

헛개나무의 체세포배발생 및 식물체 재분화

엄승희* · 신동용* · 이현용* · 김명조* · 김종대* · 최원철** · 허권* · 유창연*†

*강원대학교 농업생명과학대학, **광혜원한방병원

Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Hovenia dulcis* Thunb.

Seung Hee Eom*, Dong Yong Shin*, Hyeon Yong Lee*, Myong Jo Kim*, Jong Dai Kim*

Won Cheol Choi**, Kwon Heo* and Chang Yeon Yu*†

*College of Agriculture & Life Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

**Kwanghyeowon Medical Foundation Cancer Center, Incheon, Korea

ABSTRACT : An efficient and reproducible procedure for the large scale propagation of *Hovenia dulcis* Thunb. is described. Shoot primordia emerging from the leaf surface was induced from MS medium supplemented with NAA. Stem cuttings were suitable explants for multiple shoot proliferation. They produced axillary shoots which branched repeatedly, yielding an average of 7 shoots per explants after 4 weeks in culture, when cultured on a woody plant medium (WPM) containing 0.1mg/l BA and 0.1mg/l NAA. Stem, leaf and root segments from axenic seedlings were used as explant source to induce somatic embryogenesis. A high frequency of somatic embryos were induced directly from leaf in MS medium with NAA, 2,4-D and in medium containing NAA, 2,4-D with BA. Somatic embryos were germinated in MS medium supplemented with 1mg/l GA₃. Somatic embryos proliferated secondary somatic embryos rapidly after transfer to MS medium supplemented with 1mg/l kinetin, 1mg/l GA₃ and 2% dextrose.

Key words : Somatic embryogenesis, *Hovenia dulcis*.

序 言

헛개나무(*Hovenia dulcis* THUNB.)는 갈매나무과에 속하며 낙엽교목(落葉喬木)으로 높이 10m 안팎이고 잎은 호생하고 넓은 난형 또는 타원형이며 7월에 백색 꽃이 피고 10월에 열매가 성숙되며 핵과(核果)는 둥글고 갈색이 돌며 3실(室)에 각각 1개의 종자가 들어 있고 과정은 불규칙하게 울퉁불퉁 살이 찢다. 헛개나무는 약명으로 지구자라 하며 본초강목에 따르면 은은한 향기가 있고, 단맛이 나기 때문에 먹을 수 있으며 술을 씹히는 작용이 있다고 하였으며, 생즙은 술독을 풀고 구역질을 멎게 한다고 하였다. 한방에서 종자는 주정중독(酒精中毒), 소변불리(小便不利), 구토(嘔吐)에, 과정은 건위(健

胃), 자양보혈(滋養補血)에 효과가 있다고 전해져 이용되어 왔다. 열매에 다량의 포도당, 사과산, 칼슘 등의 성분이 함유되어 있어 옛부터 주독 해독, 피로회복, 번열, 목마름, 구토증 등의 치료와 대소변을 잘 통하게 한다고 하였다.

헛개나무의 탁월한 알콜 분해능과 그 외의 효능으로 민간에서 생약으로 이용되고 있다. 그러나 우리의 여러 자생식물들이 그러하듯이 헛개나무도 자생하고 있는 자생지에서 무분별하게 채취되고 있으며 또한 그 수요를 따르지 못해 상당량이 중국에서 수입되어 이용되고 있다. 그러므로 헛개나무의 안정적인 공급을 위해 종묘의 대량 번식 및 육종이 연구되어야 한다.

본 연구에서는 헛개나무에 대한 조직 배양 연구가 전무

† Corresponding author (Phone) : Chang Yeon Yu, 033-250-6474, E-mail : cyyu@kangwon.ac.kr

Received 27 January 2001 / Accepted 8 March 2002

하기에 캘러스 형성 및 체세포배 유도를 위한 적절한 배지, 성장조절물질, 탄소원 및 배양 환경을 조사하였다.

