

구기자나무 (*Lycium chinense* Mill.) 접합자 배로부터 체세포배 및 부정아 발생

이재동^{1*} · 조덕이² · 소웅영¹

¹전북대학교 자연과학대학 생물과학부, ²우석대학교 이공대학 생명공학부

Somatic Embryogenesis and Adventitious Bud Formation from Zygotic Embryo of Boxthone (*Lycium chinense* Mill.)

LEE, Jae Dong^{1*} · CHO, Duck Yee² · SOH, Woong Young¹

¹Department of Biology, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea

²Department of Biology, WooSuk University, Chonju 560-701, Korea

ABSTRACT Somatic embryos or adventitious buds were formed from the segments of zygotic embryo of *Lycium chinense* Mill. on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with auxins (2,4-D, NAA, IAA) and / or cytokinins (zeatin, kinetin, BAP). Embryogenic callus formed on MS medium containing 0.5 mg/L 2,4-D and then differentiated into somatic embryos without transfer to hormone free medium. On the other hand, adventitious buds were formed on medium with 0.01 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L zeatin. Among various parts of zygotic embryos, the morphogenic potential was higher in the cotyledonary region, and the most organogenic potential was found in cotyledon followed by radicle, hypocotyl, and whole embryo. Histologically, bipolar structure of the heart-shaped embryos were confirmed and in adventitious buds only shoot apical meristems were found to exist.

Key words : Cotyledon, morphogenesis, tissue culture

서 론

가지과에 속하는 구기자나무의 열매와 껍질에는 betaine, zeaxanthin, physalein을 포함하고 있어 강장제, 해독제, 당뇨에 쓰이고, 뿌리인 지골피는 소염, 해열, 폐결핵 등에 널리 쓰이는 한약 재료로서 중요한 가치를 지니고 있는 경제 작물이다 (육 1982).

식물은 분화전능성을 갖고 있기 때문에 조직배양기술을 이용하여 체세포배 발생이나, 기관 분화를 통하여 모체식물과 동일한 식물체를 절편체로부터 얻어 낼 수 있다. 식물 조직배양에 첨가되는 성장조절물질과 배양 조건에 따라서 체세포배 발생 및 기관 분화가 결정되는 것으로 알려져 있다 (Skoog and Miller 1957). 식물은 거의 모든 부위에서 캘러스가 유도되나 기관 형성 분화능력은 각각 다를 수 있으며, 세포나 조

직에 따라서 식물체 재생 능력에 차이가 있고, 동일한 조직 내에서도 차이가 있는 것으로 알려져 있다 (Chu et al. 1984; Kato, 1974). 구기자나무의 엽육조직을 침으로 상처를 준 후 zeatin을 단독 처리한 3/2 MS 배지 조건에서 캘러스유도 없이 상처부위에서 식물체 줄기를 형성시킨 바 있으며, 위와 같은 조직으로부터 2,4-D와 BA를 조합 처리한 3/2 MS 배지에서 체세포배를 유도시키기도 하였다 (Kim et al. 1993). 또한 Kim 등(2001)은 우리나라 육성품종인 '청양재래' 구기자나무를 재료로 배양배지, 절편체의 종류 그리고 성장조절물질 별로 신초 분화에 대하여 보고한 바 있다. 그러나 접합자배를 이용한 연구보고는 아직 없는 실정이다.

본 연구에서는 성숙한 접합자배를 이용하여 여러 성장조절물질을 다양하게 조합 처리한 배양배지에 접합자배의 부위별 분화 양상을 조사하고, 대량증식과 종자 우량형질의 육종 및 인공 종자 개발 등의 산업적 이용을 시도할 수 있도록 하기 위하여 체세포배 발생과 높은 빈도의 식물체 재생의 조건을 밝혀보고자 수행하였다.

*Corresponding author Tel 016-651-5602 Fax 063-270-3362

E-mail jdlee1004@orgio.net

재료 및 방법

재료

직경 2.5~3 mm 크기의 '청양재래' 구기자나무 (*Lycium chinense* Mill.) 종자를 선별하여 70% 에탄올로 1분간 침적시키고, 1% sodium hypochlorite로 20분간 표면 살균한 후 멸균수로 5회 세척하였다. 무균대 내에서 해부현미경을 이용하여 접합자배를 분리하여 배 전체, 자엽, 배축, 유근, 자엽과 배축 및 배축과 유근 조직으로 각각 6부위로 나누어 배양의 재료로 사용하였다 (Figure 1).

