

현탁배양을 통한 금낭화(*Dicentra spectabilis* L. Lemaire)의 대량증식

이강섭^{1*}, 심옥경¹, 신정순¹, 최용의², 김이엽¹

¹(주)파낙시아, ²강원대학교 산림자원학부

Mass Propagation of *Dicentra spectabilis* L. Lemaire Through *In vitro* Suspension Culture

Kang-Seop Lee^{1*}, Ock-Kyeong Sim¹, Jeong-Sun Shin¹, Yong-Eui Choi², Ee-Yup Kim¹

¹Panaxia Co. Ltd. 452-32, Jangdong, Deokjingu, Jeonju 561-360, Korea

²Division of Forest resources, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

ABSTRACT Bleeding heart (*Dicentra spectabilis* L. Lemaire) is one of the most valuable wild flower in Korea. This work was conducted for the mass production of somatic embryos through suspension culture and more effective plant regeneration system in *Dicentra spectabilis*. High-frequency embryogenic callus proliferation was achieved in SH liquid medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D. Half-strength SH medium was suitable concentration for somatic embryo induction and germination. About 5,000 embryos were produced per 250 ml flask after 4 weeks of culture. Germination rate of somatic embryos was decreased when GA₃ was added in medium. The plantlets showed a 58% survival rate when transferred to pots after 1 month of culture. The results indicate that micropropagation procedure via somatic embryogenesis can be applied for an efficient mass propagation of *Dicentra spectabilis*.

Key words: 2,4-D, bleeding heart, GA₃, SH medium, somatic embryogenesis, suspension culture

서 론

최근 자생화에 대한 관심과 수요가 높아지고 있으나 생산기술체계가 확립되지 않아 고가로 거래되고 있어 대중화의 걸림돌이 되고 있다. 이 중 양귀비과에 속하는 다년생 초본식물인 금낭화 (*Dicentra spectabilis*)는 1개월이 넘는 개화기간과 복주머니 모양의 작은 꽃들이 곡선의 화경을 따라 아름답게 피기 때문에 관상가치가 높은 자생화로 분류된다. 현재 금낭화는 다양한 색이 개발되지 않아 육종의 필요성이 절실하며 이에 앞서 식물체 재생과 대량 생산에 관한 연구가 선행되어야 한다.

양귀비과 식물에 속하는 금낭화의 묘목생산시, 조직배양에 의한 부정아의 유도를 통한 식물체의 재분화는 경단

을 배양하여 1~2 mg/L kinetin를 함유한 MS배지에서 수행된 바 있으며 (Lazarz et al. 1982), 부정아를 통한 식물체의 기내생산시 0.5 mg/L BA가 첨가된 MS기본배지에 계대배양한 후 0.3~0.5 mg/L IBA + 0.01~0.05 mg/L NAA 처리구에서 발근 시키는 것이 효과적임이 보고되어 있으나 (Kim et al. 1996), 아직 실용적인 대량 증식 체계는 확립 되지 않은 실정이다. 한편, 체세포배발생에 의한 양귀비과 식물체의 재분화에 관한 연구는 양귀비 (Sulaiman et al. 1991), 애기똥풀 (Woo et al. 1996), 금낭화 (Lee and Lee 2003)에서 시도된 바 있다. 특히 금낭화의 경우는 최근 종지에서 유도한 배발생능 켈러스로부터 1.0 mg/L kinetin을 첨가한 MS 고체배지에서 체세포배를 발달시키고, 이로부터 식물체 재생 및 순화를 시도한 바 있으나 (Lee and Lee 2003), 산업적으로 활용하기에는 생산효율 면에서 아직 미흡한 실정이다. 따라서 보다 효율적인 대량 생산 시스템의 확립이 절실히 요구되는 바, 본 연구는 현

*Corresponding author Tel 063-214-5571 Fax 063-214-5573

E-mail kangsl@hanmail.net

탁배양을 통하여 금낭화의 배발생세포의 대량증식 및 체세포배의 발생 그리고 식물체의 재생에 필요한 최적조건을 구명하여, 금낭화 묘목의 대량생산을 위한 기초자료로 활용하고자 시도되었다.

