간 재배하면서 표현형의 변이 유무를 관찰하였다.

3) 체세포배 유래 자구의 바이러스 이병성 조사

오리엔탈 나리 'Casablanca', 'Marco Polo'의 체세포배 발생 세포, 체세포배 유래 기내자구, 포장 재배 자구의 잎, 인편을 이용하고 진딧물에 의해 바이러스 병징이 나타난 포장 재배 품종을 공시 재료로 이용하였다. ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay; Clark과 Adams, 1977)분석을 위하여 CMV와 LSV 1차 항체와 Alkaline phosphatase 와 conjugate된 2차 항체(Agria Inc., Elkhart, Indiana)를 각각 구입하였다. 검출시료는 잎과 인편, 체세포배 발생 세포를 사용하였으며, 시료량의 10배의 추출 완충액으로 추출된 시료는 ELISA 플레이트에 각각 200 μ l씩 첨가하여 CMV와 LSV의 검출에 이용하였다. 반응이 끝난 후에는 3M NaOH를 50 μ l 첨가하여 반응을 정지시킨 후 ELISA reader(SPECTRAMax 340PC Molecular Devices)를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 기내 자구의 포장 정밀양구

오리엔탈나리의 기내 자구 대량 생산을 산업적으로 이용하기 위해서 가장 먼저 고려해야 할 것은 해외 화훼시장 조사 및 나리 절화 재배농가와와의 지속적인 대화를 통해 시장성 있는 품종을 선택하는 것이다. 본 과제의 수행 시 주요 오리엔탈나리 품종 7종을 선택하여 연구를 진행하였지만 나리 절화 재배농가는 'Sorbonne' 품종을 가장 선호하였다. 다른 품종의 경우 이미 유행이 지났거나 농가에서 선호하는 재배 작형에 맞지 않거나 경제성이 떨어지는 이유 등으로 선호하지 않았다. 따라서 기내 자구 대량 생산용으로 'Sorbonne' 품종을 선정하여 주력하였다. 이에 2006년 6월 현재 'Sorbonne' 품종의 수확한 기내 자구수는 25만구이며(Table 2), 현재 기내 배양중인 15만구를 포함 하여 총 40여만구를 생산하였다(fig. 6). 2005년 8월 수확한 'Sorbonne' 자구는 벤레이트 1000배액으로 2시간 침지 소독 후 하루 동안 음건 하고 피트모스를 충전하여 저온 창고에 저장하였다. 이 후 배 발생 기내 자구의 농가 실증 재배를 통한 생산성 검증위해 지역별로 3농가를 선정하여 농가당 10,000구를 분양하였다. 농가의 검증 재배 결과 재배 농가의 재배 환경 및 재식 시기, 재배 노하우에 따라 기내 자구의 생육에 차이가 있었다(Table 3). 제주도 농가는 기내 자구를 토양에 정식하여 재배함으로써 전반적인 관리에 문제가 발생하여 생육이 저조하였으며, 태안과 홍성 농가에 제공한 자구는 재배 농가 실정에 따라 이듬해 3월에 인편엽이 상당히 자란(fig. 10)상태에서 파종함으로써 생육이 떨어질 것으로 우려 하였으나 재배 농가의 초기 포장 수분 관리 및 재배 노하우에 따라 생육에 큰 차이가 있었다(fig. 11).

Table 3.

Region	Field	No. of bulblet	Germination (%)	Planting method
Jaeju	soil	10,000	5	Broadcast seeding
Hongseong	artificial bed soil	10,000	32	Broadcast seeding
Taeon	artificial bed soil	10,000	93	Hill seeding

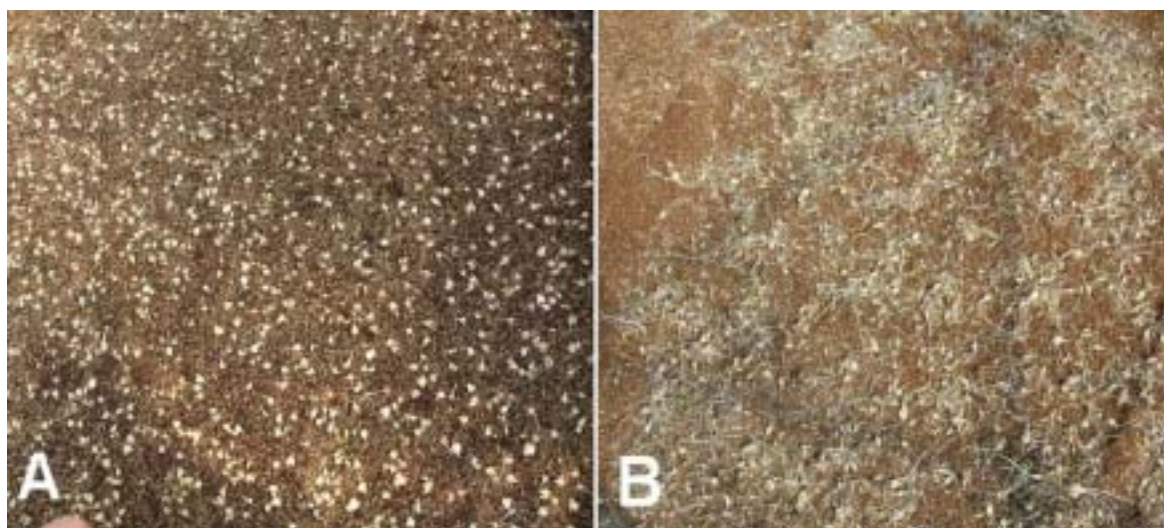


Figure 10. Planting method of *in vitro* bulblet. (A) Hilling seeding, (B) Broadcast seeding

