

제주상사화 (*Lycoris chejuensis* K. Tae et S. Ko) 잎 및 뿌리 절편으로부터 소자구 형성을 통한 식물체 재생안

오명진², 박종미¹, 태경환³, 유장렬², 김석원^{1*}
¹한국생명공학연구원, 생물자원센터, ²식물유전체연구센터
³대전대학교 응용산업대 생명과학과 식물분류학연구실

Plant Regeneration from Leaf and Root Cultures of *Lycoris chejuensis* via Bulblet Formation

Myung Jin Oh², Jong Mi Park¹, Tae Kyoung Hwan³, Jang Ryol Liu², and Suk Weon Kim¹

¹Biological Resource Center

²Plant Genome Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 52 Eoeun-dong, Yuseong, Daejeon 305-806, Korea

³Department of Life Science, Daejeon University, 96-3 Yongun-dong, Dong-gu, Daejeon 300-716, Korea

ABSTRACT Plant regeneration system from leaf and root segments of *Lycoris chejuensis* via bulblet formation was established. Surface-sterilized leaf and root segments were cultured on the B5 medium containing 2,4-D. After 12 weeks of culture onto B5 medium containing 2,4-D, white globular structures and white calluses were formed on the cut surface of the explants. The highest frequency of globular structures and calluses formation from leaf explants was 32.1% when leaf explants were cultured onto B5 medium supplemented with 1 mg/L of 2,4-D. However, the higher concentration of 2,4-D (over than 3 mg/L) resulted in decrease of the frequency. In comparison to leaf explants, root segments showed the highest frequency at a rate of 36.1% when root explants were cultured onto B5 medium supplemented with 3 mg/L of 2,4-D. These structures and calluses were sub-cultured and proliferated onto the same culture medium. Upon transfer to B5 basal medium, white globular structures were developed into bulblets and normal plantlets. After 4 weeks of incubation in the light, plantlets were successfully rooted over the frequency of approximately 90%. Rooted plantlets were successfully transferred to potting soil and acclimatized in the growth chamber. The plant regeneration system of *Lycoris chejuensis* established in this study, might be applied to mass proliferation, conservation of genetic resources and genetic transformation for molecular breeding.

서 론

제주상사화 (*Lycoris chejuensis* K. Tae et S. Ko)는 수선화

과 (Amaryllidaceae)에 속하는 다년생 초본식물이다 (Tae and Ko 1993, 1996). 상사화류의 식물은 꽃이 아름다워 분화, 절화, 화단 등 관상용으로서의 가치가 있을 뿐만 아니라, 인경에는 30% 이상의 전분이 포함되어 있어 삶아서 식용으로 이용 가능한 구황작물로 활용되어 왔다 (Kurita 1998). 특히 상사화과 식물의 구근에는 다양한 알카로이드 성분이 존재

*Corresponding author Tel 042-860-4646 Fax 042-860-4677

E-mail: kimsw@kribb.re.kr

하는 것으로 알려져 있으며 (Martin 1987, Sener et al. 2003) 이중에서 lycorine은 한방에서는 가래, 급성기관지염, 천식 등의 거담 치료제로 사용되어 왔으며 최근 식물의 생장을 억제하는 allelochemical로 활용 가능성이 제시되고 있다 (Iqbal et al. 2006). 또한 acetylcholineesterase inhibitor로 알려진 galanthamine이 존재하여 뇌 및 신경질환 치료제로 이용이 되고 있다. 그러나 상사화는 원예적 약용적 가치가 높음에도 불구하고 종자 번식이 이루어지지 않고 구근을 통해 번식이 이루어지고 있으며 특히 제주상사화의 경우 국내 제주도에만 분포하는 특산종으로 알려져 있고 (Tae and Ko 1993, 1996) 전세계적으로 극히 일부지역인 제주에만 소수의 개체가 자생하기 때문에 유용 식물자원으로서 보존해야 할 가치가 매우 높은 식물종이다.