재료 및 방법

식물재료 및 살균

금낭화 종자를 전북대학교 농과대학에서 채취하여 70% 에탄올로 1분간 침지, 2% NaOCl로 15분 동안 표면살균한 후 멸균수로 4회 수세하였다. 멸균된 금낭화 종자를 2 mg/L GA₃가 첨가된 MS배지에 치상하였다. 종자는 발아율을 높이기 위하여 종피를 칼로 잘라서 뿌리가 잘 나오도록 처리하였으며, 발아율은 배양 2개월 후에 조사하였다.

배발생캘러스의 유기 및 선별

배양 2개월 후 발아한 유식물체 (약 4 cm 크기)의 줄기를 5 mm 크기로 잘라서 0.5~3 mg/L 2,4-D가 포함된 MS (Murashige and Skoog 1962), SH (Schenk and Hildebrandt 1972) 배지에 각각 치상하여 8주간 배양한 다음 캘러스 유도율을 조사하였다. 이 때 절편체는 처리구당 20개체씩 3회 반복하여 치상하였다. 캘러스 유도율은 전체 치상된 절편 중 캘러스가 유도된 절편 수를 백분율로 계산하였다. 유도된 캘러스를 호르몬을 첨가하지 않은 MS 기본배지에 계대배양한 후 체세포배 형성률을 조사하였다. 이때 배지는 MS 및 SH 기본배지에 0.8% agar와 30 g/L sucrose를 첨가한 후 pH 5.8로 조정하였으며, 배양은 온도 23 ± 2℃ 형광등 24 μm²s⁻¹, 16 h 광주기하의 배양실에서 실시하였다.

배발생캘러스의 증식 및 배발생

배발생캘러스의 증식을 위하여 고체배지에서 배발생캘러스를 선별하고 이를 액체배지에서 현탁배양한 후 100 μm sieve로 여과하여 균일한 배발생 캘러스를 유도하였다. 현탁배양에 의한 배발생캘러스의 최적증식조건을 구명하고자 1~8 mg/L의 2,4-D가 포함된 MS 및 SH배지에 각각 배양하였다. 이때 배발생 캘러스의 양은 packed volume 1 ml (1.0 g fresh weight)로 하여 250 ml 삼각플라스크에 이식하였으며, 생중량은 5일 간격으로 계대배양하여 1개월 후 측정하였다. 체세포배 발생의 최적조건을 구명하고자, 진술한 조건에서 증식된 callus를 호르몬이 제거된 배지에 치상하여 배양하였다. 이때 배지는 MS, SH배지의 희석배율을 각각 0.5, 1, 2배로 달리하여 사용하였다. 한편, 식물체의 재생

을 위하여 0.1~1.0 mg/L ABA를 첨가한 배지에서 균일한 체세포배를 유도하고 이로부터 유도된 체세포배를 고체배지에서 발아시켰다. 식물체의 도양순화는 뿌리와 신초가 발달한 정상적인 식물체를 모래와 원예용상토가 혼합된 포트에서 실시하였다.

결과 및 고찰

금낭화 종자의 발아

금낭화 종자의 발아효율을 조사한 결과, 무균발아시 대조구와 2.0 mg/L GA₃ 첨가 배지에 배양한 경우 각각 6.7%와 8.9%로 비슷하였다. 종피 일부를 칼로 잘라 상처준 후 기본배지와 2 mg/L GA₃를 첨가한 배지에서 각각 배양한 경우 42.2%, 57.8%의 발아율을 나타내었다 (Figure 1). 이상의 결과로부터 금낭화 종자로부터 발아시에 GA₃ 처리보다는 종피 일부를 칼로 잘라내는 것과 같은 물리적인 개입이 효과적임을 알 수 있다.

