

구기자나무의 잎과 마디절편체 배양에 의한 식물체 재생

김동찬* · 정해준¹ · 민병훈¹ · 양덕춘²

충남농업기술원 예산국화시험장, ¹배재대학교 원예조경학부, ²한국인삼연초연구원

Plant Regeneration from Leaf and Internode Segment Cultures of Boxthorn (*Lycium chinense* Mill.)

KIM, Dong Chan* · CHUNG, Hae Joon¹ · MIN, Byung Hoon¹ · YANG, Deok Chun²

Chrysanthemum Experiment Station ChungNam Province RDA, Yesan, 340-910, Korea

¹Department of Horticulture, Paichai University, Taejon, 302-735, Korea

²Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345, Korea

ABSTRACT Callus and shoot formation from medicinal crop, *Lycium chinense* Mill. cv. 'Cheongyang', as influenced by various media, explant sources and plant growth regulators were investigated. The rate of shoots formation, number of shoots, and fresh weight of shoots were the best on MS medium followed by B₅, WPH, and SH. Callus induction was more effective in leaf than internode segments, and was the best on MS medium containing 0.5 mg/L NAA with 0.2 mg/L BA. Effects of plant growth regulators in shoot formation were more effective in BA than TDA combined with NAA. Shoot formation from callus induced in leaf and internode segments was the best on MS medium containing 0.01 mg/L NAA with 0.2 mg/L BA.

Key Words: Callus induction, medicinal crop, shoot formation, various media

서 론

Solanaceae의 *Lycium*속은 세계적으로 약 100여 종이 온대, 아열대, 건조지대, 열대지대에 자생하고 있으며, 우리나라 전역과 중국, 일본, 대만 등 동남아시아 지역에 널리 분포하고 있다. 구기자나무는 다년생 낙엽관목으로 수피는 회백색, 키는 1m 내외이고 잎은 장지에 호생하거나 단가지에는 총생하며, 엽형은 난형 또는 장타원형을 띠고 있다. 구기자나무 (*Lycium chinense* Mill.)의 이용 형태로는 부위에 따라 과일을 枸杞子 (lycii fructus), 뿌리 껍질을 地骨皮 (lycii cortex), 잎을 枸杞葉 (lycii folium)이라 구분하며 최근 건강보조식품 또는 기호성 식품 등으로 구기자의 수요량이 증가되고 있다.

약용작물인 구기자나무의 조직배양 연구는 잎, 배축 그리고 경정배양으로 캘러스와 신초를 유도하였으며 (Li and Zhang

1990), 자엽, 생장점, 하배축 배양에서 캘러스 형성률이 각각 18%, 82% 그리고 57%였음을 보고하였다 (Lee et al. 1984). Yakov 등(1990)은 엽절편체로부터 캘러스를 유도하여 TM-4 배지 (Shahin 1984)에 계대배양함으로써 신초를 얻었다. 또한 구기자나무의 잎을 침으로 상처를 낸 뒤 암조건에서 배양하여 배 발생 캘러스를 유도하였고 (Kim et al. 1993), 신초에서 유도된 캘러스를 액체배양하여 고효율의 체세포배를 발생시킨 바 있다 (Liu 1991).

식물의 기관분화에는 오옥신과 사이토키닌의 조합비율이 중요하며 (Skoog and Miller 1957), 동일 품종이라도 배양절편체의 절취 부위에 따라서 전형성능의 발현에 차이가 있다. 본 연구는 육성품종인 '청양'의 기내배양에 적합한 배지와 배양절편체의 종류에 따른 캘러스의 유도 및 신초 분화 조건을 구명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 무균발아

충남농업기술원 청양구기자시험장 품종보존 포장에 식재된 '청양'의 종자를 채취하여 70% 에탄올에 1분, tween 20이 첨가된 1% sodium hypochlorite (NaClO)에 5분간 침지처리한 후 멸균수로 5회 수세하여 표면살균하였다. 무균발아에 사용한 배지는 성장조절제가 들어 있지 않은 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지에 0.7% agar, 3% sucrose를 첨가하였고, pH는 멸균하기 전에 5.8로 조정하였다. 배양조건은 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 광도 2,500 lux, 18/6시간의 광주기로 하였다.