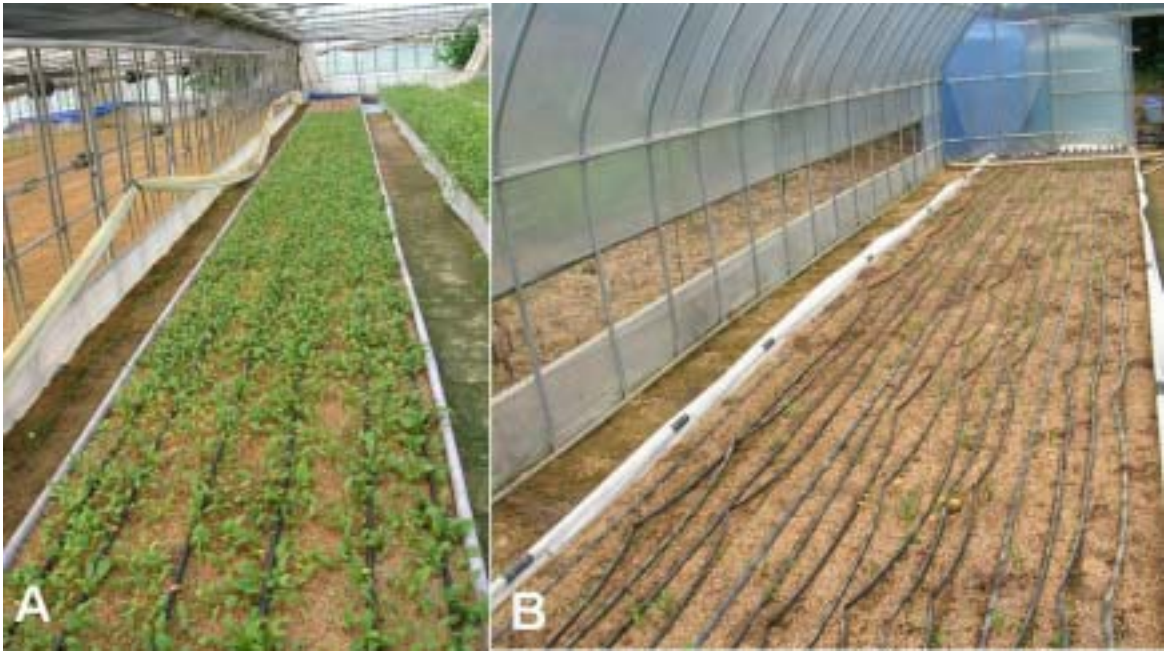


Figure 11. Field condition of seeding after 16weeks. (A) Taeon, (B) Hongseong.

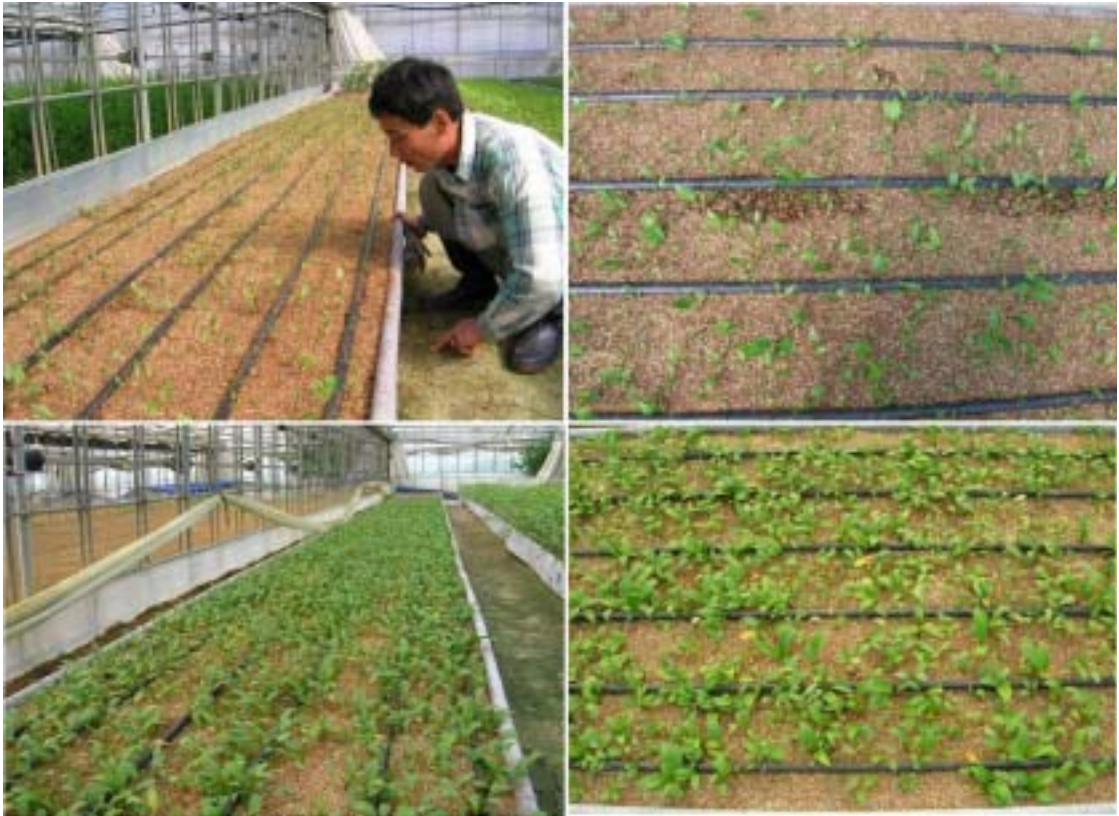


Figure 12. Somatic embryogenic cell derived bulblet of Oriental lily 'Sorbonne' growing in Taeon farmer. upper : seeding after 3 weeks(data: 2006-03-29), lower: seeding after 16 weeks(data: 2006-06-20)

태안과 홍성 농가의 경우 동일한 인공상토를 이용하여 배드를 제작하였으며, 관비 라인의 경우 홍성 농가는 10cm간격으로 좁게 설치함에도 불구하고 발아율이 상당히 떨어졌다. 반면 태안 농가는 약 9,300여 개체가 정상적으로 발아함으로써 자구가 상당히 작은 크기(평균 250mg/구)였음에도 불구하고 포장 재식 초기 자구 건조를 방지함으로써 자구 발아율을 높였다. 파종 직전 상토에 충분히 관수하고 점파한 이후 자구 위로 2cm 가량 상토로 덮어준 후 다시 한번 관수하였으며 이후 점적 양액 재배를 통해 93% 이상의 개체를 정상적으로 생육 시켰다 (fig. 12).

일반적으로 포장에서 자구의 비대는 기내에서 생산될 때 자구의 크기와 재배 시 경출엽의 발생과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다. 소자구의 비대 기작은 엽에

서 광합성 산물이 생활환을 다하는 동안 저장기관인 자구에 전분이나 당으로 축적됨으로서 비대 된다. 자구가 효율적으로 비대되기 위해서는 최대한의 엽면적 확보가 필요하고 엽면적 확보는 경출엽이 출현함으로써 가능하다(양 등 1998). 기내에서 생산된 나리 소자구는 대부분 휴면을 하며, 휴면타파를 위해서는 별도의 저온처리 시설과 시간 및 노력이 요구되므로 구근 생산비용이 그 만큼 증가하게 된다(Kim, 1999). 나리 기내 소자구의 휴면은 배양온도, sucrose 농도, 배양기간 등에 의해 크게 영향을 받는 것으로 보고 되어 있으며(Takayama와 Misawa, 1980), 15°C 이하의 저온에서 배양된 소자구는 휴면을 하지 않거나 휴면을 하더라도 그 정도가 얕은 것으로 알려져 있다(Kim 등, 1998).