캘러스 유도

무균발아된 금낭화 줄기절편을 2,4-D가 첨가된 MS 및 SH배지에 각각 8주간 배양한 결과, 캘러스의 유도율은 MS 배지에서는 0.5 mg/L와 1.0 mg/L 2,4-D 처리구에서 100%로 가장 높게 나타났으며, 3.0 mg/L 2,4-D 처리구에서는 다소 감소하였다. 한편 SH배지에서 캘러스 유도율은 0.5~2.0 mg/L 2,4-D 처리구에서는 거의 유사하게 나타났으며 3.0 mg/L 2,4-D 처리구에서는 감소하였다. 캘러스의 색깔은 모두 연노랑색을 나타내었으며, 캘러스의 유도는 전체적으로 MS 배지에서 SH배지에 비해 양호함을 알 수 있었다 (Table 1).

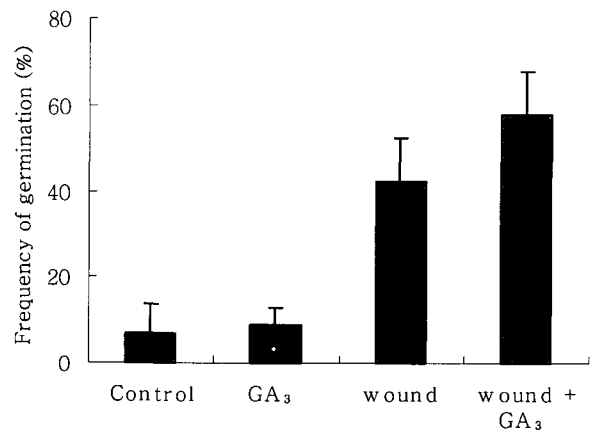


Figure 1. Effect of physical wound on germination of zygotic embryos of *Dicentra spectabilis* after 2 months of culture.

Table 1. Callus induction rate of *Dicentra spectabilis* on MS, SH media after 8 weeks of culture.

2,4-D (mg/L)	Callus induction (%)	
	MS medium	SH medium
0	0	0
0.5	100	93.3±5.8
1	100	96.7±5.8
2	96.7±5.8	93.3±5.8
3	86.7±5.8	83.3±5.8

Data represent the mean ± SE of three replicates.

배발생캘러스의 유도 및 선발

배발생캘러스를 유도하기 위해, 1.0 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS고체 배지에서 유도된 캘러스를 여러농도의 2,4-D가 첨가된 MS 및 SH 고체배지에 이식하여 6주간 배양하였다. 그 결과 캘러스 사이에 배발생 캘러스와 체세포배가 혼합되어 나타났는데, 이때 배발생 캘러스의 발생빈도는 2,4-D의 농도와 관계없이 MS배지에 비해 SH 배지를 사용했을 때 양호하게 나타났다 (Figure 2). 특히 0.5 mg/L 2,4-D가 첨가된 경우에는 MS배지에 비해 SH 배지에서 약 5배 높게 나타났다.

배발생세포를 현미경하에서 관찰하면 세포질이 짙고 세포의 크기는 작고 둥그랗지만, 비배발생 세포는 크기가 크고, 길어도 신장되었으며 액포화 되어 있었다. 육안으로 관찰시 비배발생캘러스는 연노란색으로 단단히 뭉쳐있으나, 배발생 캘러스는 연하고 부서지기 쉬운 형태를 나타내었으며 (Figure 4A), 이러한 현상은 애기똥풀의 경우와 유사하게 나타났다 (Woo et al. 1996). 캘러스 상층부에서는 구형배가 발달하기도 하였다. 특히 배발생 캘러스에서는 황갈색 물질이 많이 분비되는 것을 관찰할 수 있었다.

