

구기자나무의 절편체 부위와 품종 간 재분화 특성

김동찬* · 정해준¹ · 민병훈¹ · 양덕춘²

충남농업기술원 예산국화시험장, ¹배재대학교 원예조경학부, ²한국인삼연초연구원

Plant Regeneration from Explant Types and Cultivars 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 of leaf explants from *in vitro* propagated shoots and field grown plants depending on the position of leaf, and four boxthorn cultivars were investigated. Callus formation of explants from both *in vitro* shoot and field grown plants as easily achieved at the cut surfaces of explants but the callus formed from leaf of *in vitro* shoots was hardened as the duration of culture was proceed. Calli were effectively induced from leaves detached from the middle position of both *in vitro* and *in vivo* plants on MS medium containing 0.5 mg/L NAA with 0.2 mg/L BA, and the growth of calli were better in field grown leaves than *in vitro* grown leaves. Shoot formation were effectively induced from leaves detached from the upper position *in vivo* plants, and the middle parts of *in vitro* plants on MS medium containing 0.01 mg/L NAA with 0.2 mg/L BA. There was difference on the frequency of shoot formation among four different cultivars; 'Jindojaerae' was the best for shoot formation followed by 'Cheonyang', 'Younghagakija' and 'Cheongyangjaerae'.

Key words: Callus, internode, leaves, position, shoot formation,

서론

*Solanaceae*의 *Lycium*속은 우리나라와 중국, 일본, 대만 등 동남아시아 지역에 널리 분포하고 있다. 일반적으로 약용으로 이용되고 있는 구기자나무는 *L. chinense* Mill., *L. barbarum* L. 그리고 *L. halimifolium* Mill. 등이 있으며, 우리나라에서 재배되고 있는 것은 *L. chinense* Mill.이다. 재배품종은 재배 지역의 지명을 딴 재래종으로 청양재래, 진도재래, 금산재래, 진부재래, 해남재래 등이 있으며, 육성종으로는 유성 1호, 유성 2호, 청양, 불로, 장생 등이 있다. 이와 같이 다양한 품종을

갖고 있는 구기자나무의 조직배양 연구는 자엽, 배축 및 경정으로부터 캘러스와 신초를 유도하였고 (Lee et al. 1984; Li and Zhang 1990; Yakov et al. 1990), 정단조직 (Liu 1991)과 엽육조직 (Kim et al. 1993)으로부터 체세포배를 발생시켰으며, 형질전환 (Park et al. 1995; Lee et al. 2001) 등이 시도되었다.

식물체 재분화는 유전자형과 절편체의 종류에 따라 많은 차이가 있으나 (Fasolo et al. 1989; Fasolo and Predieri 1990), 구기자나무에서는 절편체 종류와 품종 간 재분화의 차이에 대해 보고된 바 없다. 따라서 본 연구는 구기자나무의 절편체 종류, 착생 부위 그리고 품종 간 재분화의 특징을 구명하고자 수행하였다.

*Corresponding author. Tel 041-333-1151

E-mail dckim62@hanmail.net

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 ± 1°C, 광도 2,500 lux, 18/6시간의 광주기로 배양하였다.

절편체 종류의 영향

절편체 종류는 비가림 하우스 (포장)에서 재배된 2년생 '청양'의 유엽과 무균배양 60일 후의 기내식물체의 유엽을 사용하였다. 포장에서 생육중인 구기자나무의 상단부의 잎을 70% 에탄올에 30초, tween 20이 첨가된 0.3% NaClO에 3분간 침지처리한 후 멸균수로 5회 수세하였다. 실험에 사용된 절편체는 중앙맥을 중심으로 0.5 cm × 0.5 cm 크기로 하여 BA (0, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L)가 첨가된 MS 배지에 치상하였다.