배양조건

3% 서당과 0.8% 한천이 첨가된 MS 기본배지를 고압멸균전에 pH 5.8로 조정하였으며, 성장조절물질인 옥옥신 (2,4-D, NAA, IAA)과 싸이토키닌 (zeatin, kinetin, BAP)을 농도별로 단독 또는 조합 처리한 배지를 121°C, 1.2기압에서 15분간 고온 고압멸균 후 100 mL 삼각 플라스크에 40 mL씩 배지를 분주하였다. 삼각 플라스크 한 개당 4개의 절편을 치상하였으며, 10회 반복 실험하였다. 배양 재료를 이상과 같은 배지에 치상하여 25±1°C, 46 μmol m⁻²s⁻¹, 8시간 광주기의 조건하에서 배양하였다. 그 결과는 배양 7주 후에 통계 처리하였으며, 처음 배양 재료는 접합자배의 자엽 절편만을 사용하였고, 이후 배양 결과를 파악한 후 6부위로 다시 나누어서 조사한 결과를 Figure 2와 Figure 5에 재시하였다. 이 때 배양 기간은 7주로 정하였다.

해부학적 관찰

배양된 체세포배와 부정아를 선별하여 FAA (formalin :

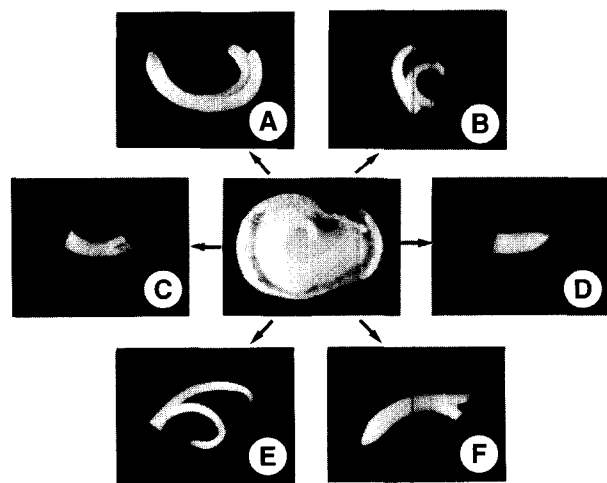


Figure 1. Various explants excised from zygotic embryos of *Lycium chinense* Mill. A, Whole embryo; B, Cotyledon; C, Hypocotyl; D, Radicle; E, Cotyledon and hypocotyl; F, Hypocotyl and radicle.

acetic acid : 95% ethanol : DW = 1 : 0.5 : 5 : 3.5)에 48시간 고정 후 n-butyl alcohol series의 탈수과정을 거쳐 파라프라스트에 포매시킨 후 로타리 마이크로톰을 이용하여 10 μm 두께의 절편을 만들었다. 만들어진 표본의 염색은 hematoxylin, safranin 그리고 fast green으로 삼원염색한 후 카나다발삼으로 봉입하여 영구표본으로 만들어 광학현미경하에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

접합자배의 자엽배양에 미치는 성장조절제의 영향

MS 배지에 옥옥신 (2,4-D, NAA, IAA)과 싸이토키닌 (zeatin, kinetin, BAP)을 단독 또는 조합 처리한 배지에 접합자배의 자엽만을 절취하여 7주간 배양하였을 때 저농도의 0.01 mg/L 2,4-D와 고농도의 5.0 mg/L 2,4-D에서는 배발생 능력이 없는 스폰지 형태의 캘러스만 형성되었다. 또한 1.0, 5.0 mg/L NAA 단독처리에서도 같은 결과를 보였다. zeatin 단독 처리, NAA + zeatin 및 IAA + zeatin을 조합처리하였을 때 단단한 캘러스만이 형성되었다. 또한 0.1 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L kinetin, 0.5 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L kinetin 그리고 1.0 mg/L 2,4-D + 2.0 mg/L kinetin 조건에서도 스폰지 형태의 배발생 능력이 없는 캘러스만이 형성되었다. 0.01 mg/L NAA + 0.1 mg/L kinetin 처리 구에서는 매우 적은양의 캘러스만이 형성되었다. 1.0 mg/L IAA 와 2.0 mg/L kinetin 처리구에서도 배발생 능력이 없는 캘러스만 유도되었다. BAP와 본 실험에서 사용한 옥옥신 (2,4-D, NAA, IAA)과의 조합처리 구에서는 모두 배 발생능력이 없는 캘러스만이 형성될 뿐이었다. 한편 0.01, 0.1, 0.5 mg/L NAA 단독처리 조건에서는 뿌리가 형성되었으