예 등(2001)은 기내 배양 자구를 크기별로 구분하고 자구의 크기가 가장 작은 그룹(약 380mg)은 5°C 저온처리 8주 후에 90% 이상의 출엽율을 나타 냈으나, 1,000~3,400mg의 크기가 큰 자구의 경우 저온처리 10주 후에 90% 이상의 출엽율을 나타내어 자구의 크기가 크면 저온처리 기간이 길어졌음을 보고 하였다. 1,500mg 이하의 자구는 저온 처리 12 후에 약 30%미만의 경출을 나타내었으며, 380mg 이하의 자구는 거의 경출엽이 발생하지 않았다고 보고하였다.

농가 실증재배에 사용한 기내 자구는 체세포 배발생 세포로부터 단기간(8개월) 내에 생산된 자구이며, 수확 시 자구의 크기가 균일치 않고 평균 자구의 무게가 250mg인 소자구로써 4°C에서 2달간 저온 처리 시 경출엽이 되지 않는 경우가 대부분이었다. 이에 기내 번식된 소자구를 토양 이식 후 단기간 내 최대의 구경을 확보한 개화구를 만들 수 있는 효율적인 양구 방법이 요구 되고 있다. 태안 백합시험장(2003)은 나리 조직배양 자구의 2년 연속 재배 시 대구 생산 비율을 높여 농가 소득을 높일 수 있다고 보고 하였으며, 기내 나리 자구의 적정 순화 정식은 3월과 9월에 정식 시 가장 생육이 양호하였으며 처리 간 차이는 없음을 보고하였다(최 등, 1999). 김 등(1999)은 오리엔탈 나리 포장 양구 시 벗짚피복에서 구근의 생존율이 가장 높았으며, 벗짚피복과 30% 차광재배에서 구근 비대량이 가장 양호하였다고 보고하였다.

배 발생 세포로부터 단기간 내에 생산된 자구는 수확 시 자구의 크기가 균일치 않은 단점에도 불구하고, 상대적으로 단기간에 무병 우량 자구를 대량 생산할 수 있는 장점을 가지고 있다.

따라서 배 발생 세포 유래 기내 소자

구를 효율적으로 단기간 비대 시키기 위해서는 저온 처리한 자구를 가을(9월)에 파종 후 벧짚으로 피복하고, 양액으로 정밀 양구 하여 겨울에 자연스럽게 저온 처리를 함으로써 이른 봄에 대부분 경출엽을 발생 시킨 후 30% 차광 하여 1년간 양구 하면 자연스럽게 구주 12cm이상의 개화구 생산이 가능할 것으로 사료된다.

2) 체세포배 유래 개화구의 특성 검정

체세포배 발생 세포에서 재분화 된 식물체의 유전적 변이 발생을 분석하기 위하여 분자생물학적인 DNA마커 수준에서의 검증은 RAPD를 실시하였다. 염기 10mer의 짧은 random primer 6개를 이용하여 RAPD 분석 시 재배품종과 체세포배 세포 유래 재분화 식물체의 분자생물학적 수준에서의 변이 발생은 없는 것으로 판단되었다(fig. 13).

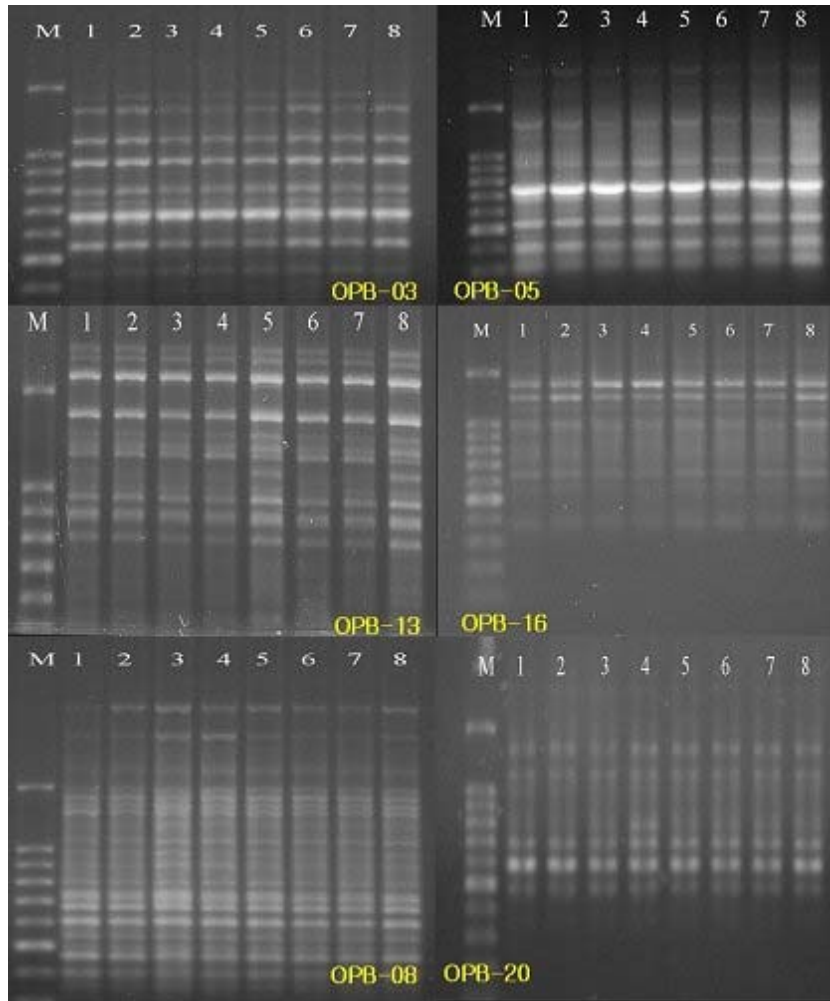


Figure 13. RAPDs for genotypic variation in Oriental lily 'Casablanca'

A: OPB-3, B: OPB-5, C: OPB-13, D: OPB16, E: OPB-8, F: OPB-20.
Line M: 100bp marker, 1: Cultivar plant, 2-8: Somatic embryogenic cell-driven plants

인편 유래 체세포배 세포와 체세포배 세포로부터 재생된 식물체 중 'Casablanca'와 'Marco Polo'의 염색체를 관찰한 결과(fig. 14), 두 품종 모두 모주의 염색체수와 동일한 $2n=24$ 로서 염색체의 수적 변화는 없었다. 박 등(2003)은 오리엔탈 나리의 소화경 유래 배 발생세포로부터 재생된 식물체와 인편유래 배 발생세포로부터 재생된 식물체의 염색체수를 관찰한 결과 모두 모주의 염색체수와 동일하였으며, 표현형 검정 시 꽃의 형태 및 색깔 그리고 식물체의 형태는 정상으로 변이의 발생이 없음을 보고하였다. 나리의 캘러스 배양 시에는 염색체의 수적 변화(Bennici, 1979)와 잎의 부분적인 키메라(Stimart 등, 1980)가 보고된 바 있으나 Wickremesinhe 등(1994)을 비롯한 여러 연구자들은 변이의 발생 정도가 매우 낮거나 없는 것으로 보고하고 있다(Simmonds와 Cumming, 1976; Priyadarshi와 Sen, 1992).