재료 및 방법

강원도 양양군 자생지에서 헛개나무의 열매를 채취하여 본 실험에 사용하였다.

열매는 과피를 제거한 후 황산 원액에 20분 동안 침지시켰으며 흐르는 물에서 황산을 완전히 제거시켰다. 종피를 벗긴 후 증류수로 2회 세척하였으며 70% 에탄올에 1분, NaOCl 2% 용액에 20분 소독하고 멸균수로 6회 세척하였다. 배유에서 배를 분리하여 3% sucrose가 포함된 1/2 MS medium에서 배배양 하였으며 이를 통해 얻어진 식물체의 조직을 배양재료로 이용하였다. 배양 조건은 25℃, 16 시간 광/8시간 암 조건으로 하였다.

1. 배지 조제

기본배지로 MS(Murashige and Skoog), WPM(McCown's Woody Plant Medium), Gamborg B5 배지를 사용하였다. MS 배지, Gamborg B5 배지는 3%의 sucrose와 성장조절물질을 첨가한 후 pH는 5.7로 조절하였다. WPM 배지는 2% 또는 3%의 sucrose와 성장조절물질을 첨가한 후 pH는 5.5로 조절하였다. 0.8%의 agar를 첨가하여 배지를 굳혔다. 배지는 121℃, 1.5기압에서 15분간 고압멸균하였다.

2. 배발생 캘러스에서 체세포배 유도

BA 0.1mg/l+2,4-D 1mg/l 그리고 BA 0.1 mg/l+NAA 1mg/l 에서 유도된 배발생 캘러스(PEMs ; pro-embryogenic cell masses)를 2,4-D 0.1과 1mg/l 의 배지로 계대하고 암배양하였다. 유도 된 체세포 배의 성장과 성숙 그리고 발아에 영향을 미치는 여러 종류의 성장조절물질, 탄소원의 종류, casein hydrolysate의 농도를 조사하였다. Kinetin 1mg/l, ABA 1mg/l, GA₃ 1mg/l 처리하였으며 Sucrose, dextrose, fructose를 탄소원으로 2%, 3% 첨가하였다. 배양 4주마다 계대하였으며 각 배양에 따른 배발생 캘러스의 성장율과 체 세포 배변이를 조사하였다.

3. 신초 유기에 미치는 배지 및 성장조절물질의 효과

식물의 절편에서 shoot를 유도하는 배지 종류와 성장조절물질을 조사하기 위해 기내 식물체의 잎 절편체에 상처를 낸 후 다음 배지에 치상하였다. 기본 배지로는 MS, 1/2 MS, WPM, Gamborg B5 배지를 사용하였으며 각 배지에 성장조절물질 NAA 0.5, 1, 2, 5 mg/l, 2,

4-D 0.1, 1 mg/l 의 단독처리와 BA 0.1, 1 mg/l 와 NAA 0.1, 1 mg/l, 2,4-D 0.1, 1 mg/l 조합처리 하였다. 배지는 121℃, 1.5기압에서 10분간 고압 멸균하였다. 배양 4주에서 5주 후 각 절편에서 shoot 형성율과 성장율을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 체세포배발생

헛개나무에서는 여러 성장조절물질이 처리 된 배지 중 Table 1에서와 같이 성장조절물질이 첨가 된 배지에서 2-3개월 후 배발생 캘러스 및 직접 체세포 배가 절편에서 발생하였다. 2,4-D 와 NAA가 처리 된 배지에서 체세포배가 발생하였으며, 단독처리에서 고농도에서 주로 직접 체세포 배가 발생하였으나 성장조절물질이 처리되지 않은 배지로 옮겼을 때 발아하지 못하고 갈변하였다. BA 0.1mg/l+2,4-D 1mg/l 와 BA 0.1mg/l+NAA 1mg/l 에서 발생한 배발생 캘러스를 2,4-D 0.1mg/l, 2,4-D 1mg/l 처리 된 배지로 계대하였으며 암배양하여 배를 성숙시켰다. 배발생 캘러스의 성장과 발아를 위해 kinetin, GA₃, casein hydrolysate를 처리하였을 때 배발생 캘러스가 성장하였으나 성숙 및 발아에는 전혀 영향을 미치지 못했으며 GA₃ 1mg/l 를 처리하였을 때 배가 발아하였는데 하배축이 신장하여 유근이 발생하였으며 자엽은 그리 발달하지 못한 형태를 보였으며 성장조절물질이 처리되지 않은 MS 배지에서의 체세포배와 형태적인 차이를 보였다.