기내 인공증식 수단을 개발하기 위한 상사화의 조직배양 연구는 잎 조직으로부터 *Lycoris*의 식물체 재생이 보고 (Williams 1980) 된 이후 *Lycoris aurea*의 bulb-scale로부터 옥신과 싸이토키닌의 혼용처리를 통해 shoot 발생을 유도한 다음 NAA 단독처리를 통해 뿌리를 유도하여 식물체 재생체계를 확립한 바 있다 (Kim et al. 1988, Huang and Liu 1989). 아울러 상사화 신품종 개발을 위한 기초 연구로 *Lycoris incarnate*의 배주 및 배 배양을 통한 중간 잡종 개발 (Ma et al. 2001a, 2001b)이 보고된 바 있으며 최근 *Lycoris longituba*의 자구 형성을 통한 식물체 재생체계가 확립된 바 있다 (Wang et al. 2005). 또한 *Lycoris* 품종의 성장점 배양을 통해 유용 무병주의 대량증식이 가능함이 보고된 바 있다 (Huang et al. 2006). 국내에서는 *Lycoris squamigera* 구근 절단 및 구근에 상처를 내는 방법으로 상사화의 효과적인 대량증식 기술이 보고된 바 있다 (Park et al. 1998). 그러나 아직 제주상사화의 경 조직배양을 통해 대량증식체계를 확립하거나 초저온보존체계 개발을 통해 보다 적극적인 장기보존 연구 등이 아직 보고된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 제주상사화의 잎 및 뿌리 절편으로부터 소자구 형성을 통한 식물체 재생체계 확립에 미치는 식물 조직 및 성장조절제의 영향을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료 및 배양조건

제주상사화 (*Lycoris chejuensis* K. Tae et S. Ko)의 식물체

의 잎조직을 절취하여 수돗물에 세척한 다음 10% 상업용 락스 용액에 20분간 표면살균을 하였다. 살균된 잎 조직을 무균작업대 내에서 멸균수로 3-4회 세척한 다음 멸균된 여과지에서 표면의 수분을 제거하였다. 잎 조직 (넓이 약 5 mm²)을 절단하여 캘러스 유도배지에 치상하였다. 또한 제주상사화의 뿌리 배양을 위해 잎조직으로부터 재생된 기내 배양 소식물체의 뿌리 조직 (길이 약 5 mm)을 잎 조직과 동일한 캘러스 유도배지에 치상하였다. 제주상사화의 잎 및 뿌리 조직을 위한 배양배지로 B5 (Gamborg et al. 1968) 배지를 사용하였으며 뿌리 유도는 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지의 모든 무기염류 농도를 1/2로 낮춘 배지에 각각 0.4 mg/L thiamine·HCl, 100 mg/L myo-inositol, 30 g/L sucrose 및 4 g/L Gelrite 가 첨가된 배지를 기본배지 (1/2MS 배지)로 사용하였다. 배양배지의 pH는 고압살균전에 1N NaOH 용액으로 5.8로 조정하였다. 배양조건은 캘러스 유도과정은 25°C 암실에서 배양하였으며 소자구로부터 식물체 재생은 25°C 명배양 (약 70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; 광주기 16/8시간) 하였다.

소자구 및 캘러스 형성에 미치는 성장조절제의 영향

제주상사화의 잎 조직으로부터 식물체 재생체계를 확립하기 위하여 B5 기본배지에 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)를 각각 0, 0.1, 0.3, 1, 3과 10 mg/L 첨가된 배지를 사용하였으며 각각의 식물 절편을 15개씩 3반복으로 치상하여 상기의 배양조건에 따라 배양하였다. 제주상사화의 뿌리 배양은 잎 조직과 마찬가지로 B5기본배지에 2,4-D 및 benzyl aminopurine (BA)를 각각 0, 0.1, 0.3, 1, 3과 10 mg/L 첨가된 단독 처리구 및 1 mg/L 2,4-D에 BA가 각각 0, 0.1, 0.3, 1 및 3 mg/L 첨가된 혼용처리구를 준비하였으며 아울러 1 mg/L BA에 2,4-D 가 각각 0, 0.1, 0.3, 1 및 3 mg/L 첨가된 혼용처리구를 준비하였다. 뿌리 절편 역시 각각의 처리구에 12개씩 3반복으로 치상하여 상기의 배양조건에 따라 배양하였다. 성장조절제의 농도별 종류별 처리에 따른 제주상사화 조직 절편으로부터 소자구 및 캘러스 형성 빈도 조사는 계대배양 과정 없이 12주간 배양된 각 절편으로부터 백색의 구형세포괴 및 캘러스 형성유무를 관찰하여 소자구 및 캘러스 형성 빈도를 조사하였다. 소자구 및 캘러스 형성 빈도 데이터의 통계분석을 위해 반복구의 평균값과 표준편차를 상용 프로그램인 Origin (ver. 7.5)를 이용하여 조사하였다.

