

## 주목의 줄기절간 조직배양에 의한 급속 대량증식

선 정 훈  
태평양기술연구원

### Rapid Micropropagation by Stem Node Culture of Japanese Yew

Jeong Hoon SEON

Pacific R&D Center, Yongin-Kun, Kyunggi-Do, 449-900

The effect of plant growth regulators on proliferation of shoot from stem node culture of Japanese yew (*Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.) was studied using Quoirin and Lepoivre (1977) medium. Among the cytokinin tested, BAP, kinetin, and thidiazuron at various concentrations had no effect on shoot multiplication. However, when zeatin at  $5 \times 10^{-5}$  M was added to the medium, an average of 6 shoots were regenerated per explant after 8 weeks of culture. The ratio of rooting *ex vitro* was remarkably increased up to 34% by dipping the basal end in 0.5 to 1.0% IBA on talc compared with 3% *in vitro* rooting. Rooted plantlets were acclimated in greenhouse conditions for one month and successfully transplanted to the field.

**Key words:** *ex vitro* rooting, shoot proliferation, stem node culture, *Taxus cuspidata*, yew tree

우리 나라에 자생하고 있는 주목은 해발 700에서 2500 m 에 이르는 고산지대에 주로 분포하고 있는 상록침엽교목으로서, 100년 이상 된 나무의 경우 수고가 약 15 m, 흉고직경이 약 80 cm에 달한다. 항암제로서 널리 알려진 택솔(taxol)이라는 물질이 주목의 여러 부위에서 추출된 바 있으나(Slichenmyer and Von Hoff, 1991) 아직까지 수요에 비해 공급량이 턱없이 부족한 상황에 있다(Cragg et al., 1993). 고부가가치를 지니는 항암성분인 택솔을 생산하기 위하여 선진국뿐만 아니라 최근 우리 나라에서도 집중적인 연구가 활발히 이루어지고 있다. 알려진 바에 의하면 택솔은 주목의 껍질과 잎 등으로부터 직접 추출하거나(Edgington, 1991) 화학적인 합성법(Winkler et al., 1993) 혹은 세포배양에 의한 방법(Fett-Neto et al., 1993) 등에 의하여 생산이 가능하다. 생체 시료로부터 택솔을 추출하는 방법(Chen and Kingston, 1994)은 가장 확실하고도 안정적이지만, 주목의 생육특성을 고려할 때 환경적인 파괴없이 대규모의 시료를 지속적으로 공급 하는 데에는 문제가 있는 것 같다. 택솔의 유도체를 이용한 반합성법은 생체추출한 물질의 효율을 최대 높이고, 나아가서는 더욱 효과적인 차세대 항암물질을 개발할 수 있다는 장점을 지니고 있으나(Nicolaou et al., 1994) 생체추출에서 야기된 몇가지 문제점을 여전히 지니고 있다. 전합

성의 경우 택솔의 합성에 성공한 사례가 있으나(Falm, 1994) 복잡한 화학구조를 고려할 때 상업성을 지니기는 어려울 것으로 생각된다. 반면 반합성의 경우 생체추출에서 야기된 몇몇 문제점을 여전히 안고 있다.

따라서 단계적으로 대규모 조림이 가능할 경우 이로부터 재회수하여 이용할 수 있는 잎이나 잔가지로부터의 택솔 생산법은 생체추출의 문제점을 어느 정도 극복할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 주목의 경우 종실변이뿐만 아니라 택솔 생산능력에 있어서의 개체변이도 크게 나타남으로 환경적인 요인은 동일하게 만들기가 다소 어려우나 유전적인 배경은 클론증식을 통하여 가능하다. 이러한 점 등을 고려해볼 때 영양번식에 의한 급속 대량증식법의 개발은 절실한 문제이지만 아직까지 이에 대한 체계적인 연구는 거의 이루어지지 않은 실정이다. 또한 주목은 침엽수에서 일반적으로 나타나는 것처럼 기내배양을 통한 영양번식이 어렵고, 삼목도 대체로 까다로우며, 종자번식은 가능하지만 약 2년간의 노천매장을 하여야 발아를 하는 특성을 가지고 있다. 따라서 본 연구는 택솔생산 능력이 높은 것으로 추정되는 주목의 절간조직을 배양하여 다량의 줄기를 유도한 뒤 이를 포장에 대규모로 식재하기 위한 기초자료를 얻기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