배지 종류별 영향

절편체는 기내과중 8주 후에 발아된 유식물체의 정단 2~5번째 유엽을 0.5 cm × 0.5 cm 크기로 절단하였다. 배지 종류는 0.5 mg/L NAA와 1.5 mg/L BA가 첨가된 MS, WPM (Lloyd and McCown 1981), B₅ (Gamborg et al. 1968) 및 SH (Schenk and Hildebrandt 1972) 배지를 사용하였다. 배양용기는 시험관 (25 × 120 mm)에 10 mL의 배지를 분주하였으며, 4주간 배양한 후 캘러스 생체중, 신초 분화율 그리고 신초 발생수를 조사하였다.

성장조절제의 영향

무균배양 60일 뒤 기내 식물체의 잎과 줄기를 배양재료로 이용하였는데, 잎 절편체는 중앙맥을 중심으로 0.5 cm × 0.5 cm 크기로 하였고, 줄기 절편체는 액아가 포함되지 않은 절간 부위를 0.5 cm 길이로 하였다.

캘러스 유도는 MS 배지에 0.1, 0.5, 1.0 mg/L NAA와 0.2 mg/L BA를 혼용으로 첨가하여 4주간 배양하였다. 신초 분화는 0, 0.01 mg/L NAA와 2,4-D 및 0.2, 0.5 mg/L BA를 각각 조합처리하여 6주간 배양하였다. 캘러스로부터의 재분화는 0, 0.01 mg/L NAA와 0.2, 0.5 mg/L BA 및 TDZ를 각각 조합처리하여 절간절편체에서 얻은 캘러스를 치상하여 6주간 배양한 후 생체중, 신초 분화율 그리고 신초 발생수를 조사하였다.

결과 및 고찰

배지 종류별 영향

배지 종류에 따른 신초 형성률은 MS와 B₅ 배지에서 각각 25.4%와 15.2%로 양호하였으나 SH 배지에서는 전혀 형성되지 않았다 (Table 1). 엽절편체 당 신초 발생수도 MS와 B₅

Table 1. Effects of media on shoot formation, number of shoots, and fresh weight of shoot and callus induced from *in vitro* leaf explant¹ of boxthorn 'Cheongyang'.

Media	Shoot formation (%)	No. of shoots /explant	Frwt ² (mg/explant)
MS	25.4	2.3 ± 0.6	123.2 ± 8.9 ^x
WPM	5.1	1.0 ± 0.0	106.4 ± 7.0
SH	0.0	0	12.4 ± 0.8
B ₅	15.2	1.3 ± 0.3	122.1 ± 6.9

¹Cultured on various media containing 0.5 mg/L NAA and 1.5 mg/L BA for 4 weeks.

²Contained shoot and callus per explant.

^xStandard error.

배지에서 각각 2.3개와 1.3개로 양호하였고 SH 배지에서는 불량하였다. 캘러스의 생체중은 신초 형성률과 신초 발생수와 유사한 결과로 나타나, MS와 B₅ 배지에서 각각 123.2 mg과 122.1 mg으로 가장 양호하였으나, SH 배지에서는 12.4 mg으로 낮았다 (Table 1).

Yakov 등 (1990)은 '영하구기자' (*Lycium barbarum* L.)의 엽절편체를 0.5 mg/L NAA와 1.5 mg/L BA가 첨가된 B₅ 배지에 배양하여 다신초를 얻었다고 하였으나, 본 실험 결과 '청양'의 경우에는 MS 배지에서 절편체당 신초 발생수가 2.3개로 저조하였다.