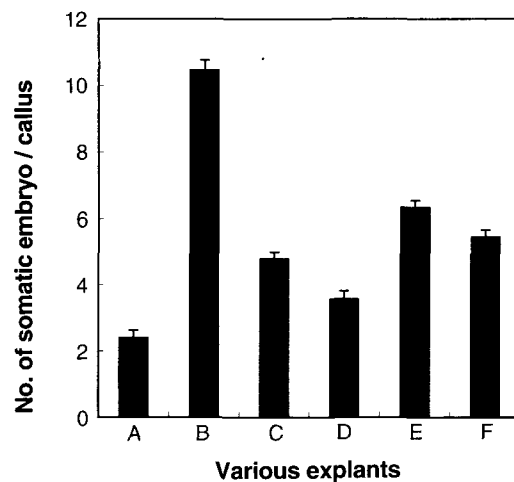


Figure 2. Formation of somatic embryos on the various explants of *Lycium chinense* Mill. on MS medium containing 0.5 mg/L 2,4-D for 7 weeks. A, Whole embryo; B, Cotyledon; C, Hypocotyl; D, Radicle; E, Cotyledon and hypocotyl; F, Hypocotyl and radicle. Data were obtained from ten independent replicates and vertical bars show standard deviations.

며, IAA 단독처리 조건에서는 모두 뿌리만 발생되었다. 또한 0.1 mg/L kinetin 단독처리에서도 뿌리가 발생되었으나, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L kinetin 처리 구에서는 자엽절편이 신장만 될 뿐이었다. 0.01 mg/L NAA + 0.1 mg/L kinetin 처리구 외의 다른 NAA와 kinetin 조합처리 구에서는 뿌리만 형성되었다. 0.01 mg/L IAA + 0.1 mg/L kinetin와 0.01 mg/L 2,4-D + 0.1 mg/L kinetin 조합처리 구에서는 자엽절편이 신장될 뿐이었으며, 0.1 mg/L IAA + 0.5 mg/L kinetin와 0.5 mg/L IAA + 1.0 mg/L kinetin 조합처리 구에서는 뿌리만 형성되었다 (Table 1).

체세포배 발생

접합자배의 자엽절편만을 7주간 배양하였을 때 0.5 mg/L 2,4-D 배지에서만 접합자배가 발생되었으며, 다른 2,4-D 단독 배지에서는 배발생 능력이 없는 캘러스만 관찰되었다. 이는 자엽절편의 내재되어있는 생리적인 요인 때문으로 사료된다. 절편에서의 발생 과정을 보면 처음 흰색의 부드러운 캘러스가 유도되고, 배양 후 계대배양을 하지 않은 상태의 4주 후에는 자엽절편에서 노란색의 체세포배 발생능력을 갖는 캘러스가 형성되었다. 그 후 1주 후에는 배발생 능력을 갖는 캘러스에서 적은 수의 체세포배가 발생되기 시작하였다. 또한 자엽절편에서는 최초 배양 7주 후에는 많은 양의 체세포배가 형성되었다 (Figure 3D). 이는 처음 2,4-D 단독배지 하에서 계대배양 없이 계속 배양한 결과이다. 또한 이러한 결과는 콩과식물의 동부와 벼과인 기장에서도 비슷한 결과를 보였다 (Chen et al. 1990; George and Eapen 1990). 이 때 접합자배의 6부위 (Figure 1)를 동일한 조건에서 7주간 배양하였을 때 자엽절편에서 10.46개의 체세포배가 형성되어 가장 효과적이었으며, 자엽과 배축 (6.32개), 배축과 유근 (5.48개), 배축 (4.78개), 유근 (3.56개) 그리고 배전체 (2.4개) 순으로 조사되었다 (Figure