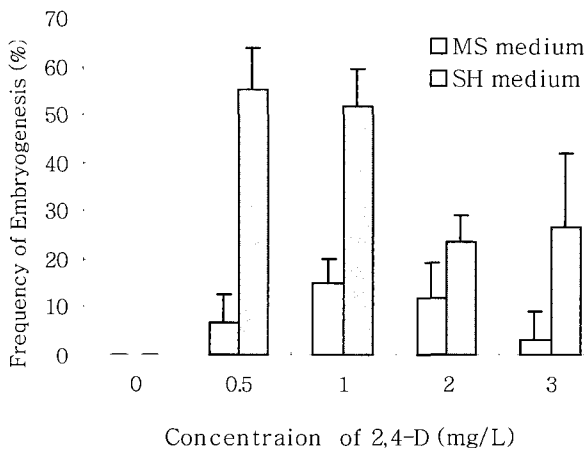


Figure 2. Effects of 2,4-D and medium on embryogenic callus induction after 6weeks of culture.

이와 같은 현상은 금낭화와 같은 양귀비과 식물인 애기똥풀 (Woo et al. 1996)이나 현호색 (Cheon et al. 1999)의 기내배양시 유사하게 관찰되는데, 재료식물의 특징으로 생각된다. 애기똥풀 (Woo et al. 1996)의 체세포배발생시 2.0 mg/L 2,4-D를 포함한 SH에 배양하였을 때 23.1%의 절편에서 캘러스가 형성되었고 계대하였을때 16.1%의 2차적인 배발생캘러스로 확인된 바 있다. 본 연구에서 MS배지에 비해 SH배지에서 배발생캘러스의 유도가 양호한 원인은 SH 배지에는 항산화제가 MS의 최고 50배 이상 많이 첨가되는데, 이것이 황갈색 물질의 분비를 억제하기 때문으로 생각된다.

현탁배양에 의한 배발생세포 증식

배발생세포를 대량증식하기 위하여 MS 및 SH액체배지에 1.0~8.0 mg/L 2,4-D를 농도별로 각각 처리하여 4주간 배양한 한 결과, 1.0 mg/L 2,4-D를 포함한 SH배지에서 증식률이 가장 높았으며, 2,4-D의 농도가 높아질수록 증식률은 감소되었다 (Figure 3). 2,4-D의 농도가 0.5 mg/L 이하에서는 세포증식보다는 일부 체세포배발생이 이루어지는 현상이 나타났다.

현탁배양으로부터 체세포배의 발생

효율적인 체세포배의 발생율을 조사하고자 증식용 배지에서 배양중인 배발생캘러스를 크기 100 μm의 체로 여과하여 얻은 균일한 상태로 만든 후, 2,4-D를 제거하고 MS 및 SH를 각각 0.5배, 1배, 2배로 염류의 농도를 달리하여 액체배지에 이식하여 4주간 배양하였다. 이때 계대배양은 1주일 간격으로 동일배지를 각각 사용하여 실시하였다. 그 결과 모든 조건에서 체세포배가 발생 되었는데 이러한 현상은 가시오가피의 체세포배 발생과정과 유사한 경향이 있었다 (Choi et al. 1999). 체세포배는 진술한 조건에서 발

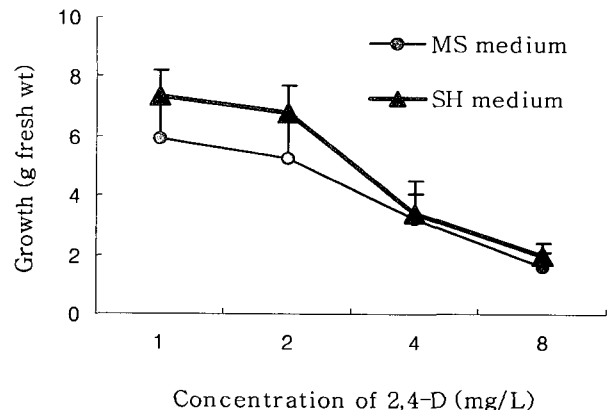


Figure 3. Effect of 2,4-D on embryogenic cell proliferation in SH and MS liquid medium after 4 weeks of culture.

Table 2. Effect of various culture media on somatic embryo formation of *Dicentra spectabilis* after 4 weeks of culture.

Media	Strength	No. of Torpedo shape and cotyledonary embryos
MS	0.5	1,683±136
	1	850±151
	2	4±1
SH	0.5	1,861±142
	1	1,246±150
	2	53±25

Data represent the mean ± SE of three replicates.