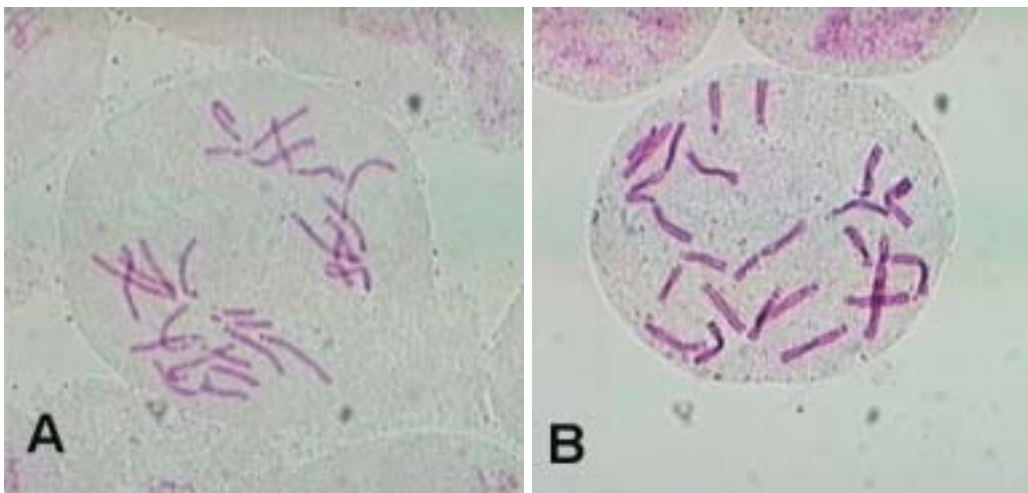


Figure 14. Chromosomes of plantlets regenerated from embryogenic cell-derived 'Casablanca'(A) and 'Marco Polo'. Chromosome numbers of both cultivars were $2n=24$, same as mother plants.

배 발생 세포 유래 생산한 'Casablanca'와 'Marco polo'의 자구는 온실에서 2년간 재배 하여, 변이 없이 생육함을 관찰할 수 있었으며, 'Casablanca' 15cm이상 구근은 강원도 연곡, 제주도 서귀포, 충남 서산의 나리 재배농가에 100구씩 분양하여 검증 재배를 의뢰하여 기존 재배품종과 체세포배 유래 개화구의 절화 상품성을 비교하였다(fig. 15). 세 지역별 농가에서 실증 재배 결과 모두 정상적인 절화를 생산하였다는 보고를 받을 수 있었다



Figure 15. Somatic embryogenic cell derived Oriental lily 'Casablanca' growing in Seosan, Jaeju. .

포장 재배 2년차 체세포배 유래 식물체 'Casablanca'와 'Marco polo'의 개화 및 생육특성을 조사하였다. 나리와 같은 화훼식물은 화기의 균일한 개화 특징을 가지고 있어야 하며, 체세포배 세포 유래 식물체에서도 기존 인편번식에 의해 증식된 재배품종과 동일한 개화 특성을 지니고 있어야 종구생산에 문제가 발생하지 않는다. 또한 표현형 검정결과, 꽃의 형태 및 색깔 그리고 식물체의 형태는 모두 정상으로 변이의 발생이 없었다(fig. 16).

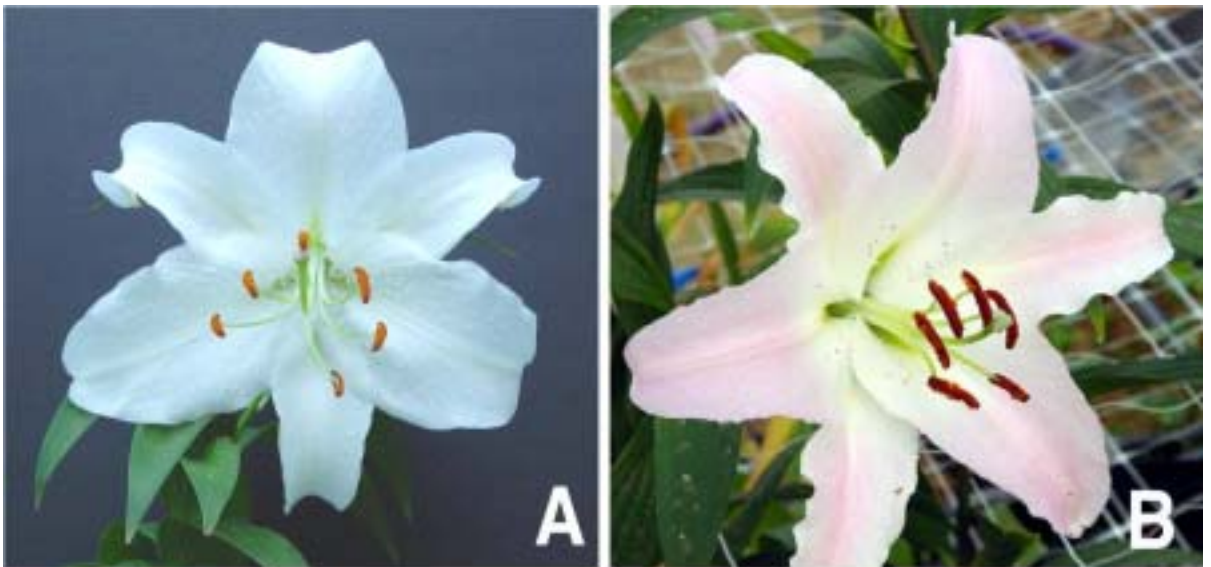


Figure 16. Flower of plants derived from embryogenic calli of Oriental lily hybrids Normal flower of Oriental lily 'Casa Blanca'(A), 'Marco Polo'(B), regenerated from 6-month-old callus.

포장 재배 2년차 체세포배 유래 식물체는 모두 정상적으로 개화 하였으며, 기존 재배품종과 화기 형태 및 크기는 유의적인 차이가 없었다(fig. 16). 다만 재배 품종에 비하여 구근의 크기가 작아 구당 화기수는 적었으나 'Casablanca'는 3년차 재배식물의 경우 재배품종에 비해 화기의 크기와 초장이 길어졌으며(Table 3), 생태적인 특징으로 잎의 전체적인 크기가 재배품종에 비해 큰 것으로 조사되었다.