2). 이러한 결과는 제라늄에서도 보고된 바 있다 (Chang et al. 1996). 또한 체세포배 형성을 위해서는 초기 배양시기에 오옥신의 종류와 농도가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Fujimura and Komamine 1980). 체세포배 발생은 여러 식물에서 발달단계별 및 기관별로 하배축 (Yasuda et al. 2000), 뿌리 (Akashi et al. 1998), 성숙한 잎 (Cho et al. 1998; Cho and Soh 1998), 화기 (Cho et al. 2000)에서 다양한 조직에서 수행되었다. 이들 중 본 실험에서와 같이 자엽으로부터 체세포배 발생에 관한 보고가 가장 많았다 (Choi et al. 1998; Kim et al. 2000; Lee et al. 2001). Kim 등 (1993)은 엽육절편에 상처를 줘서 3/2 MS 배지에 2,4-D와 BAP 조합처리 조건에서 배발생 캘러스와 체세포배를 유도시켰으나 본 실험에서는 MS 기본 배지에 2,4-D 단독처리 조건하에서 유도되었다. 발생된 세포괴로부터 체세포배가 형성됨을 알아보기 위하여 조직학적으로 관찰한 결과 처음 10개 미만의 세포에서부터 구상형, 심장

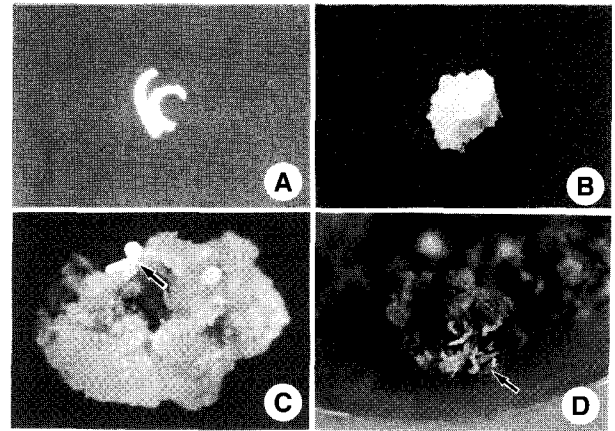


Figure 3. Induction of somatic embryos from the cotyledonary explants of *Lycium chinense* Mill. on MS medium containing 0.5 mg/L 2,4-D. A, Cotyledon; B, Embryogenic callus; C, Developing somatic embryos (arrow); D, Mature somatic embryos (arrow)

Table 1. Effects of plant growth regulators on somatic embryogenesis and adventitious bud formation in cotyledon explant cultures of *Lycium chinense* Mill. The explants were cultured on MS medium supplemented with various auxins (2,4-D, NAA, IAA) and cytokinins (zeatin, kinetin, BAP) for 7 weeks. (mg/L)

Cytokinin	Auxin	0	2,4-D					NAA					IAA				
			0.01	0.1	0.5	1.0	5.0	0.01	0.1	0.5	1.0	5.0	0.01	0.1	0.5	1.0	5.0
0	0	EL	C	C	SE	C	C	R	R	R	C	C	R	R	R	R	R
Zeatin	0.1	C	C						C				C				
	0.5	C	AB	C						C				C			
	1.0	C			GC						C				C		
	2.0	C				GC						C				C	
Kinetin	0.1	R	EL					C					EL				
	0.5	EL		C					R					R			
	1.0	EL			C					R					R		
	2.0	EL				C					R					C	
BAP	0.1	R	C					C					C				
	0.5	EL		C					C					C			
	1.0	EL			C					C					C		
	2.0	EL				C					C					C	

AB: adventitious bud, SE: somatic embryo, C: callus, GC: green callus, R: root, EL: elongation

형 그리고 어뢰형배 모두를 확인할 수 있었고 어뢰형배에서는 전형성층이 뚜렷하였으며, 다른 식물의 체세포배와 비슷한 형태를 하고 있었다 (Dodeman et al. 1997; Tanaka et al. 2000) (Figure 4D). 이때의 세포들은 크기가 작고 세포질 성분이 많음을 관찰할 수 있었다 (Konar et al. 1972).