배지 종류에 따른 신초 분화율의 차이는 배지 속에 함유되어 있는 질소화합물의 차이로 생각되는데, 배지 내 암모니아태 질소와 질산태 질소의 비율은 신초 및 뿌리의 분화와 생육에 중요한 역할을 하며, 암모니아태 질소는 세포생장에 효과적이고 질산태 질소는 배 발생과 기관분화를 촉진시킨다 (George and Sherrington 1984). 본 실험에서도 사용된 배지의 암모니아태 질소와 질산태질소의 함량은 각각 MS 배지가 39.4 mM과 20.61 mM로 총 60.01 mM, B₅ 배지는 24.72 mM과 2.02 mM로 총 26.74 mM, SH 배지는 24.72 mM과 2.6 mM로 총 27.32 mM, 그리고 WPM 배지는 9.7 mM과 4.99 mM로 총 14.69 mM인데, 구기자나무에서도 암모니아태 질소와 질산태질소의 함량에 따라 신초 분화 양상이 다르게 나타난 것으로 생각된다.

성장조절제의 영향

'청양'의 기내엽 절편체는 성장조절제가 첨가되지 않은 처리에서는 캘러스가 전혀 형성되지 않았으나 (Figure 1A), NAA와 BA의 조합처리에서는 캘러스가 모두 발생되었다. 캘러스의 형성은 배양 7일경부터 상처 부위가 팽대하기 시작하여 유백색의 유연한 캘러스가 발생되기 시작하였으나, 배양 기일이 경과할수록 단단한 캘러스로 변하였다. 0.1 mg/L NAA와 0.2 mg/L BA의 조합처리에서는 연녹색의 작은 돌기들이 발생했으며 (Figure 1B), 배지에 첨가된 NAA의 농도가

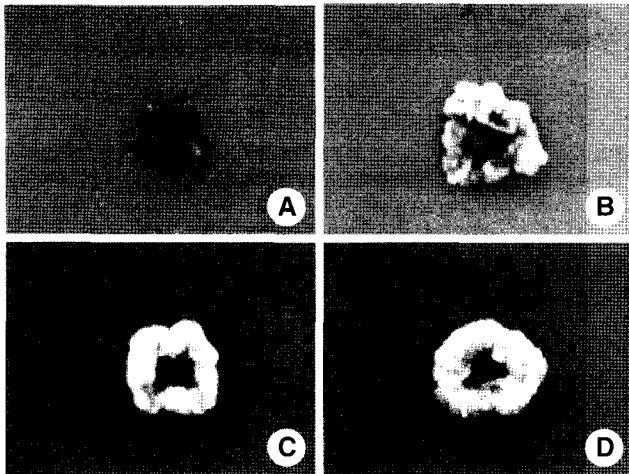


Figure 1. Effects of growth regulators on the callus induction from in vitro leaf explants of boxthorn. Explants were cultured on MS medium supplemented without growth regulators (A), with 0.1 mg/L NAA and 0.2 mg/L BA (B), 0.5 mg/L NAA and 0.2 mg/L BA (C), and 1.0 mg/L NAA and 0.2 mg/L BA (D), respectively, for 4 weeks.

증가할수록 연녹색 캘러스의 표면에 흰 솜털이 많이 발생하였다 (Figure 1C and D).

절편체 배양시 성장조절제가 첨가되지 않은 처리에서는 치상 후 절단면이 약간 팽대된 후 고사하였다 (Figure 2A). NAA와 BA 조합처리에서는 치상 10일 후 절단면에서 연녹색의 유연한 캘러스가 유기되었고 배양기일이 경과할수록 급속히 증식되어 단단한 캘러스로 변화하였다 (Figure 2B and C). 그러나 1.0 mg/L NAA 처리에서는 배양 초기에 연녹색의 캘러스가 형성되었으나, 배양기일이 경과할수록 유백색의 부서지기 쉬운 캘러스로 급속하게 증식되었다 (Figure 2D).