Table 1. Effect of growth regulators on somatic embryogenesis of *Hovenia dulcis*

Medium	Growth regulator(mg/l)	Somatic embryo induction rate(%)	Shape of somatic embryo
	BA 0.1 + 2,4-D 1	2.1	PEMs*
	BA 0.1 + NAA 1	8.2	PEMs
	NAA 0.5	1.0	directed somatic embryo
	NAA 2	2.1	PEMs
MS	NAA 5	8.9	directed somatic embryo
	2,4-D 0.5	6.7	PEMs
	2,4-D 1	10.0	PEMs
	2,4-D 2	6.3	directed somatic embryo
	2,4-D 5	2.2	directed somatic embryo

* PEMs(Pre-embryogenic cell masses)

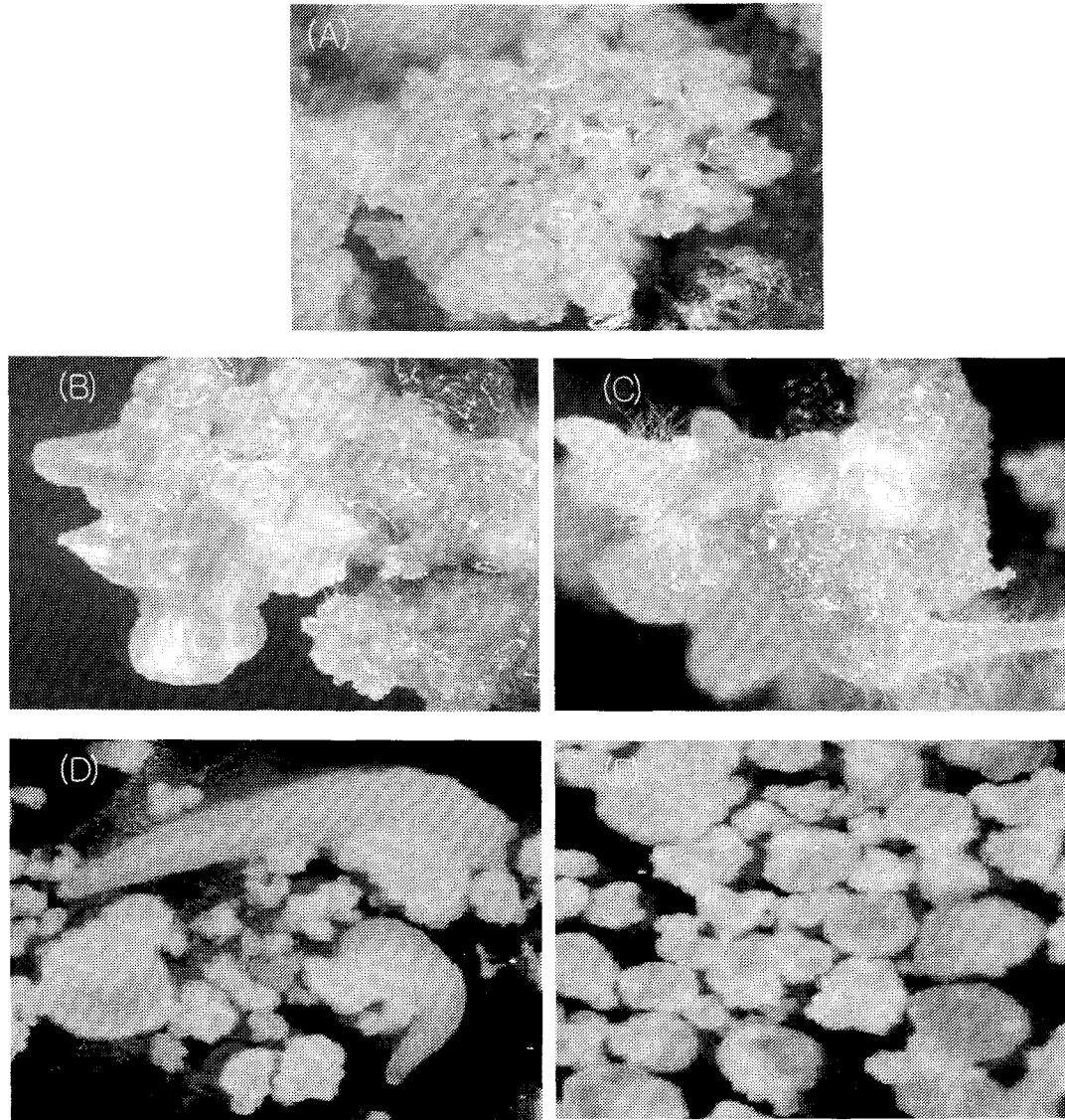


Fig. 1. Somatic embryogenesis of *Hovenia dulcis*

A : Pre-embryogenic cell masses(PEMs) B : Somatic embryo C : Germinated somatic embryo
 D : Germinated somatic embryo in suspension culture E : Somatic embryo in suspension culture

2. Shoot 유기

NAA가 처리된 배지에서 헛개나무의 잎과 자엽 절편을 배양하였을 때 상처 부위와 엽맥으로부터 캘러스 단계를 거치지 않고 직접 multiple shoot buds가 유기 되었다. Shoot 유기하는 배지와 성장조절물질의 농도를 조사하였다. NAA 단독 처리에서 0.5 mg/l 농도에서 43.7%로 shoot 형성율이 높았으며 절편체에서 shoot의 수도 2.8개로 가장 좋았으나 shoot 생장은 NAA 1 mg/l에서 0.6cm로 가장 좋았다.