우리 나라에 자생하고 있는 주목(*Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.) 중에서 잎과 꺾질에 택솔함량이 비교적 높은 선발목을 선정 한 후, 6월경에 1년생 가지를 채취하여 3-4 cm 크기로 조제한 다음 이를 배양을 위한 시료로 사용하였다. 소독은 Tween-20이 한 두방울 함유된 70% 에탄올 용액에 약 50 초간 흔들면서 일차 표면 소독을 실시한 다음, 표면소독의 효율을 높이기 위하여 50%로 희석된 유한락스 용액에 수분간 침지한 후 멸균수로 4-5 차례 헹구어준 뒤, 소독제에 의하여 해를 입은 줄기의 말단부위를 해부용 칼로 제거하였다. 이 때 자른면의 산화방지를 위하여 멸균수에 침지된 상태에서 잘라 주었다. 표면소독이 된 절간조직은 시험관에 10 ml의 배지를 분주하여 치상하였으며, 초대배양시에는 식물생장조절물질이 함유되지 않은 LP(Quoirin and Lepoivre, 1977) 배지에서 2주간 배양한 다음, 줄기의 대량증식에 관여하는 요인으로서 4가지 종류의 사이토키닌(BAP, kinetin, zeatin, thidiazuron)이 Table 1에 나타난 농도로 처리된 LP배지를 이용하였다. 배양체는 약 2800 lx의 형광하에서 1일 16 시간의 조명하에 두었다. 실험결과는 배양한지 8주 후에 수집하였으며, 줄기 절편으로부터 유도된 평균 줄기의 수는 크기가 0.5 cm 이상인 것만 계산하였다.

## 결과 및 고찰

침엽수의 조직배양에서 흔히 보여지는 것처럼, 주목의 줄기절편을 배양하였을 경우 3-5일 후에 폴리페놀로 추정되는 물질이 배지 밖으로 상당량 분비되었다. 목본식물의 조직배양시 문제가 되는 페놀류의 배지내 분비는 대체로 모수 수량이 어리거나, 상대적으로 하단부의 눈(芽)을 적출하여 시료로 사용하였을 때 일반적으로 나타나는 현상이며, 이를 극복하기 위해서는 멸균수나 산화방지제가 함유된 용액내에서 시료를 조제하거나, 배양배지에 산화방지제를 첨가하기도 하며, 몇몇 수종에서는 배양 후 일정기간을 암상태에 두는 방법을 이용하고 있으나, 주목의 경우 페놀성분이 분비되는 시료를 새로운 배지에 지속적으로 계대배양하는 방법이 가장 간단하고 효과적인 것으로 나타났다. 야외시료를 이용하였을 때 세균과 곰팡이 오염 및 배양체에 함유되어 있는 내생호르몬 영향을 피하기 위해 식물생장조절물질이 함유되지 않은 LP 기본배지에 2주간 배양한 다음 균일한 시료를 선별하여 식물생장조절물질이 함유된 배지에 배양함으로써 전술한 여러 가지 문제점을 부분적으로 해결할 수 있었다. 주목의 경우 식물생장조절물질이 함유되지 않은 무처리구에서도 배양체 기저부에서 약 10% 수준으로 캘러스를 형성하였으며, 사이토키닌을 처리하였을 때에도 동일한 현상이 종종 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 일반적으

**Table 1.** Responses of cultured stem node of Japanese yew (*Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.) on LP medium with different plant growth regulators after 8 weeks<sup>a</sup>.