캘러스 유도는 식물의 종류 또는 동일 식물체 내에서도 배양에 이용되는 조직 부위 및 배양조건에 따라 그 양상이 다른 것으로 알려져 있다 (McNicol and Graham 1990; Rai and Chandra 1988). 구기자나무에서도 배양재료에 따라 캘러스의 유도 양상이 다른 것으로 보아 절편체 종류와 배양 목

Table 2. Effects of NAA and BA on fresh weight and growth degree of callus induced from different explants of boxthorn 'Cheongyang' cultured on MS medium for 4 weeks.

Growth regulators (mg/L)		Leaf explant		Internode explant	
NAA	BA	Frwt (mg/explant)	Callus growth ^z	Frwt (mg/explant)	Callus growth
0.1	0.2	289.9 ± 16.3 ^y	++	158.5 ± 16.6	+
0.5	0.2	329.4 ± 26.1	++++	221.4 ± 24.6	+++
1.0	0.2	317.8 ± 22.8	+++	195.9 ± 12.5	++

^z+, poor; ++, moderate; +++, good; +++++, and very good growth.

^yStandard error.

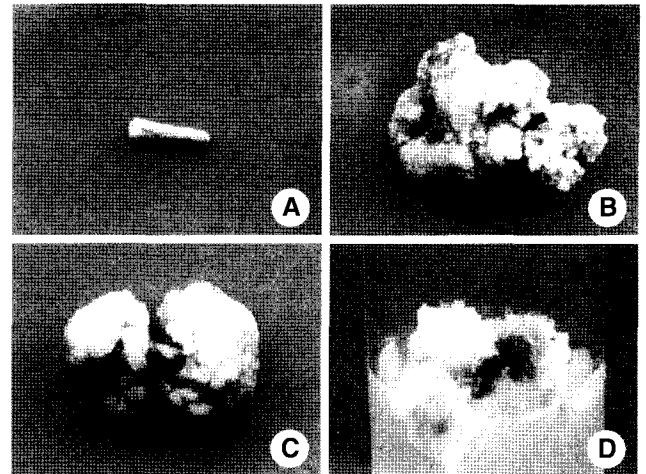


Figure 2. Effects of growth regulators on callus induction from in vitro internode explants of boxthorn. Explants were cultured on MS medium supplemented without growth regulators (A), with 0.2 mg/L BA (B), 0.1 mg/L NAA and 0.2 mg/L BA (C), and 1.0 mg/L NAA (D), respectively, for 4 weeks.

적에 따른 적정 배양조건과 성장조절제의 농도 등을 달리할 필요가 있다고 판단되었다.

엽절편체에서 유도된 캘러스의 생육과 생체중은 0.5 mg/L NAA와 0.2 mg/L BA 조합처리구에서 가장 좋았으며, 액아가 포함되지 않은 절간 절편체의 경우도 캘러스의 생체중은 0.5 mg/L NAA와 0.2 mg/L BA 조합처리구에서 221.4 mg으로 가장 무거웠고 캘러스 생육도 양호하였다 (Table 2). 캘러스 유도를 위한 구기자나무의 배양재료는 절간 절편체보다 엽절편체가 양호하였고, 성장조절제의 농도는 0.5 mg/L NAA와 0.2 mg/L BA 조합처리가 적절하다고 생각되었다. Park 등 (1993)은 침으로 상처를 준 구기자나무의 잎을 암상태에서 배양했을 때 0.05 μM 2,4-D와 0.001 μM BA 조합 처리구에서 캘러스 유기 반응이 가장 양호하였다고 하였으나, 본 실험에서는 0.5 mg/L NAA와 0.2 mg/L BA 조합처리에서 엽조직과 절간절편체에서의 캘러스 유도 반응이 양호하였다. Tao와

Table 3. Effects of growth regulators on shoot formation, number of shoots, and fresh weight of shoot and callus induced from in vitro leaf explant^z of boxthorn 'Cheongyang'.