엽조직 부위별 영향

엽조직의 부위별 구분은 기내엽을 上部 (정단 3~5位葉), 中間 (정단 7~9位葉), 下部 (정단 11~13位葉)로 하였고, 포장엽은 上部 (정단 8~10位葉), 中間 (정단 20~22位葉), 下部 (정단 38~40位葉)로 구분하였다. 캘러스 유도과 신초 분화는 각각 0.5 mg/L NAA와 0.2 mg/L BA가 첨가된 MS 배지와 0.01 mg/L NAA와 0.2 mg/L BA가 첨가된 MS 배지를 9 cm 직경의 Petridish에 30 mL를 분주한 후 잎 절편을 10개씩 치상하여 처리당 3반복의 완전임의배치법으로 하였고, 4주간 배양한 후 캘러스 형성률과 생체중, 캘러스 형성률, 신초 분화율과 절편체당 신초 발생수를 조사하였다.

품종의 영향

시험에 사용된 품종은 청양재래, 청양, 진도재래와 영하구기자나무로 포장에서 생육중인 식물의 신초 상단부 잎을 표면 살균하였다. 캘러스 형성과 신초분화는 각각 MS 기본배지에 0.5 mg/L NAA와 0.2 mg/L BA, 0.01 mg/L NAA와 0.2 mg/L BA를 첨가하여 사용하였다. 배양용기는 시험관 (25 × 120 mm)에 10 mL의 배지를 분주한 후 절편체를 치상하였다. 캘러스 형성과 신초 분화는 각각 배양 4주와 6주 후에 생체중, 캘러스 형성률, 신초 분화율 그리고 신초 발생수를 조사

하였다.

결과 및 고찰

절편체 종류의 영향

기내엽과 포장엽 절편체의 캘러스 형성은 중앙맥과 엽맥부분의 상처부위에서부터 유도되기 시작하였다. 기내엽 절편체에서는 배양 7일경부터 0.2 mg/L BA 처리에서 유백색의 캘러스가 발생이 되었지만 배양기간이 경과될수록 작은 돌기모양을 띤 연녹색의 캘러스로 변화였고, 배양 4주 후 이들 돌기에서 다신초가 발생되었다 (Figure 1B). 그러나 BA 농도가 0.5 mg/L로 증가된 처리에서는 상처 부위에서 캘러스만 약간 발생되었고 (Figure 1C), 1.0 mg/L BA 처리에서는 캘러스의 발생이 매우 불량하였다 (Figure 1D).

포장엽 절편체에서는 기내엽 배양과는 달리 배양 5일경부터 절편체가 약간 커지고 팽대되기 시작하여 상처 부위에 돌기모양을 가진 캘러스가 형성되었으며, 배양 3주경 이들 캘러스로부터 신초가 발생되었다 (Figure 3B). 그러나 BA 농도가 증가된 처리에서는 신초가 발생되지 않았고 캘러스만 일부 유도되었다 (Figure 2C and D).

엽절편체 종류에 따른 캘러스 형성률은 포장엽 외식체보다는 기내엽 외식체가 양호하였고, 잎의 부위로는 상부가 중부와 하부보다 양호하였다. 캘러스의 생체중은 기내엽 외식체의

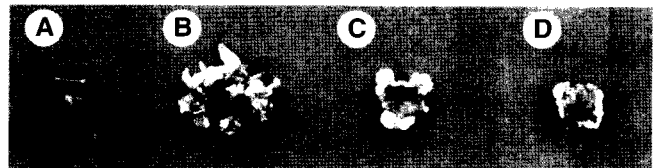


Figure 1. Effects of BA on the callus induction from *in vitro* leaf explants of boxthorn. Explants were cultured on MS medium without growth regulators (A), with 0.2 mg/L BA (B), 0.5 mg/L BA (C), and 1.0 mg/L BA (D), respectively, for 4 weeks.