부정아 형성

접합자배 자엽절편을 0.01 mg/L 2,4-D 와 0.5 mg/L zeatin이 조합처리된 배지에 배양하였을 때 처음 흰색의 캘러스가 형성된 후, 배양 4주 후에는 녹색의 캘러스가 나타나기 시작하였다 (Figure 6C). 구기자나무의 접합자배를 실험 재료로 하였을 때 세포괴당 80% 이상의 부정아가 형성된 것은 zeatin이 가장 적합한 것으로 보이며, 다른 연구와 같은 결과를 얻었다(Kim et al. 1993). 최초 배양 7주에는 녹색의 반점이 형성된 캘러스로부터 완전한 부정아가 형성되었으며, 소나무과에서도 같은 결과였다 (Ellis and Bilderback 1984). 이때 녹색의 반점에서 형성된 부정아의 성장 속도는 매우 다양하였다 (Figure 6D). 이때 광주기의 영향도 크게 작용을 한다 (Hachey et al. 1991). 접합자배의 6부위별 (Figure 1)로 배양한 결과 자엽과 배축이 포함된 절편에서 가장 낮은 1개의 부정아가 형성되었고, 자엽조직만이 있는 절편에서 유도되어진 녹색의 캘러스에



Figure 4. Section of somatic embryos at various developmental stages of *Lycium chinense* Mill. Cotyledon explants were cultured on MS medium containing 0.5 mg/L 2,4-D. A, Proglobular embryo; B, Globular embryo; C, Heart-shaped-embryo; D, Torpedo-shaped-embryo (arrow).

서는 3개 이상의 부정아가 형성되어 다른 어떤 절편보다 부정아 형성이 제일 양호함을 알 수 있었다 (Figure 5). 이는 자엽 내에 존재해 있는 내재 성장조절물질에 의한 것을 사료되며, 십자화과의 것에서도 같은 결과임을 알 수 있었다 (Fazekas et al. 1986). 접합자배의 6부위 중 발아에 중요한 영양원으로 작용하는 자엽절편이 다른 절편에 비해 부정아 및 체세포배 발생에 아주 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 이때 형성된 부정아를 MS 기본배지에 계대배양하여 뿌리를 유도하여 완전한 식물체로 재생시켰다 (Figure 6E). 이렇게 유도된 부정아를 조직학적으로 관찰한 결과 초기 캘러스 덩어리 내부에서 정단분열조직이 형성되어 점진적으로 캘러스의 외부로 녹색반점의 캘러스가 돌출되면서 어린 부정아가 형성되었다. 이렇게 발생된 부정아는 완전한 잎의 형태를 갖추고 있었으며, 전형성층과 정단분열조직이 뚜렷하게 분화되었음을 관찰할 수 있었다 (Choi et al. 2001; Ignacimuthu and Franklin 1999; Yang et al. 2001) (Figure 7C).

적 요

구기자나무의 접합배의 자엽절편을 MS 배지에 오옥신 (2,4-D, NAA, IAA)와 싸이토키닌 (zeatin, kinetin, BAP)를 단독 또는 조합처리하여 체세포배와 부정아를 유도하였다. 0.5 mg/L 2,4-D를 첨가한 배지에서 배발생능 캘러스를 유도되었고 이로부터 체세포배가 발생되었다. 반면에 부정아는 0.01 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L zeatin을 조합한 배지에서 발생하였다. 접합자배의 여러 부위별로 배양한 결과 자엽 절편이 가장 높은 형태형성을 보였으며, 기관형성은 자엽 > 유근 > 배축 > 배전체 순이었다. 해부학적으로 관찰한 결과 심장형배를 관찰할

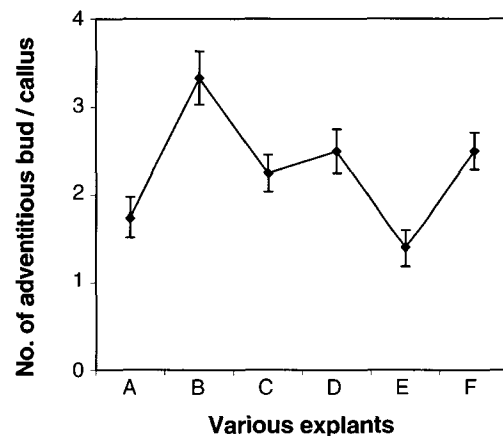


Figure 5. Adventitious bud formation from the various explants of *Lycium chinense* Mill. The explants were cultured on MS medium containing 0.01 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L zeatin for 7 weeks. A, Whloe embryo; B, Cotyledon; C, Hypocotyl; D, Radicl; E, Cotyledon and hypocotyl; F, Hypocotyl and radicle. Data were obtained from ten independent replicates and vertical bars show standard deviations.