Growth regulators (mg/L)			Shoot formation (%)	No. of shoots /explant	Frwt (mg/explant)
NAA	2,4-D	BA			
0.00	0.00	0.2	42.80	23.1 ± 4.1 ^y	145.8 ± 16.1
0.00	0.00	0.5	92.30	17.3 ± 5.1	194.6 ± 19.1
0.01	0.00	0.2	87.60	98.9 ± 11.6	471.3 ± 44.9
0.01	0.00	0.5	60.10	74.3 ± 9.6	365.3 ± 43.3
0.00	0.01	0.2	21.90	13.0 ± 1.7	222.5 ± 15.7
0.00	0.01	0.5	57.40	4.5 ± 0.9	260.8 ± 26.4

^zCultured on MS medium containing various plant growth regulators for 6 weeks.

^yStandard error.

Sugiura (1992)도 Japanese persimmon의 배양에서 절편체의 종류와 성장조절제의 농도에 따라 캘러스의 형태에 차이가 있었음을 보고하였는데, 구기자나무에서도 외식체의 종류에 따라 캘러스의 유도 반응이 다르게 나타났다.

엽절편체로부터 직접 신초를 분화시키기 위해 MS배지에 NAA, 2,4-D와 BA를 조합처리하여 6주간 배양한 결과 (Table 3), 신초분화율은 0.2 mg/L와 0.5mg/L BA 단독처리에서는 각각 42.8%와 92.3%로 BA농도가 증가하면 분화율도 증가하였으나, 0.01 mg/L NAA와 0.2 mg/L, 0.5 mg/L BA 조합처리에서는 각각 87.6%와 60.1%의 분화율로 반대의 경향을 보였고, 0.01 mg/L 2,4-D와 0.2 mg/L BA 조합처리에서는 21.9%로 가장 낮았다. 신초발생수는 0.01 mg/L NAA와 0.2 mg/L BA 조합 처리에서는 98.9개로 가장 많았으며 0.01 mg/L 2,4-D와 0.2 mg/L BA 조합처리에서는 13개였고, 0.2 mg/L BA 단독처리에서는 23.1개였다. 또한 생체중의 경우에도 0.01 mg/L NAA와 0.2 mg/L BA 조합처리에서 471.3 mg으로 가장 높았으며, 0.2 mg/L BA 단일처리에서 145.8 mg으로 가장 낮았다. 구기자나무의 신초 분화는 BA 단일처리보다는 NAA와 조합처리하는 것이 신초 발생이 양호하였으며, 2,4-D와의 조합처리에서는 오히려 신초 발생률과 발생수가 모두 저조한 경향을 보였다. Predieri 등 (1989)도 *Malus pumila*의 엽절편 배양에서의 분화율은 NAA 첨가 배지에서는 44%였으나, 2,4-D 첨가 배지에서는 5%로 auxin의 종류에 따라 분화율의 차이가 있었다고 보고한 바 있다.

식물체의 기관분화는 auxin과 cytokinin의 농도 균형에 의해 좌우된다고 보고 (Skoog and Miller 1957)된 이후 이들을 혼용 첨가하여 신초를 유도하는 방법이 많이 연구되고 있다. 일반적으로 신초의 증식은 고농도의 cytokinin과 저농도의

auxin을 혼용 처리하였을 때 월등히 증가하는 것으로 알려져 있는데, Park 등 (1993)도 구기자나무의 잎으로부터 캘러스 유도와 신초를 분화시키기 위해서는 auxin과 cytokinin을 혼용하는 것이 보다 효과적이라고 한 바 있다. 또한 Yakov 등 (1990)도 '영하구기자'의 엽절편 배양시 1.5 mg/L BA와 0.5 mg/L NAA를 조합처리하여 부정아를 유도하였는데, 본 실험에서 사용한 농도는 이보다 낮은 농도였지만 유사한 경향을 보였다.