BAP (M)	Kinetin (M)	TDZ (M)	Zeatin (M)	Callus at the base (%)	No. of multiplied shoots
0	0	0	0	8.2	1.0 ± 0.2 <sup>c</sup>
5 × 10 <sup>-8</sup>	0	0	0	0.0	1.6 ± 0.1
5 × 10 <sup>-7</sup>	0	0	0	12.1	1.3 ± 0.1
5 × 10 <sup>-6</sup>	0	0	0	6.3	1.0 ± 0.0
5 × 10 <sup>-5</sup>	0	0	0	- <sup>b</sup>	1.0 ± 0.0
0	5 × 10 <sup>-8</sup>	0	0	25.2	1.0 ± 0.0
0	5 × 10 <sup>-7</sup>	0	0	16.4	1.2 ± 0.1
0	5 × 10 <sup>-6</sup>	0	0	6.6	2.1 ± 0.4
0	5 × 10 <sup>-5</sup>	0	0	5.2	1.7 ± 0.3
0	0	5 × 10 <sup>-10</sup>	0	6.9	2.3 ± 0.2
0	0	5 × 10 <sup>-9</sup>	0	10.3	1.1 ± 0.3
0	0	5 × 10 <sup>-8</sup>	0	6.3	2.3 ± 0.4
0	0	5 × 10 <sup>-7</sup>	0	4.1	1.2 ± 0.1
0	0	0	5 × 10 <sup>-8</sup>	3.7	3.5 ± 0.7
0	0	0	5 × 10 <sup>-7</sup>	23.0	2.6 ± 1.2
0	0	0	5 × 10 <sup>-6</sup>	32.2	5.2 ± 2.3
0	0	0	5 × 10 <sup>-5</sup>	11.1	6.2 ± 2.4
0	0	0	5 × 10 <sup>-4</sup>	12.5	4.2 ± 1.8

<sup>a</sup>Data were collected from five test tubes each in three different experiments.

<sup>b</sup>- signs mean that calculations could not be made due to contaminations and/or death.

<sup>c</sup>± mean standard deviation.

로 다경줄기 유도에 많이 사용되는 BAP나 kinetin 및 thidiazuron은 다소의 차이는 있으나 기내줄기의 대량증식에서 부적합한 것으로 나타났다. 이와는 대조적으로 zeatin의 경우 비교적 고농도를 처리하였을 경우 다경줄기가 형성되는 것을 관찰할 수 있었으며, 특히 5 × 10<sup>-5</sup> M 농도에서 배양절편당 약 6개 이상의 다경줄기 형성물을 보였으며 (Table 1), 일부 시료에서는 12개 이상의 다경줄기가 유도되는 경우도 있었다(Fig. 1-1). 그러나 주목의 줄기절편조직을 배양하였을 경우, 시료로부터 다경줄기가 발생하는 대신 절간조직에 붙어 있는 눈만 신장하는 현상이 관찰되었는데 이는 한나무에서 유래된 시료에서도 사용절편 부위에 따라 생리적으로 상이함을 알 수 있었다. 배양 8주 후에 유도된 다경줄기의 경우 몇 개의 식물체는 2-3 cm까지 신장이 되어 있으나 대부분은 1 cm 미만의 성장속도를 보였다. 이중 줄기의 크기가 2 cm 이상인 식물체는 배양된 원줄기로부터 분리하여 식물생장조절물질이 함유되지 않은 LP기본배지에 계대배양하였을 때 다소 빠른 생육을 보여 8주 후에는 7-8 cm까지 자라는 것을 관찰할 수 있었으며, 이들 줄기를 다시 2 cm 크기로 절단하여 배양하는 기내삽목 방법도 가능하였다(Fig. 1-2). 1 cm 미만의 다경줄기는 이를 원줄기로부터 분리하여 배양할 경우 대부분 배양 중에 고사하므로, 원줄기에 부착된 상태로 계대배양을 하면서 2 cm 이상 자랐을

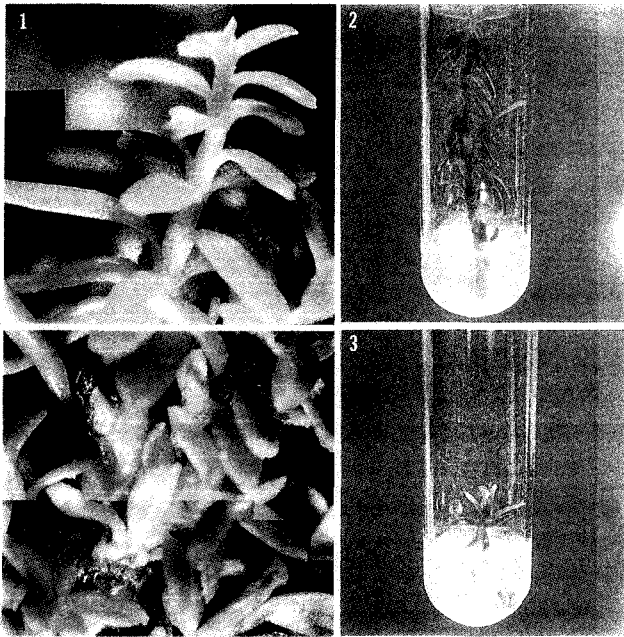


Figure 1. Micropropagation by stem node culture of Japanese yew (*Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.). (1) Multiple shoot initiation from nodal explant on LP medium with zeatin,  $5 \times 10^{-5}$  M (after eight weeks); (2) Elongation of the multiplied shoot on LP medium without plant growth regulator; (3) Rooting from the cut shoots.