식물체 재생

제주상사화의 잎 조직 및 뿌리 조직 유래 캘러스로부터 형성된 소자구는 생장조절제가 첨가되지 않은 B5 기본배지로 옮겨 소식물체로 발달을 유도하였다. 발달된 소식물체는 1/2MS 기본배지로 옮겨 25°C 명배양 (약 70 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; 광주기 16/8시간)을 통하여 소자구의 신장과 뿌리발달을 통한 정상적인 식물체 재생이 이루어지는지 여부를 조사하였다. 고체배지상에서 뿌리 발달이 이루어진 식물체는 Gelrite 조각을 제거한 다음 수돗물로 세척하여 원예용 상토로 이식하여 25°C 명배양하였다.

결과 및 고찰

잎 조직으로부터 소자구 형성을 통한 식물체 재생

제주상사화의 잎조직으로부터 형성된 캘러스로부터 소자구발생을 통한 기내 식물체 재생체계를 확립하였다 (Figure 1). 제주상사화의 잎 조직으로부터 2,4-D가 첨가된 배양배지에 4주 배양 후 백색의 솜털 (Figure 1A)이 발달하면서 조직팽창이 이루어지고 이후 백색의 구형 돌출 구조가 절단면에 형성되기 시작하였으며 동시에 백색 캘러스의 형성이 관찰되었다(Figure 1B). 그러나 생장조절제가 첨가되지 않은 기본배지에서는 캘러스 형성이 이루어지지 않았으며

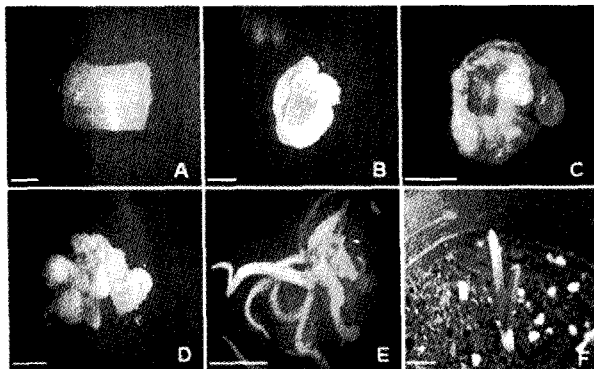


Figure 1. Plant regeneration of *Lycoris chejuensis* K. Tae et S. Ko via bulblet formation. A: Initial callus formation from leaf explants after four weeks of culture; B: Initial globular structure formation from callus on the cut surface of leaf explants; C: Further development of globular structures and calluses; D: Development of bulblets from globular structures and calluses; E: Rooting of plantlet; F: Normal plant regeneration after soil transfer. Scale bars represent 1 mm (A-D) and 1 cm (E-F).

잎 조직의 팽창이 이루어지면서 배양기간이 증가될수록 갈변 고사하였다. 형성된 백색의 구형 돌출 구조 및 백색 캘러스는 배양 12주 경과 후에도 캘러스 증식 및 조직 팽창은 이루어지지만 매우 빠른 속도의 증식률을 보이지는 않았다 (Figure 1C). 형성된 구형의 돌출 구조를 동일 조성의 생장조절제가 첨가된 배양배지로 옮겨 캘러스의 증식 및 구형 세포괴의 신장을 유도한 결과 구형의 돌출 구조가 소자구로 발달함을 관찰 할 수 있었다 (Figure 1D). 신장된 구형 소자구를 생장조절제가 첨가되지 않은 1/2MS 배지로 옮겨 뿌리 발달을 유도한 결과 약 90%이상의 소자구에서 정상적인 뿌리 발달이 이루어졌다 (Figure 1E). 재생된 소식물체를 토양으로 이식한 결과 거의 모든 소식물체가 순화과정을 통하여 정상적인 식물체로 발달하였다 (Figure 1F).