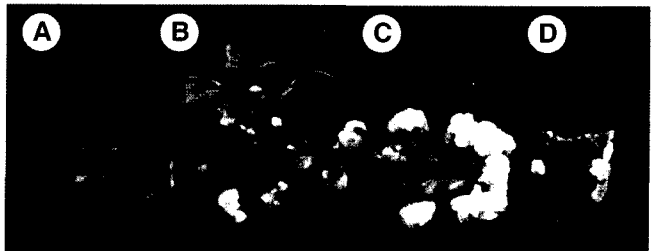


Figure 2. Effects of BA on the formation of the callus and shoot induced from field grown leaf explants of boxthorn. Explants were cultured on MS medium without growth regulators (A), with 0.2 mg/L BA (B), 0.5 mg/L BA (C), 1.0 mg/L BA (D), respectively, for 4 weeks.

경우 상부보다는 중간과 하부가 양호하였으나, 포장엽 외식체는 상부와 중간이 양호하여 잎의 종류와 위치에 따라 다른 양상을 보였다 (Table 1).

신초발생은 엽절편체의 위치가 상부일수록 배양 후 빨리 팽대되고 만곡되어 배지에 닿은 면에서 캘러스가 약간 형성되기 시작한 후 배양 15일경부터 작은 돌기모양의 부정형의 신초가 분화되었으며, 배양기일이 경과할수록 일부 절편체에서는 다수의 신초가 분화되는것이 관찰되었다. 엽절편체의 종류와 부위별 신초유도 반응은 기내엽의 중간 절편체에서 16개의 신초가 발생되었고 신초 형성률도 91.7%로 가장 높았으며, 생체중은 상부와 중간이 하부보다 무거웠다 (Table 2). 포장엽 절편체의 신초분화는 상부가 11.2개로 가장 많았고 중간에서는 5.0개로 저조하였으며, 하부에서는 전혀 발생이 되지 않았다. 신초 형성률은 상부에서 100%였고 중간은 23.1%로 낮았으며, 생체중은 상부의 엽절편체에서 가장 무거웠고 잎의 위치가 하부로 갈수록 낮아지는 경향을 보였다 (Table 2). 적색나무딸기의 경우 재분화율이 엽절편체에서는 46%였고, 줄기절편체에서는 15%로 품종 및 배양부위에 따른 재분화율의 차이가 있었으며 (McNicol and Graham 1990), *Oxalis tuberosa*의 마디와 엽병 배양에서는 정단에서부터 4~6번째의 절편체에서 신초분화가 가장 좋았는데 (Khan et al. 1988), 본 실험에서도 하부보다는 상부와 중간

의 엽절편체에서 신초 분화율이 높게 나타났다. 이러한 원인은 배양에 사용된 절편체의 생리적인 나이에 따른 분화능의 차이로 생각된다.

품종의 영향

포장에서 생육중인 신초 상단부 앞에서의 품종별 캘러스 형성은 배양 7일경부터 절편체의 중앙맥 상치부위에서 유도되기 시작하였으며, 배양기일이 경과할수록 급속하게 증식하였다 (Figure 3). 배양 4주 후 '진도재래'와 '청양구기자'에서 유도된 캘러스는 연녹색의 돌기모양으로 변하였으나 (Figure 3B and C), '청양재래'와 '영하구기자'는 표면에 흰 솜털을 가진 단단한 캘러스로 변하였다 (Figure 3A and D).

품종별 캘러스 형성률은 '진도재래'와 '영하구기자'에서 각각 100% 유도되었으나, '청양재래'는 75.1%로 다소 저조하였다. 생체중도 '진도재래'가 794.2 mg으로 가장 높았으며, '청양재래'는 501.8 mg으로 캘러스 생육도 저조하였다. 또한 '진도재래'는 일부 절편체에서 캘러스, 신초 그리고 뿌리가 발생되어 성장 반응이 왕성함을 알 수 있었다 (Table 3).

'진도재래', '청양' 그리고 '영하구기자'는 치상 후 엽절편체가 팽대되어 중앙맥과 엽맥에서 연녹색의 작은 돌기모양을 띤 캘러스가 형성되었으며, 배양기일이 경과할수록 이들 캘러스

Table 1. Callus formation depending on different explant sources and leaf positions of boxthorn 'Cheongyang'.