생단계가 다른 여러 단계의 체세포배가 섞여서 발생하였다. 이때 어뢰형 이상의 단계를 갖는 배의 개체수는 0.5배 SH 현탁배지에서 가장 높게 나타났다 (Table 2). 70 mL의 현탁배지를 함유한 250 mL 삼각플라스크 한 개에서 어뢰형 이상의 배가 최고 1,861개, 발달중인 구상배까지 포함하면 약 5,000개 이상의 고빈도로 체세포배가 생산되었다.

금낭화의 체세포배발생시에 구상형의 배에 kinetin을 처리하여 정상적인 형태의 자엽을 갖는 배가 발생하지 않음이 보고되었으나 (Lee and Lee 2003), 본 연구에서는 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 MS 및 SH기본배지에서 완전한 자엽을 갖는 배를 유도하여 (Figure 4C), 이로부터 정상적인 식물체가 재생됨을 관찰할 수 있었다. 한편, 땅두릅의 체세포배에 ABA를 처리하여 동조화되었음이 보고되어 (Lee et al. 2002) ABA 0.1, 0.5, 1.0 mg/L 농도로 처리한 후, 체세포배의 발달정도를 관찰하였으나 농도가 높아질수록 대조구에 비해 비정상적인 배가 다량 발생됨으로 금낭화에서는 ABA에 의한 동조화가 유효하지 않는 것을 관찰할 수 있었다 (데이터 미제시). 이상의 결과로 미루어 볼 때, 금낭화의 정상적인 체세포배 발생과정중에는 외래 식물생장조절물질을 필요로 하지 않는 것으로 생각된다.

체세포배 발아 및 순화

체세포배의 최적 발아조건을 구명하고자 상기의 조건에서 유도된 자엽시기의 체세포배를 농도를 달리한 GA₃ 첨가 고체배지에 이식하여 4주간 배양한 후 발아율을 조사하였다. 그 결과, 대조구와 0.1 mg/L GA₃ 처리구의 발아율이 각각 85%, 90%로서 유사하게 나타났으며, 0.5 mg/L GA₃ 이상의 처리구에서는 발아율이 오히려 감소하는 경향이었으며, 발아가 되었을 경우에도 유도된 식물체는 비정상적으로 신장하였다 (Table 3). 이상의 결과로부터 금낭화의 경우에 있어서 체세포배의 발아시에 GA₃를 요구하지 않음을 알 수 있는데, 이러한 결과는 GA₃를 요구하는 *Eleutherococcus*

Table 3. Effect of GA₃ on germination of somatic embryos on SH medium after 4 weeks of culture.

GA ₃ (mg/L)	No. of germinated embryos
0	85±8
0.1	90±12
0.5	12±3
1.0	9±2

Data represent the mean ± SE of three replicates.

senticocus (Choi et al. 1999), *Acanthopanax sessiliflorus* (Lee et al. 2002) 등의 몇몇 식물의 경우와는 차이가 나는 현상임을 알 수 있다.

한편, 배지의 조성에 따른 체세포배의 발아율을 조사하고자 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 MS 및 SH 기본배지를 각각 0.5배, 1배, 2배로 만든 고체배지에 자엽시기의 배를 이식하여 4주간 배양한 후 발아율을 조사하였다. 그 결과, 0.5배 배지와 기본배지에서는 모두 발아가 정상적으로 이루어졌으며 특히 0.5배 희석된 SH배지에서 뿌리형성과 신초발달이 양호하였으며, 묘의 투명화가 거의 이루어지지 않았다 반면에 2배로 만든 고체배지의 경우에 있어서는 발아율이 저조하였으며 신초형성과 뿌리의 발달이 미약함을 알 수 있었다 (데이터 미제시). 따라서 금낭화의 체세포배로부터 식물체 재생은 0.5배 희석된 SH배지를 사용하는 것이 보다 효과적이고 경제적이다.