소자구 형성에 미치는 생장조절제의 영향

제주상사화 잎조직으로부터 소자구 형성에 미치는 2,4-D의 영향을 조사한 결과 1-3 mg/L 2,4-D 처리구에서는 백색의 구형 돌출구조 및 캘러스 형성을 관찰 할 수 있었다 (Figure 2). 소자구 형성빈도는 1 mg/L 2,4-D 단독 처리구에서 32.1%로 가장 높았으며 2,4-D 농도가 증가할수록 감소하여 3 mg/L 이상의 고농도 2,4-D 처리구에서는 소자구의 형성빈도가 14%로 크게 감소하였으며 10 mg/L 2,4-D 처리구에서는 조직갈변이 이루어지면서 전혀 소자구 및 캘러스 형성이 이루어지지 않았다 (Figure 2). 이상의 결과로 미루어 볼 때 제주상사화의 잎조직의 경우 생장조절제로 0.3 - 1 mg/L의 2,4-D 처리가 소자구 발생을 통한 식물체 재생에 효과적임을 알 수

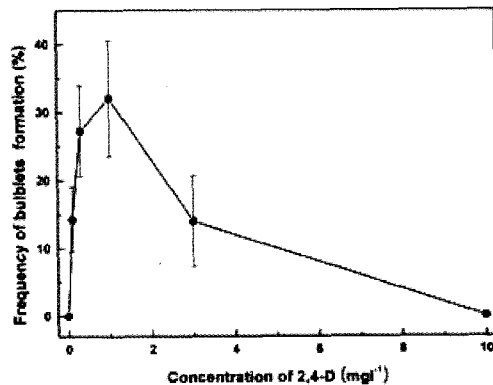


Figure 2. Effects of 2,4-D on bulblet formation from leaf explants (■) of *Lycoris chejuensis*. Each 2,4-D treatment consisted of 15 explants with three replicates. Vertical bars represent SD.

있었다. 따라서 이 결과는 *Lycoris*속 식물의 잎으로부터 소자구 형성을 통해 식물체 재생이 가능하다는 보고 (Ma et al. 2002)와 유사한 결과라 사료된다.

반면에 뿌리 조직의 경우 잎 조직과 달리 소자구 형성 빈도는 1 mg/L 2,4-D 단독 처리구에서 19.4%이었으며 2,4-D의 농도가 증가할수록 높아져서 3 mg/L 2,4-D 처리구에서 36.1%로 가장 높았으며 그 이상 고농도의 2,4-D 처리구에서는 빈도가 크게 감소하였다 (Figure 3A). 이 결과를 통해 제주상사화 뿌리 조직의 경우 잎 조직에 비하여 소자구 발생 과정에 더 높은 농도의 2,4-D가 요구됨을 알 수 있었다. 또한 BA 단독처리의 경우 0.3 mg/L BA 단독처리구에서도 소자구 및 캘러스 형성이 이루어짐을 관찰할 수 있었으며 그 빈도는 22.2%이었다 (Figure 3A). 이상의 연구결과를 통하여 비록 2,4-D 단독처리에 비해 빈도는 낮지만 저농도의 싸이토키닌 단독 처리만으로도 뿌리 조직에서도 소자구 형성이 이루어짐을 알 수 있었다.

소자구 및 캘러스 형성을 촉진시키기 위하여 2,4-D와 BA 상대적인 비율을 달리하여 혼용처리를 수행한 결과 1 mg/L BA + 0.3 mg/L 2,4-D 처리구에서 소자구 및 캘러스 형성빈도가 33.3% (Figure 3B)로 가장 높았으나 2,4-D와 BA의 단독 처리에 비하여 2,4-D와 BA의 혼용처리에 의한 상승 효과를 크게 보이지 않았다. 본 연구 결과는 일반적으로 *Lycoris*속 식물의 기내 배양을 위해 오옥신으로 NAA를 싸이토키닌으로 BA나 kinetin을 혼용처리하면 자구 형성이 촉진된다는 보고 (Kim et al. 1988, Huang and Liu 1989, Wang et al. 2005, Huang et al. 2006)와는 상반된 결과라 사료된다. 본 연구에서 제주상사화 뿌리의 경우 오옥신과 싸이토키닌의 혼용처

리가 소자구 형성에 미치는 영향을 조사하였으나 잎 조직의 경우 연구 재료의 부족으로 오옥신과 싸이토키닌의 혼용처리가 소자구 형성에 미치는 영향을 조사하지 못하였다. 따라서 향후 재생된 식물체의 잎조직으로부터 오옥신과 싸이토키닌의 혼용처리가 소자구 형성에 미치는 영향을 조사하게 되면 소자구 형성에 미치는 성장조절제의 영향을 더 자세하게 이해할 수 있을 것으로 기대된다.