절간 절편체 유래의 부드럽고 유연한 캘러스로부터 신초발생을 유도하기 위해 0.01 mg/L NAA와 0.2 mg/L BA가 첨가된 MS 배지에 0.5 g 정도의 캘러스를 치상하였다 (Figure 3A). 배양 10일경부터 일부 캘러스에서 작은 돌기 모양의 캘러스가 형성되기 시작한 후 이들 돌기는 부정형의 잎으로 발달하였고 (Figure 3B), 이러한 부정형의 잎들은 배양기간이 경과할수록 부정아의 형태를 보였으며 빠르게 성장하여 (Figure 3C), 배양 후 40일경에는 완전한 잎을 형성하였다 (Figure 3D).

절간 절편체에서 얻은 캘러스를 NAA, BA 그리고 TDZ을 조합 처리한 결과 (Table 4), 신초 형성률은 0.2 mg/L BA 조합처리에서 100%의 분화율을 보였으나, 0.2 mg/L TDZ 조합처리에서는 66.7%로 다소 낮았다. 그러나 0.5 mg/L로 증가된 BA 및 TDZ의 농도에서는 오히려 모두 감소하는 경향을 보였다. 또한 신초 발생은 0.2 mg/L BA 또는 0.2 mg/L TDZ의 조합처리에서 각각 15.7개와 16개가 발생되었다. 한편 생체중은 신초 발생률 및 발생수와는 달리 BA 및 TDZ농도가 0.5 mg/L인 처리에서 0.2 mg/L 처리보다 더 많은 캘러스가 형성되는 경향을 보여 캘러스의 형성이 잘되면 오히려 신초의 발생이 감소되는 경향을 보였다. 캘러스로부터 발생된 신초수는 BA와 TDZ의 영향을 크게 받지 않았으나, 신초 분화율은 TDZ보다 BA 조합처리에서 높은 것으로 보아 재분화에 관여하는 cytokinin류는 TDZ보다 BA가 더 좋을 것으로 판단된다. Park 등 (1993)은 구기자나무의 잎에서 유래된 캘러스의 재분화 실험에서 NAA와 BA가 첨가된 배양에서는 신초가 형성되지 않았다고 보고한 바 있으나, 본 실험에서는 0.01 mg/L NAA와 0.2 mg/L BA 처리에서 외식체 당 15.7개

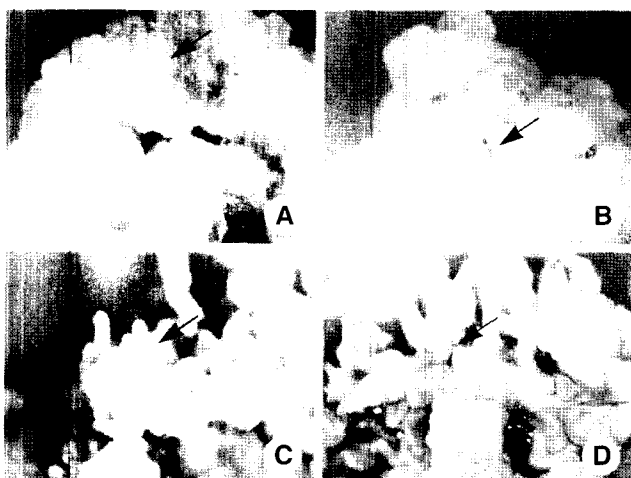


Figure 3. Process of shoot regeneration from internode explant of boxthorn 'Cheongyang' cultured on MS medium containing 0.01 mg/L NAA and 0.2 mg/L BA. A, Proliferating callus; B, Adventitious bud formation from callus cultured for 10 days; C, Shoot regeneration from callus; D, Multiple shoot formation from callus cultured for 40 days.

Table 4. Effects of growth regulators on shoot formation, number of shoots, and fresh weight of shoot and callus induced from internode explant of boxthorn 'Cheongyang' on MS medium for 6 weeks.

Growth regulators ^z (mg/L)		Shoot formation (%)	No. of shoots /explant	Frwt (mg/explant)
BA	TDZ			
0.2	0.0	100.0	15.7 ± 2.3 ^y	682.2 ± 84.8
0.5	0.0	87.5	5.7 ± 0.9	882.8 ± 61.7
0.0	0.2	66.7	16.0 ± 2.4	698.8 ± 74.5
0.0	0.5	71.4	8.8 ± 0.7	786.2 ± 82.4

^zBA or TDZ was combined with 0.01 mg/L NAA, respectively.