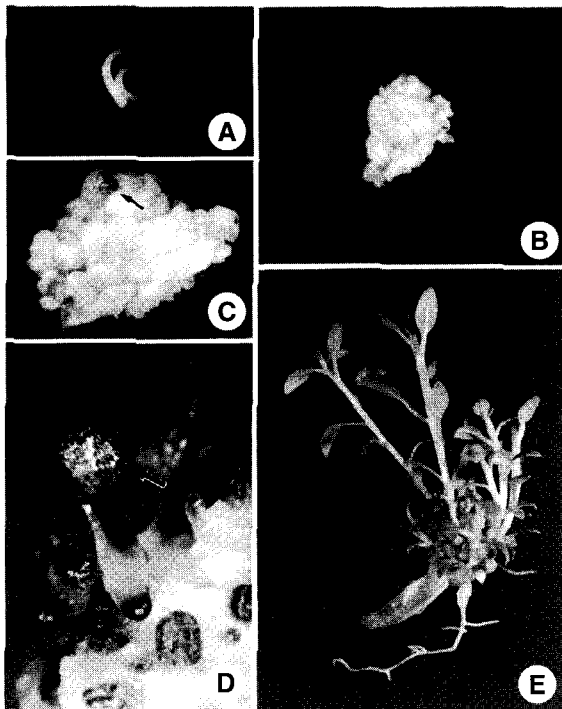


Figure 6. Plant regeneration via adventitious shoot formation from cotyledonary explants cultured on MS medium containing 0.01 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L zeatin in *Lycium chinense* Mill. A, Cotyledonary explant; B, White and friable callus; C, Green compact callus (4 weeks) (arrow); D, Adventitious bud formation from green callus (6 weeks) (arrow); E, Regenerated plantlets.

수 있었고 정단분열조직과 부정아를 확인할 수 있었다.

인용문헌

- Akashi B, Hoffmann-Tasay SS, Hoffmann F (1998) Selection of a super-growing legume root culture that permits controlled switching between root cloning and direct embryogenesis. *Theor Appl Genet* **96**:758-764
- Chang C, Moll BA, Evenson KB, Guiltinan MJ (1996) *In vitro* plantlet regeneration from cotyledon, hypocotyl and root explants of seed geranium. *Plant Cell Tiss Org Cult* **45**:61-66
- Chen HK, Mok MC, Mok DWS (1990) Somatic embryogenesis and shoot organogenesis from interspecific hybrid embryos of *Vigna glabrescens* and *V. radiata*. *Plant Cell Rep* **9**:77-79
- Cho DY, Lee EK, Soh WY (2000) Cotyledon structure and germinability of somatic embryos formed from inflorescence explants of *Cnidium officinale* M. *Kor J Plant Tiss Cult* **27**:137-142
- Cho DY, Lee EK, Soh WY (1998) Anomalous structure of somatic embryogenesis developed from leaf explant cultures of *Angelica gigas* Nakai. *Kor J Plant Tiss Cult* **25**:1-5
- Cho DY, Soh WY (1998) Plant regeneration from somatic embryos with structural diversity from leaf explant culture of *Ostericum koreanum* Kitagawa. *Kor J Plant Tiss Cult* **25**:51-56
- Choi YE, Katsumi M, Sano, H (2001) Triiodobenzoic acid, an auxin polar transport inhibitor, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Eleutherococcus senticosus*. *Plant Sci* **160**:1183-1190
- Choi YE, Yang DC, Park JC, Soh WY, Choi KT (1998) Regenerative ability of somatic and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone-free medium. *Plant Cell Rep* **17**:544-551
- Chu CC, Sun CS, Chen X, Zhang WX, Du ZH (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration in callus from inflorescences of *Hordeum vulgare* × *Triticum aestivum* hybrids. *Theor Appl Genet* **68**:375-379
- Dodeman VL, Ducreux G, Kreis M (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J Exp Bot* **48**:1493-1509
- Ellis DD, Bilderback DE (1984) Multiple bud formation by cultured embryos of *Pinus ponderosa*. *J Plant Physiol* **115**:201-204
- Fazekas GA, Sedmach PA, Palmer MV (1986) Genetic and environmental effects on *in vitro* shoot regeneration from cotyledon explants of *Brassica juncea*. *Plant Cell Tiss Org Cult* **6**:177-180
- Fujimura T, Komamine A (1980) Mode of action of 2,4-D and zeatin on somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Z Pflanzenphysiol* **99**:1-8
- George L, Eapen S (1990) High frequency plant-regeneration through direct shoot development and somatic embryogenesis