WPM 배지에서는 MS 배지에서 배양 한 것에 비해 shoot 형성율은 낮았으나 shoot의 길이생장은 NAA 0.

5mg/l에서 0.8cm로 나타나 더 좋았다. WPM 배지 배양에서 sucrose 농도를 3%로 하였을 때 shoot 형성율 25.0%, 절편체 당 shoot 수 3.0개로 효율성이 높았으나 길이 생장에는 별로 관여하지 않은 것으로 나타났다.

NAA를 BA, TDZ과 조합처리 하였을 때(Table 2) shoot 형성율은 단독처리에 비해 저조했으나 절편체 당 shoot의 수와 생장은 더 높았다. Shoot 형성율은 BA 0.1mg/l+NAA 1mg/l의 조합처리에서 38.1%로 가장 높았으며 NAA 1mg/l+BA 0.1, NAA 1mg/l+BA 1mg/l, NAA 0.1mg/l+BA 1mg/l 처리에서 절편체 당의 shoot수가 4개 이상으로 NAA 단독처리에서 보다 높았다.

Table 2. Effect of NAA on shoot formation from *Hovenia dulcis* Thunb

Medium	NAA (mg/l)	Shoot induction rate (%)	No. of shoot per explant	Shoot height (cm)
MS	0.5	43.7	2.8	0.1
	1	23.3	2.6	0.6
	2	21.6	1.3	0.1
	5	4.0	2.5	0.5
WPM	0.5	30.9	2.5	0.8
	1	23.4	2.0	0.7
	2	18.4	2.0	0.3
WPM 3% sucrose	1	25.0	3.0	0.6
B ₅	1	25.7	2.0	0.9