'Marco Polo'의 경우 개화한 400여 개체 중 단 한 개체만이 형태적 변이를 나타내었으나 나머지 모두 정상적인 표현형을 나타내었다(fig. 17).

Table 3. Characteristics of Oriental lily 'Casablanca'

Cultvar	Line	Number of flower	Diameter of flower(cm)	Plant height (cm)
Casablanca	Cultiver plants ^z	6.2±1.4 ^x	20.5±0.7	78.5±4.9
	Somatic embryogenic cell-driven plants ^y	2.4±0.5	22.8±1.2	79.7±8.0
Marco Polo	Cultiver plants ^z	4.2±1.1 ^x	19.5±0.5	77.6±5.9
	Somatic embryogenic cell-driven plants ^y	2.3±0.8	17.8±0.8	64.7±5.0

^zBulb size : 15cm <

^yBulb size : 10~12cm

^xMean±SD



Figure 17. Mutant of Somatic embryogenic cell-driven Oriental lily 'Marco Polo'



Figure 18. Flowering of plants derived from somatic embryogenic cells in green house growing 2 years. (A) 'Marco Polo', (B) 'Casablanca'

이상의 결과 오리엔탈 나리의 체세포배 세포배양을 통해 재생된 식물체는 단기간의 배양을 통해 생산된 식물체는 염색체검정과 분자생물학적 분석, 그리고 표현형 검정을 통해 전혀 변이가 없음을 확인하였다. 따라서 본 연구의 결과는 배 발생세포 배양을 통한 대량 자구 증식 시스템은 오리엔탈 나리를 비롯한 다양한 나리의 대량증식에 적용될 수 있음을 확인하였으며, 이를 통해 국내 희귀 자생 나리 및 국내 육성 품종의 대량생산과 수출용 나리의 구근 자급화 사업에 크게 기여할 것으로 기대된다.

3) 체세포배 유래 자구의 바이러스 이병성 조사

CMV와 LSV 바이러스의 경우 복합 감염에 의해 오리엔탈 나리의 절화 품질을 떨어지게 하는 주요 바이러스로 종구 생산 시 바이러스 감염이 되지 않도록 각별한 주의가 요구된다. 이에 본 연구는 체세포배 세포 유래 자구 생산 시 체세포배 세포와 재분화 된 기내 식물 및 포장재배 자구의 바이러스 이병정도를 ELISA 분석을 통해 판단하였다. 일반적으로 포장재배 되고 있는 오리엔탈 나리 'Casablanca'의 경우 진딧물에 의해 CMV와 LSV 바이러스에 복합 감염되어 있었으며(fig. 19), 체세포배 세포 유래 식물체의 경우 무병주임을 확인할 수 있었다(fig. 20). 체세포배 세포 유래 오리엔탈 나리 'Marco Polo'와 'Casablanca'의 체세포배 세포와 기내 자구 및 포장 양구하고 있는 식물체의 경우 ELISA에 의한 바이러스 검정 시 CMV와 LSV 바이러스에 전혀 이병되어 있지 않았음을 확인할 수 있었다(fig. 21).



Figure 19. An infected by green peach aphid in Oriental lily 'Casablanca'

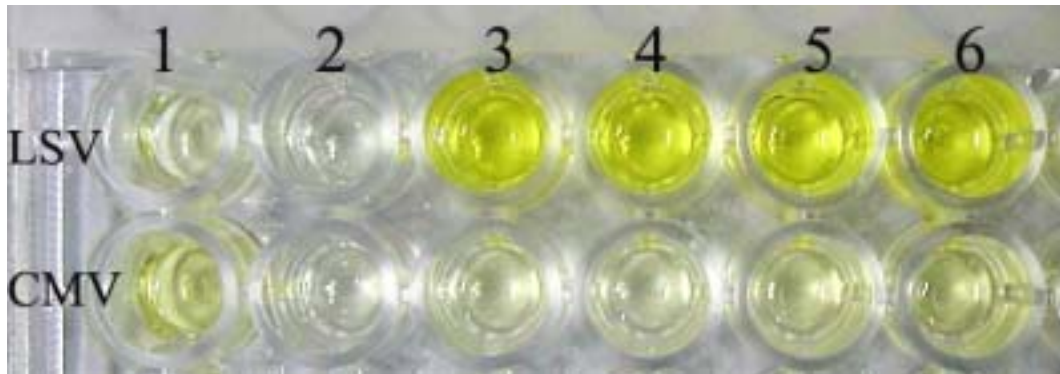


Figure 20. ELISA analysis of Oriental lily 'Casablanca' under field condition. (1)Virus control. (2)Somatic embryogenic cell-driven *in vitro* plant. (3)(4)Leaf of plants infected with green peach aphid. (5)(6)Bulb of plants infected with green peach aphid.