때 분리배양하는 것이 바람직한 것으로 나타났다. 분화된 식물체의 경우 0.6% agar가 함유된 동일배지에서 발근은 가능하였으나 기내발근율은 3% 이내로 저조하였다(Fig. 1-3). 이러한 문제점을 극복하기 위하여 기외발근을 유도하였으며, 이 때 talc에 0.5% IBA를 잘 섞은 다음 신초의 기저부에 살짝 찍어 발라줌으로써 약 35%까지 발근율을 높일 수 있었다. 기외발근시에는 peat plug system (Poly Terra Peat Plugs: M40045 Techniculture, Co., Salinas, CA)을 사용하는 경우가 인공토를 이용하는 것보다 효율면에서 훨씬 좋게 나타났으며, 기외이식 후 약 한달간은 상대습도가 95% 이상 조절될 수 있는 배양상에서 식물체를 유지시켰다. 이들 기내 혹은 기외에서 발근된 묘목을 야외에 식재하였을 경우에 정상적인 생육을 보임으로써 조직배양에 의한 주목의 대량증식 및 이를 야외에 대규모 식재할 수 있는 가능성은 충분이 있는 것으로 판명되었다. 따라서 앞으로는 주목의 품종별 또는 품종내 택솔함량이 높은 개체를 선발한 다음 그로부터 대량증식 시킬 수 있는 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각되며, 이와 함께 대규모 식재시 주목 biomass 생산과 상업화에 관련된 여러 가지 기술적인 검토가 함께 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 적 요

주목의 줄기절간 조직배양에 의한 다경줄기 유도를 위해 식물생장조절물질 중 4가지 형태의 사이토키닌 효과를 조사한 바, BAP, kinetin, 및 thidiazuron의 경우 거의 반응을 보이지 않았으나, zeatin을  $5 \times 10^{-5}$  M 처리하였을 경우 평균 6개 이상의 다경줄기를 얻을 수 있었으며, 배양시료에 따라서는 12개 이상의 다경을 형성하는 경우도 관찰되었다. 유도된 다경줄기를 지속적으로 계대배양하여 줄기를 신장시킨 후 이로부터 2 cm 크기의 기내삽목도 가능하였다. 기내발근율은 LP기본배지를 이용하는 것이 비교적 양호하였으나 효율은 3%에 지나지 않았다. 기외발근의 경우, 약 34%까지 발근율을 올릴 수 있었으며 포지에 이식시킨 조직배양묘는 1년 이상 정상적인 생육을 보이고 있음이 관찰되었다.

## 인용 문헌

- Chen R, Kingston DGI (1994) Isolation and structure elucidation of new taxoids from *Taxus brevifolia*. J Nat Product 57: 1017-1021
- Cragg GM, Schepartz SA, Suppness M, Grever M (1993) The taxol supply crisis: new NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anti-cancer and anti-hiv agents. J Nat Product 56: 1657-1668
- Edgington SM (1991) Taxol out of the woods. Bio/Technology 9: 933-938
- Falm F (1994) Race to synthesize taxol ends in a tie. Science 263: 911
- Fett-Neto AG, Melanson SJ, Sakata K, DiCosmo F (1993) Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition modification. Bio/Technology 11: 731-734
- Nicolaou KC, Nantemet PG, Heno U, Guy RK (1994) Novel chemistry of taxol: Retrosynthetic and synthetic studies. J Chem Soc Chem Commun 295-296
- Quoirin M, Lepoivre P (1977) Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp. Acta Horticulturae 78: 437-442
- Slichenmyer WJ, Von Hoff DD (1991) Taxol: a new and effective anti-cancer drug. Anti-Cancer Drugs 2: 519-530
- Winkler JG, Subrahmanyam D, Hsung RP (1993) Studies directed towards the synthesis of taxol: preparation of C-13 oxygenated taxane congeners. Tetrahedron Lett 48: 7049-7056

(1995년 11월 20일 접수)