Table 3. Effect of combination treatments of growth regulators on shoot formation from *Hovenia dulcis* Thunb

Medium	Growth regulator (mg/l)	Shoot induction rate (%)	No. of shoot per explant	Shoot height (cm)
MS	TDZ 0.1 + NAA 0.1	4.2	2.0	0.2
	TDZ 0.1 + NAA 1	4.6	1.0	0.1
	TDZ 0.1 + 2,4-D 1	10.7	1.0	0.3
	TDZ 1 + NAA 0.1	14.3	1.0	0.2
	BA 0.1 + NAA 0.1	4.3	2.0	0.6
	BA 0.1 + NAA 1	38.1	4.2	0.7
	BA 1 + NAA 0.1	18.1	4.0	0.8
	BA 1 + NAA 1	10.1	4.5	0.8
WPM	BA 0.1 + NAA 1	16.7	1.0	0.1
	BA 1 + NAA 0.1	8.4	4.0	1.0
B ₅	BA 0.1 + NAA 1	20.9	4.0	0.5

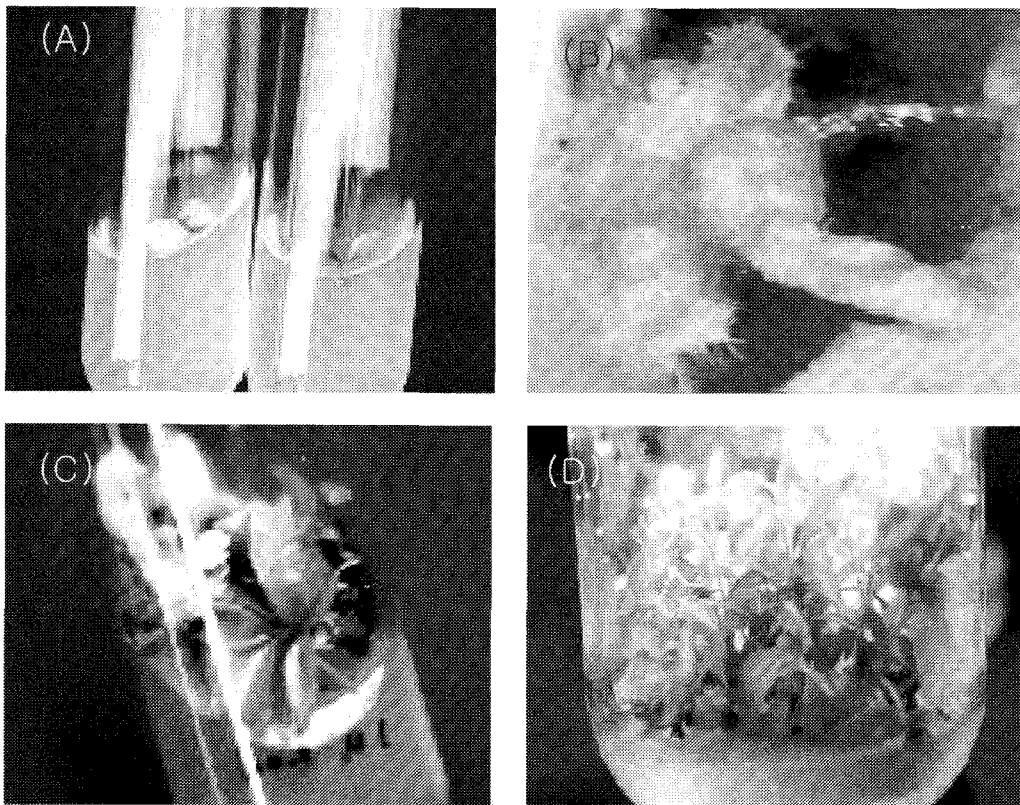


Fig. 2. In vitro culture of *Hovenia dulcis*

- A : Embryo culture.
- B : Shoot regenerated from leaf tissue.
- C : Shoot regenerated from explant after 2 months.
- D : Multiple shoots formed from node culture.