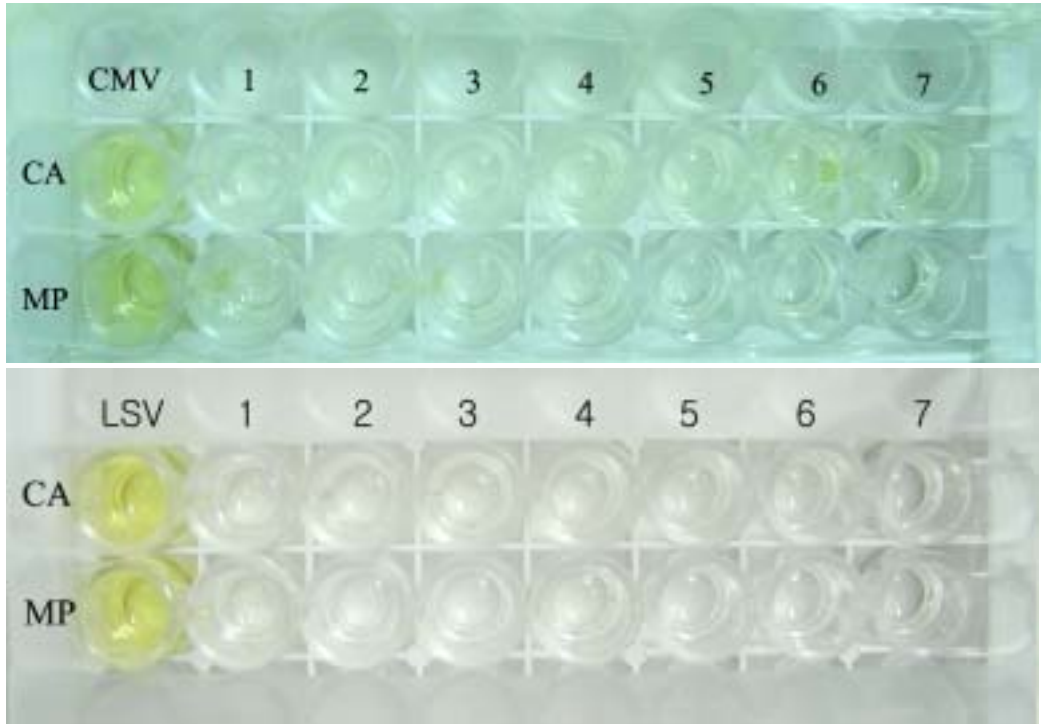


Figure 21. ELISA analysis of somatic embryogenic cell-driven Oriental lily
 CMV: CMV control, LSV: LSV control, CA: 'Casablanca', MP: 'Marco polo'
 (1)(2) Somatic embryogenic cell. (3) Somatic embryogenic cell-driven *in vitro*
 plant. (4)(5) Leaf of somatic embryogenic cell-driven plant in green house.
 (6)(7) Bulb of somatic embryogenic cell-driven plant in green house.

Derks(1995)는 아시아틱 나리 인편 배양의 경우 50-70%의 LSV가 제거되었지만 나팔나리는 LSV의 제거가 어렵다고 하고 나팔나리의 경우에도 경정 배양을 통해서서는 LSV의 무병주를 획득할 수 있다고 하였다. 이와 같이 경정 배양은 인편 배양에 비해 바이러스의 제거 정도가 높다. 경정 분열 조직에는 유관속계가 없기 때문에 유관속계를 통한 바이러스의 이동 속도보다 세포분열 속도가 빨라 바이러스의 이동이 어렵거나, 이 조직의 세포는 대사 활성이 커 바이러스의 복제가 불가능하게 되거나, 바이러스 불활성화계가 활발하여 감염되지 않거나, 내생 옥신의 함량이 높아 바이러스의 증식이 억제되기 때문으로 그 이유를 추정하고 있다(Chang과 Kim, 1996). 그러나 경정 분열 조직에서도 바이러스의 존재가 확인되고 있고(Walkey와 Webb, 1978), 나리에서도 보고 된 바 있어(Chang 등, 1987) 바이러스 무병원 원종의 선발을 위해서는 바이러스 감염 여부를 철저히 확인할 필요가 있을 것으로 판단된다.

배 발생 세포 조직은 정단 분열 조직과 매우 흡사한 특성을 가지고 있으므로 배 발생 세포 배양에 의한 바이러스의 제거 메커니즘 또한 이러한 관점에서 이해 될 수 있다. 즉 배 발생 세포조직에는 유관속계가 없고 세포와 세포 사이의 결속력이 일반 조직에 비하여 약할 뿐만 아니라 배 발생 세포 유도 시나 계대 배양 시에 첨가되는 생장조절물질이 바이러스의 복제를 억제하고, 배 발생 세포 피의 조직 분열이 바이러스의 복제 속도를 증가하여 배 발생 세포 조직 내에는 바이러스의 밀도가 점진적으로 감소되는 한편 국부적으로는 바이러스 미감염 세포만의 증식이 계속되므로 궁극적으로는 세포내의 바이러스가 소멸되는 것으로 추정된다(박 등, 2003). 실제 나리의 캘러스를 수 차례 계대 배양할 경우 CMV의 농도가 낮아지는 한편 기내에서 장기간 배양된 배양체에서도 바이러스의 농도가 낮아졌다(Mori와 Hosokawa, 1977). 따라서 체세포배 발생 세포를 이용한 오리엔탈 나리의 기내 종구 생산은 기존의 생장점 배양을 통한 인편 배양법에 비해 무병 우량 종구 생산에 보다 효율적인 것으로 판단되었다.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구 개발 목표 및 달성도

연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
기내 자구 대량증식 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 주요 오리엔탈 나리 품종의 배발생 세포 유도 조건 <ul style="list-style-type: none"> - 오리엔탈 나리 5품종 및 국내 육성 신품종 나리의 배발생 캘러스 유도 - 품종별 auxin 최소 요구도 조사 ○ 배발생 세포 급속 증식 조건 및 시스템 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 품종별 생물반응기 배양 - 생물반응기를 이용한 배양 조건 최적화 ○ 식물체 재분화 및 기내 소자구 대량생산 <ul style="list-style-type: none"> - 품종별 기내 소자구 대량생산 (전체 50만구) - 자구 형성 조건 최적화 전배양, 식물체 재분화 조건 식물체의 자구 형성 및 비대 ○ 체세포 변이 최소화 조건 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 배양 조건별 변이체 발생 정도 조사 ○ 자구의 바이러스 이병성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 배양 단계별 이병성 조사 	<p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p> <p>100%</p>
체세포배 유래 개화구의 생산성 검정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개화구의 절화 특성 <ul style="list-style-type: none"> - 양구된 체세포배 유래 구근을 이용한 재배시험식물의 성장 및 개화 형태 변이 발생 정도 절화의 상품성 	100%

2. 관련 분야에의 대외적 기여도

가. 기술적 측면

- 본 연구진의 기술은 국내외 기존 조직배양 기술과는 달리 배발생 세포를 유도하여 이용하는 새로운 개념이며, 기술을 최적화하고 변이발생율을 최소화시킨다면 이미 국내에 도입된 외국 나리 품종 외에 국내에서 육종된 우수 오리엔탈 나리 품종의 산업적 대량생산이 가능하다. 또한 소형 생물반응기를 이용한 각 품종별 배발생 세포를 유도 급속 증식 시켜, 재분화를 통해 기내 자구를 대량 생산함으로써 다품종 대량생산이 가능함.
- 화란에서도 최근 VCI사(Vitro Center International)가 체세포배 발생 캘러스를 이용한 나리 증식에 성공하는 등 체세포배를 활용한 종묘 생산을 지향하고 있지만 오리엔탈 나리의 경우 그 진전이 더더 우리의 연구 개발 노력이 대외적으로 기술적 우위를 차지할 수 있음.
- 우량 구근을 저가로 생산 보급하면 국내 절화농가는 절화생산에 전념할 수 있으며, 아울러 구근 생산 전문업체의 출현을 통하여 종구를 국제시장에 공급하는 종묘 생산형 선진화훼농업을 추구할 수 있음.
- 나리 이외의 구근 화훼작물의 우량 조직배양묘 생산 시 본 기술을 응용함으로써 세계적으로 다양한 구근 화훼종묘 생산국으로써의 자리매김을 할 수 있는 계기가 될 수 있음.