Explant ^z	Position	Callus formation (%)	Frwt (mg/explant)
<i>In vitro</i> leaf	Top	95.1	319.1 ± 24.6 ^y
	Middle	80.4	340.3 ± 28.7
	Base	84.8	339.2 ± 26.0
Field grown leaf	Top	55.2	582.2 ± 28.1
	Middle	30.3	591.9 ± 30.1
	Base	29.8	557.2 ± 22.2

^zCultured on MS medium containing 0.5 mg/L NAA and 0.2 mg/L BA for 4 weeks.

^yStandard error.

Table 2. Number of shoot and frequency of shoot formation induced from different explants^z of boxthorn 'Cheongyang'.

Explant	Position	No. of shoots /explant	Shoot formation (%)	Frwt ^y (mg/explant)
<i>In vitro</i> leaf	Top	12.4 ± 2.4 ^x	85.7	197.1 ± 25.2
	Middle	16.0 ± 1.8	91.7	195.3 ± 15.6
	Base	13.3 ± 2.1	55.6	142.1 ± 10.1
Field grown leaf	Top	11.2 ± 0.9	100	136.2 ± 11.0
	Middle	5.0 ± 2.3	23.1	90.1 ± 7.1
	Base	0	0	53.7 ± 2.5

^zCultured on MS medium containing 0.01 mg/L NAA and 0.2 mg/L BA for 6 weeks.

^xContained shoot and callus per explant.

^yStandard error.

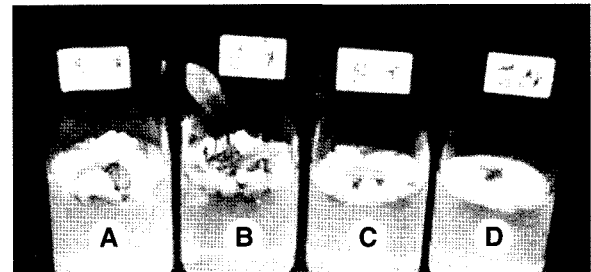


Figure 3. Callus induction from the field grown leaf explants of boxthorn varieties, 'Cheongyangjaerae' (A), 'Jindojaerae' (B), 'Cheongyang' (C), and 'Yeong-hagukija' (D) cultured on MS medium containing 0.5 mg/L NAA and 0.2 mg/L BA, respectively, for 4 weeks.

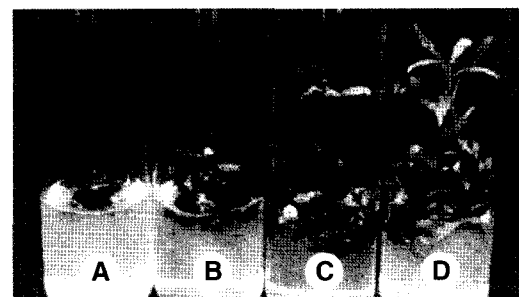


Figure 4. Shoot formation from the field grown leaf explants of boxthorn varieties, 'Cheongyangjaerae' (A), 'Jindojaerae' (B), 'Cheongyang' (C), and 'Yeong-hagukija' (D) cultured on MS medium containing 0.01 mg/L NAA and 0.2 mg/L BA, respectively, for 6 weeks.

Table 3. Effects of varieties of boxthorn on the callus formation and fresh weight of callus induced from leaf explant cultured on MS medium containing 0.5 mg/L NAA and 0.2 mg/L BA for 4 weeks.

Variety	Callus formation (%)	Frwt ^z (mg/explant)
Cheongyangjaerae	75.1	501.8±33.1 ^y
Jindojaerae	100	794.2±26.3
Cheongyang	94.7	669.3±19.0
Younghagukija	100	634.0±19.9

^zGained the fresh weight including both leaf and callus.^yStandard error.**Table 4.** Effects of varieties of boxthorn on shoot formation from leaf explants cultured on MS medium containing 0.01 mg/L NAA and 0.2 mg/L BA for 6 weeks.