적 요

본 연구에서는 헛개나무 조직 배양에서 체세포배 유도 및 식물체 재분화를 위한 적절한 배지, 생장조절물질, 탄소원 그리고 배양 환경을 조사하였으며 대량 번식 시스템을 위해 체세포 배로부터 식물체로 재분화 하기 전 세포 동조화와 건실한 유묘 생산에 최적인 배양 조건을 조사하였다.

강원도 양양 헛개나무 자생지에서 채취한 종자를 배배양하여 기내 발아시킴으로 기내 식물체를 얻었으며 이를 본 실험에 이용하였다. 기내 발아 후 7-14일 된 식물체의 자엽과 잎 절편을 NAA를 처리한 배지에 배양했을 때 callus 상태를 거치지 않고 직접 shoot가 유기되었는데 NAA 0.5mg/l에서 43.6%로 형성율이 가장 높았으며 절편체 당 shoot의 수도 2.8개였다. NAA와 BA 조합처리하였을 때 BA 0.1mg/l + NAA 1mg/l에서 38.1%의 형성율을 보였으며 절편체 당 shoot의 수는 4개 이상으로 유기되었다.

체세포배는 NAA와 2,4-D의 단독처리 또는 BA와의 조합처리에서 발생하였으며 직접 체세포배 또는 배발생 캘러스가 형성하였다.

BA 0.1mg/l + 2,4-D 1mg/l 또는 BA 0.1mg/l + NAA 1mg/l에서 발생한 배발생 캘러스의 생장과 성숙 및 발아에 최적 배양 조건을 조사하였을 때 GA₃ 1mg/l을 처리하여 배 발아를 촉진시켰으며 자엽은 발달하지 못하고 하배축이 신장하여 유근이 발생한 형태의 유묘를 생산하였다.

감사의 글

본 연구결과는 과기처의 지역개발용역사업 <강원도 농산자원의 고부가가치 창출을 위한 핵심기술개발, 과제번호 0101029-1-1(2001213)>의 지원으로 수행된 것으로 심심한 사의를 표합니다.

LIERATURE CITED

Acharee R. and M. G. K. Jones 1998. Somatic embryogenesis and plantlet foramtion in *Santalum album* and *S. spicatum*. J. Experimental Botany. 49 : 563-571.

Bonneau L., N. Beranger-Novat and J. Monin 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration in a woody species : the European spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). Plant Cell Rep. 13 : 135-138.

Gricia-Luis A., Y. Bordon, J. M. Moreira-Dias, R. V. Molina and J. L. Guardiola 1990. Explant orientation and polarity determine the morphogenic response of epicotyl segments of Troyer citrange. Ann. Bot. 84 : 715-723.

Konan N. K., R. S. Sanwan and B. S. Sanwan 1994. Somatic embryogenesis from cultured mature cotyledons of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) : Identification of parameters influencing the frequency of embryogenesis. Plant Cell Tissue Organ Cult. 37 : 91-102.

Merkle S. A. 1995. Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. Plant Tissue Cult Biotechnol. 1 : 112-121

Michler C. H. and E. O. Bauer 1991. High frequency somatic embryogenesis from leaf tissue of *Populus* spp. Plant Sci. 77 : 111-118.

Moreira-Dias J. M., R. V. Molina, Y. Bordon, J. L. Guardiola and A. Garcia-Luis 2000. Direct and indirect shoot organogenic pathway epicotyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and in their response to light. Ann. Bot. 85 : 103-110.

Park Y. G. and S. H. Son 1988 Regeneration of plantlets from cell suspension derived callus of white poplar(*Populus alba* L.) Plant Cell Rep. 7 : 567-570.

Raemakers C. J., E. Tacobson and R. G. F. Visser 1995. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. Euphytica 81, 93-107.

Sondahl M. R., and W. R. Sharp 1977 Growth and embryogenesis in leaf tissues of *Coffea*. Plant Physiol. 59(6)