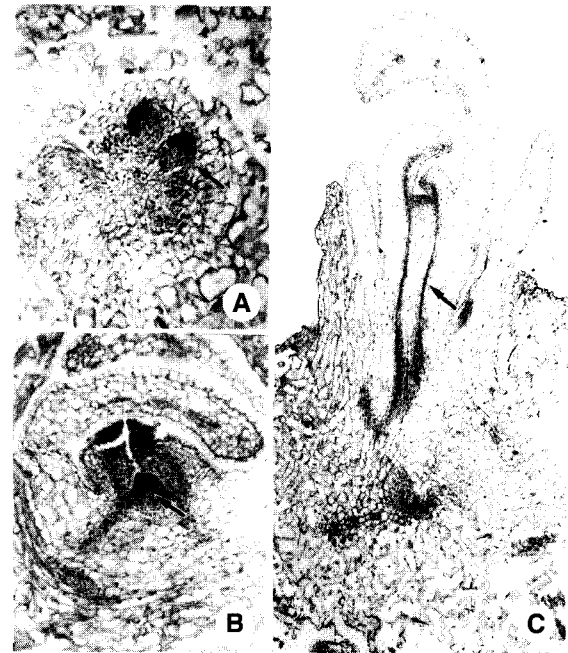


Figure 7. Longitudinal sections of adventitious buds formed on cotyledon explants cultured on MS medium containing 0.01 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L zeatin in *Lycium chinense* Mill. A, Meristematic cells (arrow); B, Structure of shoot apex and leaf primordia (arrow); C, Developing adventitious bud (arrow).

- from immature inflorescence cultures of finger millet (*Eleusine coracana* Gaertn). *Euphytica* **48**:269-274
- Hachey J.E, Sharma KK, Moloney MM** (1991) Efficient shoot regeneration of *Brassia campestris* using cotyledon explants cultured *in vitro*. *Plant Cell Rep* **9**:549-554
- Ignacimuthu S, Franklin G** (1999) Regeneration of plantlets from cotyledon and embryonal axis explants of *Vigna mungo* L. Hepper. *Plant Cell Tiss Org Cult* **55**:75-78
- Kato Y** (1974) Bud formation on excised Heloniopsis leaf fragments: Effects of leaf age and the midrib. *Plant Cell Physiol* **15**:363-372
- Kim BW, Choi MS, Roh KS, Park YG** (1993) Somatic embryogenesis from leaf callus of *Lycium chinense* Mill. *Korea J Plant Tiss Cult* **20**:91-96
- Kim DC, Chung HJ, Min BH, Yang DC** (2001) Plant regeneration leaf and internode segment cultures of boxthorn (*Lycium Chinense* Mill.) *Korea J Plant Tiss Cult* **28**:329-333
- Kim EY, Lee EK, Cho DY, Soh WY** (2000) Relationship between cell proliferation and somatic embryogenesis in cotyledon explant culture of carrot. *J Plant Bio* **43**:115-120
- Konar RN, Thomas E, Street HE** (1972) The diversity of morphogenesis in suspension culture of *Atropa belladonna* L. *Ann Bot* **36**:249-258
- Lee EK, Cho DY, Soh WY** (2001) Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue cultures of *Daucus carota*. *Plant Cell rep* **20**:408-415
- Murashige T, Skoog F** (1962) Arevised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:437-497
- Skoog F, Miller CO** (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue growth *in vitro*. *Symp Sco Exp Biol* **11**: 118-131
- Tanaka K, Kanno Y, Kudo S, Suzuki M** (2000) Somatic embryogenesis and plant regeneration in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura). *Plant Cell Rep* **19**:946-953
- Yang J, Hu Z, Guo GQ, Zheng GC** (2001) *In vitro* plant regeneration from cotyledon explants of *Swainsona salsula* Taubert. *Plant Cell Tiss Org Cult* **66**:35-39
- Yasuda H, Nakajima M, Masuda H, Ohwada T** (2000) Direct formation of heart-shaped embryos from differentiated single carrot cells in culture. *Plant Sci* **152**: 1-6
- Yook CS** (1982) Pharmacological component of chinese(herb) medicine. kye chook culture Co. pp:399-747

(접수일자 2002년 7월 22일)