Variety	Shoot formation (%)	No. of shoots /explant	Frwt ^z (mg/explant)
Cheongyangjaerae	6.7	2.0±0.3	116.3±7.8 ^y
Jindojaerae	90.2	46.0±4.1	985.6±69.6
Cheongyang	75.4	26.5±2.8	376.9±36.8
Younghagukija	94.5	11.8±1.3	585.0±41.6

^zGained the fresh weight including both leaf and callus.^yStandard error.

스와 엽절편체에서 직접 신초가 발생하는 것이 관찰되었다 (Figure 4). '영하구기자'는 중앙맥을 중심으로 윗부분과 아래 부분에서 직접 다수의 신초가 분화되었고 일부 절편체에서는 뿌리도 함께 발생되었으나 (Figure 4D), '청양재래'는 일부 절편체에서만 신초가 발생되었을 뿐만 아니라 생육 또한 저조하였다 (Figure 4A).

신초 발생률은 '영하구기자'와 '진도재래'가 각각 94.5%와 90.2%로 높았으나, '청양재래'의 경우 6.7%로 매우 저조하였다. 또한 '진도재래'의 경우 신초 발생률은 '영하구기자'보다 낮았지만 신초 발생수가 많아 생체중이 높게 나타났으며, 같은 재래종에서도 '진도재래'가 '청양재래'보다 분화능이 매우 높은 것을 알 수 있었다 (Table 4).

신초의 분화는 종·속간뿐만 아니라 품종간에도 많은 차이가 있으며, 식물의 생리적 요건 및 배양환경에 따라서도 차이가 있는 것과 같이 (Phillips and Hubstenberger 1985; Torres 1989), 구기자나무에서도 품종에 따라 신초 분화의 차이가 있는 것으로 나타났다.

적 요

구기자나무 (*Lycium chinense* Mill.)의 절편체 종류, 엽절편체의 착생 부위별 그리고 품종 간 캘러스 형성과 신초분화의 특징을 조사하였다. 기내식물체의 잎과 포장엽 절편체에서의 캘러스는 쉽게 유도되었으나, 기내엽 절편체에서 유도된 캘러스는 배양기간이 경과되면서 딱딱하게 변하였다. 잎의 착

생 위치에 따른 캘러스 발생은 포장엽 및 기내엽에서 모두 중간이 양호하였고, 캘러스의 생체중은 기내엽보다는 포장엽 절편체가 더 좋았다. 신초 분화는 중간 부위의 기내엽과 상부위의 포장엽이 양호하였다. 품종간 신초 분화는 '진도재래', '청양', '영하구기자' 그리고 '청양재래' 순으로 양호하였다.

인용문헌

- Fasolo F, Predieri S (1990) Cultivar dependent responses to regeneration from leaves in apple. *Acta Hort* 280:61-68
- Fasolo F, Zimmerman RH, Fordham I (1989) Adventitious shoot formation on excised leaves of 'in vitro' grown shoot of apple cultivars. *Plant Cell Tiss Org Cult* 16:75-87
- Khan MRI, Heyes JK, Cohen D (1988) Plant regeneration from oca (*Oxalis tuberosa* M.): the effect of explant type and culture media. *Plant Cell Tiss Org Cult* 14:41-50.
- 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 JS, Kwon KW, Bae CH, Yang DC (2001) Advanced regeneration and genetic transformation of *Lycium chinense* harboring salt tolerance genes. *Kor J Plant Tiss Cult* 28:47-52
- 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*, vol 6, 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.
- 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, Choi MS, Kim BW, Chung WI, Noh KS (1995) Factors affecting introduction of *rol C* gene in *Lycium chinense* Mill. *Kor J Plant Tiss Cult* 22:329-334
- Phillips GC, Hubstenberger JF (1985) Organogenesis in pepper tissue cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* 4:261-269.
- Torres KC (1989) *Tissue culture techniques for horticultural crops*, pp 26-51. Van Nostrand Reinhold. New York.
- Yakov IR, Vladimir AR, Nickolai MP (1990) Regeneration of *Lycium barbarum* L. plant from leaf tissue, callus culture and callus protoplasts. *Plant Cell Rep* 9:84-87