이상의 연구 결과로 미루어 볼 때 제주상사화의 잎조직의 경우 저농도 (0.3 - 1 mg/L)의 2,4-D 처리가 소자구 형성에 매우 효과적임을 알 수 있었으며 재생된 식물체의 뿌리 조직의 경우 고농도 (3 mg/L)의 2,4-D 처리가 소자구 형성에 효과적임을 알 수 있었다. 아울러 뿌리조직에서는 저농도 (0.3 mg/L)의 BA 처리만으로도 소자구 형성이 이루어짐을 알 수 있었다. 현재 캘러스의 현탁배양체계를 확립중이며 제주상사화의 초저온보존 연구에 활용할 예정이다. 아울러 본 연구에서 확립된 제주상사화의 잎조직으로부터 소자구발생을 통한 식물체 재생체계는 제주상사화의 기내 대량증식 수단은 물론, 유용 형질 도입을 통한 분자육종의 수단으로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

적 요

제주상사화의 잎 및 뿌리 조직으로부터 형성된 캘러스 및 구형 소자구로부터 효율적인 기내 식물체 재생체계를 확립하였다. 2,4-D가 첨가된 B5 배양배지에서 12주 배양 후 제주상사화의 잎 조직으로부터 백색의 구형 세포괴 및 캘러스가 동시에 발달하였으며 그 빈도는 32.1%이었다. 그

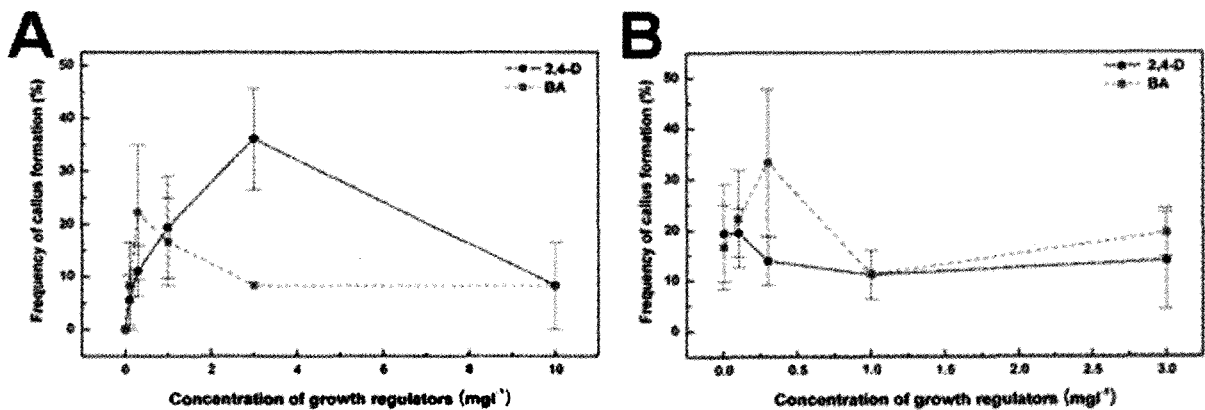


Figure 3. Effects of 2,4-D and BA on bulblet and callus formation from root explants of *Lycoris chejuensis*. Each 2,4-D (●) or BA (○) alone treatment (A) and combinatory treatment of the 2,4-D and 1 mg/L BA (●) and the BA and 1 mg/L 2,4-D (■)(B). Each treatment consisted of 12 explants with three replicates. Vertical bars represent SD.