나. 경제·산업적 측면

- 본 과제의 완료와 활용에 따라 국내 품종의 조기 활용이 가능하며, 주요 구근의 자급을 통하여 수백만불에 달하는 수입구근을 대체할 수 있으며, 외국 품종의 경우 라이선스 생산방식을 통한 나리 종구 수출 모색도 가능할 것임.
- 절화농가에 저렴하고 우량한 국산 구근을 안정적으로 공급함으로써 농가에서는 절화에만 전념하여 상품품의 절화를 생산할 수 있으며 2차구근을 양성하는 노력을 경감할 수 있음.

- 생명공학적 종묘생산 기술이 오리엔탈 나리류에서 확립되면 이같은 생산 개념이 다른 작물로 파급되어 원예산업에 길항적인 영향을 미칠 수 있으며, 국내 육성 신품종의 증식 및 보급에 기여하여 품종 육성 노력을 활성화하고, 나아가 세계시장에 국내 육성 품종을 포함한 우수 종묘를 중국, 일본, 유럽 등에 공급하는 기술 지향적 종묘 생산 농업을 꾀할 수 있으며,
- 전문화한 종묘 전문 벤처회사 및 전업농가를 양성함으로써 농업이 21세기 생명산업의 주역이라는 진취적 분위기를 농민은 물론 전 국민에게 주지시키는데 일조할 것임.

제5장 연구개발결과의 활용계획

- 특허 출원
 - 나리류 배발생 세포유도 및 재분화 배양을 통한 기내자구 대량 생산 기술
 - 기내 자구 및 개화구 양구 기술

- 백합시험장 또는 산업체 기술 지원
 - 오리엔탈 나리 체세포배 발생 세포 배양 및 기내 자구 생산 기술
 - 기내 소자구 정밀 양액 재배 양구 기술

- 산업화 지원
 - 오리엔탈 나리 체세포배 배양 및 종묘생산 바이오벤처 창업 지원
 - 종구 생산 전문 농가 또는 영농법인 지원
 - 태안농업기술센터와 태안백합시험장을 중심으로 한 지역에서 조직배양 우량 종구 생산 체계 활성화 및 나리 종구 자급화 사업의 현실화

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 나리류의 기내 대량 생산을 위한 기술 개발

○ 나리의 몇 가지 다른 부위의 절편체를 이용하여 다양한 성장조절제 조합을 통해 부정아 재분화 조건에 대해 보고함. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (74) 37-44, 2003.

○ 생물반응기 배양을 이용하여 오리엔탈 나리 자구 대량 생산 가능성 보고. *Scientia Horticulturae* (97) 41-48, 2003

○ 몇 가지 오리엔탈 나리에서 원형질체 분리 및 기내 배양을 통해 세포배양에서 재분화된 식물에서 정상적으로 개화하였음을 보고 하였다. 따라서 체세포배 발생 Callus를 이용하여 대량 생산된 나리 종구에서 변이체 발생 문제가 거의 없음을 시사하였으며, 안정적인 우량 수출용 오리엔탈 나리 종구의 산업적 대량생산의 가능성을 제시함. *Planta* (215) 880-884, 2002

○ 생물반응기 배양 시스템을 이용하여 원예 및 약용 식물의 산업적 대량 생산이 가능함을 보고함. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (81) 287-300, 2005.

2. 나리류의 체세포배 발생 Callus 유도 및 재분화

○ 다양한 자생 나리류의 유전자원의 초저온 보관유지를 위해 캘러스 유도 조건 및 재분화 정도에 관하여 연구 보고함으로써, 보호식물인 국내 자생나리의 유전자원 보존 및 증식에 적용할 수 있는 기초 자료로 이용할 수 있음. *Acta Hort* (560) 153-155, 2001

○ 희귀식물인 점박이나리(오리엔탈나리 자생종)의 유전자원 보존을 위하여 체세포배 발생 Callus 유도 및 식물체 재분화에 대해 연구 보고함으로써 다양한 수출용 오리엔탈 나리 및 국내 육성된 신품종의 체세포배 발생 Callus 유도 및 증식에 적용할 수 있는 기초 자료로 다양하게 이용할 수 있음. *Bot. Bull. Acad. Sin.* (41):139-142, 2000

3. 나리류의 형질전환체 식물 유도

○ 오리엔탈 나리는 바이러스감염에 약하고, 개화구 생산 재배 기간이 길어 바이러스 저항성 형질전환 식물체가 절실히 요구된다. Hoshi(2004)등은 오리엔탈나리의 형질전환식물체 유도를 위한 형질전환 소재로써 체세포 발생 Callus를 유도하였으며 이를 이용하여 안정적인 형질전환 시스템을 완성하였다. 따라서 본 연구결과 얻어진 다양한 오리엔탈나리 품종별 체세포배 발생 Callus를 형질전환 도구로 이용하여 한 자구 대량증식 시스템 기술을 다양한 오리엔탈나리 품종에 접목함으로써 경제적 가치가 높은 우량 종구생산이 가능할 것으로 사료된다.

제7장 참고문헌

- 김의영, 최정두, 박경일, 변미순, 김규원. 1999. 백합 소인편 절편체로부터의 Multiple Shoot 유도를 통한 기내 증식속도 향상. 한국원예학회지. 40(4):459-462.
- 박경일, 김규원. 2003. 캘러스 배양에 의한 오리엔탈 나리의 LSV 무병주 획득. 한국원예학회지. 44:786-790.
- 박경일, 최정두, 변미순, 최종진, 권경학, 김규원. 2000. 오리엔탈 백합에서의 캘러스 유도 및 증식. 한국원예학회지. 41:641-646.
- 박경일, 최정두, 엄선정, 김규원. 2002. 오리엔탈 나리 'Casa Blanca' 의 캘러스 증식 및 식물체 재생에 미치는 MS 배지, 질소원, 배양온도 및 일장의 영향. 한국원예학회지. 43:628-632.
- 박경일, 최정두, 엄선정, 김규원. 2003. 오리엔탈 나리 '카사블랑카'의 캘러스 증식 및 캘러스로부터의 부정아 유도에 미치는 자당과 생장조절물질 농도의 영향. 한국원예학회지. 44:986-990.
- 백기엽. 2001, 나리류의 대량 생산을 위한 생물반응기의 pilot system 개발과 산업화. 농림부농림기술관리센터.
- 안민실, 임희춘, 서상영, 박숙현. 1998. 백합기내배양에 관한 연구; 휴면기간 단축과 구비대를 위한 배양 조건 구명. 전라북도농촌진흥원. 499-505.
- 안민실, 임희춘, 진성계. 1997. 백합기내배양에 관한 연구; 첨가물질이 백합 품종별 기내 구비대에 미치는 영향. 전라북도농촌진흥원. 414-420.
- 정향영, 성문석, 이정, 유창재. 1995. 생장조정제, 저온처리 및 광이 중나리와 카사블랑카의 기내 구비대에 미치는 영향. 농업과학논문집. 37(1):384-388.
- 정혁, 박노복, 서정근. 2001. 백합종구 대량생산 및 실용화 기술개발. 농림부

한봉희, 예병우, 구대회, 고재영. 1999. 저반부가 비대된 *Lilium* Oriental Hybrid 'Casa Blanca' 의 자구 절편체로부터 자구의 형성 및 비대. 한국원예학회지. 40:747-750.