발아된 유식물체를 모래와 원예용상토가 혼합된 포트에 이식하여 1개월 후 생존율을 조사한 결과 58%의 높은 생존율을 나타내었다 (Figure 4F). Lee와 Lee (2003)의 연구에서 얻어진 토양순화율 46%보다는 높았지만, 산업적으로 체세포배를 통한 금낭화의 묘목을 대량생산하기 위해서는 효율적, 시간적 그리고, 경제적인 점을 감안해야 되므로 향후 이 부분에 관하여 집중적인 검토가 필요하다고 생각된다.

적 요

금낭화 (*Dicentra spectabilis* L.)는 개발 가치가 있는 국내 자생화 중의 하나로서 우수한 품종의 대량생산이 절실히 요구되는 실정이다. 본 연구는 현탁배양을 통한 배발생세포의 대량증식과 체세포배 발생 및 식물체재생의 적정조건을 구명하여 효율적인 기내묘목의 대량생산 체계를 확립하고자 시도되었다. 1.0 mg/L 2,4-D SH고체배지에서 유도된 배발생캘러스를 현탁배지에서 증식시킨 결과, 1.0 mg/L 2,4-D를 포함한 SH배지에서 MS배지에 비해 증식율이 높게 나타났으며, 체세포배 발생율은 1/2배 SH기본배지에서 가장 높게 나타났다. 250 ml 삼각플라스크에서 5,000개 이상의 고빈도로 체세포배가 생산되었다. 체세포배로부터 발아유도시