러나 3 mg/L 이상의 고농도 2,4-D 처리구에서는 캘러스 형성빈도가 14%로 크게 감소하였으며 10 mg/L 2,4-D 처리구에서는 캘러스 형성이 전혀 이루어지지 않았다. 잎 조직과 달리 뿌리 절편의 경우 3 mg/L 2,4-D 처리구에서 캘러스 형성 빈도가 36.1%로 가장 높았으며 BA 단독처리구나 2,4-D와 BA의 혼용처리구에서는 그 빈도가 감소하였다. 형성된 백색의 구형세포괴는 생장조절제가 첨가되지 않은 B5배지에 배양하면 소자구 발달 경로를 거쳐 소식물체로 발달이 이루어졌다. 소식물체는 생장조절제가 첨가되지 않은 1/2MS 기본 배지로 옮겨 명배양한 결과, 약 배양 2주후부터 녹색의 잎이 신장되는 것을 관찰 하였으며 4주 후 뿌리 발달이 이루어지면서 정상적인 식물체로 발달하였다. 재생된 소식물체는 배양기내에서 순화과정을 통해 토양이식이 가능하였다. 본 연구에서 확립된 제주상사화의 식물체 재생체계는 제주상사화의 대량증식 수단은 물론, 유용 형질 도입을 통한 분자육종의 수단 및 유용 유전자원의 장기보전을 위한 초저온 보존 연구의 직접적인 연구소재로 활용이 가능할 것으로 예상된다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 유전자원지원활용사업 (BDW0800723), 환경부 차세대핵심환경기술사업 (EGW0600712)과 한국생명공학연구원 기관고유사업 지원으로 수행되었습니다.

인용문헌

- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspensioncultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158
- Huang LC, Liu DM (1989) Clonal multiplication of *Lycoris aurea* by tissue culture. *Sci Hortic* 40: 145-152
- Huang LC, Hsu WS, Chang YM, Liou PC, Huang BL, Chen CC, Chang CA (2006) Virus-tested *Lycoris aurea* plants from apical meristems of adventitiously regenerated shoots. *Bot Studies* 47: 163-166
- Iqbal Z, Nasir H, Hiradate S, Fuji Y (2006) Plant growth inhibitory activity of *Lycoris radiata* Herb. and the possible involvement of lycorine as an allelochemical. *Weed Biol Mgmt* 6: 221-227
- Kim YS, Park EH, Yoo SO, Song WS (1988) Studies on the Tissue culture of *Lycoris aurea* HERB. 원광대학교 원예학과 농대논문집 제11권: 129-150
- Kurita S (1998) Natural History of Higanbana (*Lycoris radiata*). Tokyo Kensei-shya Press, Tokyo, 177-188
- Ma B, Tarumoto I, Liu QC (2001a) An improved method of ovule culture for producing interspecific hybrids in the genus *Lycoris* (Amaryllidaceae). *J Japan Soc Hort Sci* 70: 460-462
- Ma B, Tarumoto I, Nakamura N, Kunitake H (2001b) Production of interspecific hybrids between *Lycoris incarnate* and four other species through embryo culture. *J Japan Soc Hort Sci* 70: 697-703
- Ma B, Tarumoto I, Ogawa T, Morikawa T (2002) Micropropagation using leaf blades in genus *Lycoris*. *Sci Rep Grad Sch Agric Biol Sci Osaka Prefect Univ* 54: 1-5
- Martin SF (1987) *The Amaryllidaceae* alkaloids. In: *The Alkaloids* (ed. By Brossi A.). Academic Press, New York, 252-376
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Park YJ, Heo BG, Jeong SY, Jeong JH, An MS (1998) Effective and economical propagation method of *Lycoris squamigera* Native to Korea. *Korean J Hort Sci Technol* 16: 242-243
- Sener B, Orhan I, Satayavivad J (2003) Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytother res* 17: 1220-1223
- Tae KH, Ko SC (1993) New taxa of the genus *Lycoris*. *Korean J PI Taxon* 23: 233-241
- Tae KH, Ko SC (1996) Cytological Evolution in the Genus *Lycoris* (Amaryllidaceae). *Korean J Bot* 39: 209-214
- Wang GP, Chen Y, Zhou J (2005) Bulb induction and plant regeneration of *Lycoris longituba*. *Plant Physiol Commun* 41: 457-460
- Williams M (1980) Regeneration of *Lycoris* plantlets from leaf and pedicel tissues. *Plant Life* 36: 95-98

(접수일자 2007년 6월 13일, 수리일자 2007년 6월 29일)