한봉희, 예병우, 구대회, 고재영. 1999a. 나리 'Casa Blanca'의 인편배양에서 유기한 저반부로부터 자구의 형성과 증식에 미치는 성장조절제와 광의 영향. 한국원예학회지. 40:463-466.

한봉희, 예병우, 구대회. 2001. 생물반응기에서 저반부가 비대된 자구 절편체에 의한 오리엔탈 나리 'Casa Blanca'의 대량증식. 한국원예학회지. 28:135-140.

한봉희, 예병우, 박천호. 2000. 나리 'Gelria'의 기내인편에서 유도된 callus 배양을 통한 자구의 재분화. 식물조직배양학회지. 27(6)447-451.

한영희, 소호섭, 황철호. 2000. 액체배양의 의한 나리종구 대량생산 방법 구명.

황혜연, 이은경, 이영복. 2000. 액체 진양배양에 의한 나팔나리 소인경구의 대량 증식. 식물조직배양학회지. 27(1):25-29.

Tribulato, A., P.C. Remotti, H.J.M. Loffler and J.M. van Tuyl. 1997. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Lilium longiflorum* Thunb. Plant Cell Reports. 17(2):113-118.

Chen, C., C.T. Chen, Y.C. Tsai and W.C. Chang. 2000. A tissue culture protocol for propagation of a rare plant, *Lilium speciosum* Thunb. var. *gloriosoides* Baker. Bot. Bull. Acad. Sin. 41:139-142.

Arzate-Fernandez, A. -M., T. Nakazaki, Y. Okumoto and T. Tanisaka. 1997. Efficient callus induction and plant regeneration from filaments with anther in lily (*Lilium longiflorum* Thunb.). Plant Cell Reports. 16:836-840.

Singh Yadav, J. and M. Venkat Rajam. 1998. Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. Plant Physiology. 116:617-625.

- Nhut D. T., B. van Le, M. Tanaka and K.T. Thanh van. 2001. Shoot induction and plant regeneration from receptacle tissues of *Lilium longiflorum*. 87:131-138.
- Xu, P.S., Niimi, Y., Araki, H. 2000. Production of virus-free bulblets from callus induced from scale of *Lilium longiflorum* 'Georgia' (in Japanese with English summary). J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 69:97-102.
- Yamagishi, M. 1995. Detection of section-specific random amplified polymorphic DNA(RAPD) markers in *Lilium*. Theor. Appl. Genet. 91:830-835.
- Yamagishi, M. 1995. Nodular callus induction and bulblet regeneration from anther tissue of *Lilium longiflorum*. Bulletin of RIAR, Ishikawa Agricultural College; No. 4, pp.52-59.
- Yu, W.C., Joyce, P.J., Cameron, D.C., McCown, B.H., 2000. Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. Plant Cell Rep. 19:407-413.
- Zuker, A., Chang, P.L., Ahroni, A., Cheah, K., Woodson, R., Bressan, R., Watad, A.A., Hasegawa, P.M. 1995. Transformation of carnation by microprojectile bombardment. Scientia Hort. 64:177-185.
- Watad, A.A., Yun, D.J., Matsumoto, T., Niu, X., Wu, Y., Kononowicz, A.K., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. 1998. Microprojectile bombardment-mediated transformation of *Lilium longiflorum*. Plant Cell Rep. 17:262-267.
- Tribulato, A., Remotti, P.C., Loffler, H.J.M., van Tuyl, J.M. 1997. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Lilium longiflorum* Thunb. Plant. Cell. Rep. 17:113-118.
- Sugiura, H., Agong, S.G., Enami, A., Kaneko, H., Honma, T. 2000. Comparison

- between embryoid and shoot primordia methods of plantlet production for 'Asiatic Hybrid Lily' and 'Oriental Hybrid Lily'. African Crop Science Journal. 8:117-127.
- Son, S.H., Choi, S.M., Yun, S.R., Kwon, U.W., Lee, Y.H., Paek, K.Y., 1999. Large scale culture of plant cell and tissue by bioreactor system. J. Plant Biotechnol. 1:1-7.
- Seon, J.H., Kim, Y.S., Son, S.H., Paek, K.Y., 2000. The fed-batch culture system using bioreactor for the bulblets production of ornamental lilies. Acta Hort. 520:53-59.
- Park, S.Y., Kim, S.D., Kyun, S.S., Lee, C.H., Paek, K.Y. 1997 Several factors on bulblets regeneration from callus culture in *Lilium longiflorum* 'Geleia'. Kor J. Plant Tissue Cult. 24:183-188.
- Paek, K.Y., Hahn, E.J., Son, S.H. 2001. Application of bioreactors for large scale micropropagation system of plants, In vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 37:284-292.
- Niimi, Y., Han, D.S., Fujisaki, M. 2001. Production of virus-free plantlets by nather culture of *Lilium* × 'Enchantment'. Scientia Hort 90:325-334.
- Lim, S., Seon, J.H., Paek, K.Y., Son, S.H., Han, B.H., 1998. Development of pilot scale process for mass production of *Lilium* bulblets in vitro. Acta Hort. 461:237-241.
- Lipsky, A., Cohen, A., Gaba, V., Kamo, K., Gera, A., Watad, A. 2002. Transformation of *Lilium longiflorum* plants for cucumber mosaic virus resistance by particle bombardment. Acta Hort. 568:209-214.
- Hoshi, Y., Kondo, M., Mori, S., Adachi, Y., Nakano, M., Kobayashi, H. 2004. Production of transgenic lily plants by Agrobacterium-mediated transformation. Plant Cell Rep. 22:359-364.

- Godo, T. and Masahiro, Mii. 2001. In vitro germplasm preservation of lily species utilizing callus cultures at low temperature. *Acta Hort.* 560:153-155.
- Lian, M.L., D. Chakrabarty and K.Y. Paek. 2003. G꺽소 of *Lilium Oriental* Hybrid 'Casablanca' bulblet using bioreactor culture. *Scientia Horticulturae* 97:41-48.
- Horita, M., H. Morohashi, and F. Komai. 2002. Regeneration of flowering plants from difficile lily protoplasts by means of a nurse culture. *Planta*. 215:880-884.
- Bacchetta, L., P.C. Remotti, C. Bernardini, and F. Saccardo. 2003. Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of *Lilium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74:37-44.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구개발결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.