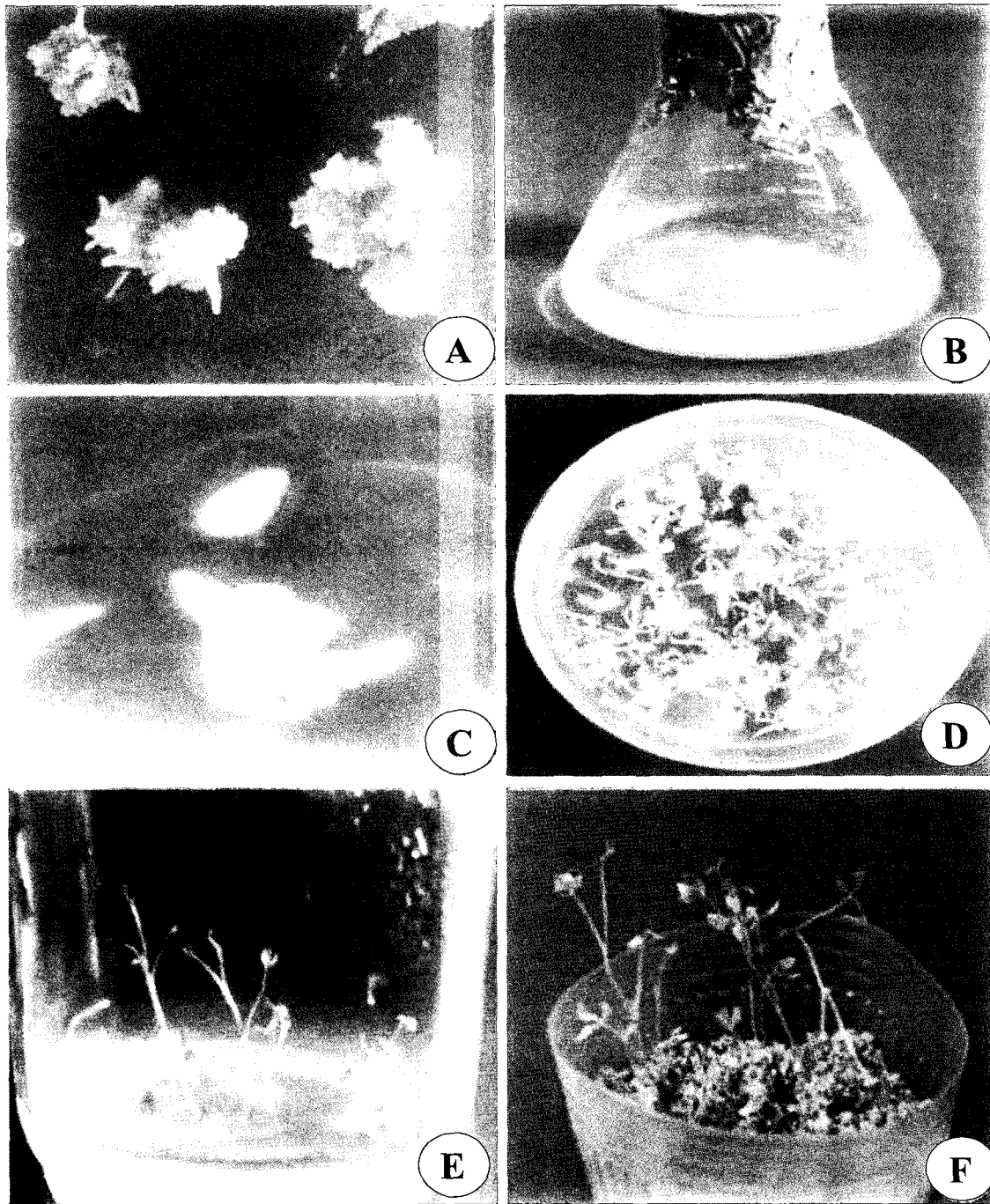


Figure 4. Somatic embryogenesis of *Dicentra spectabilis*. A, Embryogenic callus; B, Shake-flask culture of embryogenic cells; C, Cotyledonary stage somatic embryos; D, Germinating embryos on half strength SH medium without hormone; E, Plantlets with shoots and roots in culture jar; F, Acclimatization of plantlets in soil.

에 GA_3 는 정상적인 식물체로의 재생을 억제하는 효과를 나타내었으며, 정상적인 식물체 재생은 1/2희석 SH배지에서 양호하였다. 신초와 뿌리를 갖는 유식물체를 모래와 원예용상토 (5:1, vol)가 혼합된 토양이 함유된 포트에 이식하여 1개월 후 58%의 생존율을 나타내었다. 이상의 결과를 활용하면 체세포배로부터 금낭화의 묘목을 대량생산 할 수 있을 것으로 생각된다.

사사 - 본 연구는 2002년도 농림기술개발사업에 의하여 수행되었음.

인용문헌

Cheon WJ, Lee DW (1999) Plantlet formation and somatic embryogenesis from the peduncle explants of wild *Corydal*

- remota* for. *peatinata*. Kor J Plant Tiss Cult 26: 15-19
- Choi YE, Kim JW, Yoon ES (1999) High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. Ann Bot 83: 309-314
- Lazarz SA, Zillis MR, Sink KC (1982) *In vitro* propagation of *Dicentra spectabilis*. HorScience 17: 188-189
- Lee KP, Lee DW (2003) Somatic embryogenesis and plant regeneration from seeds of wild *Dicentra spectabilis* (L.) LEM. Plant Cell Rep 22: 105-109
- Lee KS, Choi YE, Sim OK, Joo SA, Shin JS, Jeong JH, Kim YS, Kim EY (2002) Effects of GA₃ and charcoal on plant regeneration from somatic embryos of *Acanthopanax sessiliflorus*. Kor J Plant Tiss Cult 29: 253-257
- Lee KS, Lee JC, Soh WY (2002) High frequency plant regeneration from *Aralia cordata* somatic embryos. Plant Cell Tiss Org Cult 68: 241-246
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot 50: 199-204
- Sulaiman IM, Rangaswamy NS, Babu CR (1991) Formation of plantlets through somatic embryogeny in the Himalayan blue poppy, *Meconopsis simplicifolia* (Papaveraceae). Plant Cell Rep 9: 582-585
- Woo JW, Huh GH, Ahn MY, Kim SW, Liu JR (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration in pedicel explant cultures of *Chelidonium majus* var. *aslaticum*. Kor J Plant Tiss Cult 23: 363-366

(접수일자 2004년 1월 2일, 수리일자 2004년 4월 21일)