^yStandard error.

의 신초가 유도되었다. 이러한 차이는 Park 등 (1993)은 구기자의 수집종을 이용하였는데 본 실험에서는 '청양'을 이용하였기 때문에 나타나는 품종 간의 차이로 생각된다.

적 요

배지, 절편체의 종류 그리고 생장조절제가 약용작물인 구기자나무 (*Lycium chinese* Mill. 'Cheongyang')의 캘러스 유도 및 신초 분화조건에 미치는 영향을 조사하였다. 배지 종류별 기관분화는 신초 분화율, 신초 발생수 및 생체중이 MS, B5, WPM 배지 순으로 양호하였다. 구기자나무의 캘러스 유도는 절간 절편체보다 잎 절편체가 좋았고, 캘러스는 0.5 mg/L NAA와 0.2 mg/L BA가 첨가된 MS 배지에서 효율적으로 유도되었다. 신초 분화에 관여하는 cytokinin으로는 TDZ보다는 BA가 좋았으며 BA 단일처리보다는 NAA와의 혼용처리에서 더 양호하였다. 신초분화는 0.01 mg/L NAA와 0.2 mg/L BA가 첨가된 MS 배지에서 가장 좋았다.

인용문헌

- Gamborg O, Miller R, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50**:151-158
- George EF, Sherrington PD (1984) Plant growth regulators. In : George EF, (eds), *Plant propagation tissue culture*. Eversley, Basingstoke, Hants. England. pp282-330
- Kim BW, Choi MS, Roh KS, Park YG (1993) Somatic embryogenesis from leaf callus of *Lycium chinense* Mill. *Kor J Plant Tiss Cult* **20**:91-96
- Lee MS, Kim DC, Kim JH, Lim WJ (1984) Studies on the tissue culture of *Lycium chinese* Mill. *Bul Agr Wonkwang Univ* **7**:261-275
- Li W, Zhang DW (1990) Medical and aromatic perennial crops. In : Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR, Yamada Y, (eds), *Handbook of plant cell culture*, vol6, McGraw-Hill, USA, pp 116-126
- Liu CS (1991) An efficient method for selecting embryogenic callus from *Lycium chinense* L. cell culture. *Plant Science* **79**:99-103.
- Lloyd G, McCown B (1981) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb Proc Inter Plant Propagators Soc* **30**:421
- McNicol RJ, Graham J (1990) In vitro regeneration of *Rubus* from leaf and stem segments. *Plant Cell Tiss Org Cult* **21**:45-50
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**:487-497
- Park YG, Kim BW, Choi MS, Roh KS (1993) In vitro organogenesis from leaf callus of *Lycium chinese* Mill. *Kor J Plant Tiss Cult* **20**:85-89
- Predieri S, Fasolo F, Malavasi F (1989) High-frequency shoot regeneration from leaves of the apple rootstock M26 (*Malus pumila* Mill.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* **17**:133-142
- Rai VR, Chandra KSJ (1988) In vitro regeneration of plantlets from shoot callus of mature trees of *Dalbergia latifolia*. *Plant Cell Tiss Org Cult* **13**:77-83.
- Schenk F, Hildebrandt A (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell culture. *Can J Bot* **50**:199-204
- Shahin EA (1984) In : Vasil IK, (ed), *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, Vol 1, Academic Press, New York, pp370-380
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue grown in vitro. *Symp Sco Exp Biol* **11**:118-131
- Tao R, Sugiura A (1992) Adventitious bud formation from callus cultures of japanese persimmon. *HortScience* **27**:259-261
- Yakov IR, Vladimir AR, Nickolai MP (1990) Regeneration of *Lycium barbarum* L. plant from leaf tissue, callus culture and callus protoplasts. *Plant Cell Rpt* **9**:84-87

(접수일자 2001년 11월 20일)