

헛개나무의 캘러스 형성 및 multiple shoot 유도

엄승희, 강원희, 신동용, 허권, 최원철¹⁾, 이현용²⁾, 유창연*
강원대학교 농업생명과학대학, ¹⁾광혜원 한방병원, ²⁾강원대학교 바이오산업부

Callus formation and multiple shoot induction of *Hovenia dulcis* Thunb.

Seung Hee Eom, Won Hee Kang, Dong Yong Shin, Kwon Heo, Won Cheol Choi

Hyeon Yong Lee¹⁾, and Chang Yeon Yu*

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

¹⁾ Kwanghyewon Medical Foundation Cancer Center, Inchon, Korea,

²⁾ School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

ABSTRACT

Leaves, stems, cotyledons, and roots of *Hovenia dulcis* Thunb grown in test tube were cultured on media containing different concentrations of single or combined growth regulators. In MS media containing 2mg/l BA, the shoot formation rate was 98.5% and it was the highest frequency of shoot formation. MS media showed most efficiency in the shoot formation at 0.01mg/l TDZ for the callus formation, but the color of callus changed to brown at a higher concentration of TDZ. Callus formation was 89.% at 0.5mg/l 2,4-D, but IAA, IBA, and NAA were not effective on the formation of callus. Calli were formed only on wound area when IAA, IBA, and NAA were added into MS media.

Combined growth regulators (BA + auxin) were more effective in roots and nodes than leaves and cotyledons on the formation of shoot. More than 97% of shoot formation was obtained on MS media containing BA and auxin. For the production of multiple shoot, nodes of *Hovenia dulcis* were used and effect of growth regulators on the formation of multiple shoot was evaluated on MS media. Highest shoots (5.3) of *Hovenia dulcis* were induced on MS media supplied with 0.1mg/l BA and 0.1mg/l NAA, and an average of 6.4 shoots per explant were obtained in 1/2 MS media containing same concentration and growth regulators. An average of 7 shoots per explant after 4 weeks of culture from nodes of *Hovenia dulcis* was produced on a woody plant medium(WPM) containing 0.1mg/l BA and 0.1mg/l NAA. Shoot length was 6.0 cm in average.

Key words : Callus formation, *Hovenia dulcis*, node, multiple shoot, growth regulator

서언

갈매나무과(Rhamnaceae)에 속하는 헛개나무 (*Hovenia dulci* Thunb)는 낙엽교목(落葉喬木)으로 높이가 10m 안팎이고 한자로는 지구 또는 괴조라 한다. 분포는 강원도, 황해도 이남의 산중턱에 자라는 낙엽교목이다. 잎은 호생하고 넓은 난형 또는 타원형이며 7월에 백색 꽃이 피고, 지름은 약 7mm 내외이다. 10월에 열매가 성숙되며 핵과(核果)는 둥글고 갈색이 돌며 3실(室)에 각각 1개의 종자가 들어 있고 과경은 불규칙하게 울퉁불퉁 살이 쪼다(고, 1993; 임, 1990; 김 등, 2001).

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, 과경은 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, 변열, 목마름, 구토증 등의 치료와 대소변을 잘 통하게 한다고 하였다.

국내에서는 헛개나무의 껍질, 목부, 열매, 그리고 열매의 껍질에서 간의 해독과 항암의 활성이 있는 천연물을 추출하여 성분분석과 이용 가능성이 검토되고 있다. (Lee *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000, 문 등, 2001a, 2001b; 김 등, 1998; 박 등, 2000; 심과 정, 1999). 또한, 헛개나무의 탁월한 알콜 분해능과 그 외의 효능으로 민간에서 생약으로 이용되고 있다. 그러나 우리의 여러 자생식물들이 그러하듯이 헛개나무도 자생하고 있는 자생지에서 무분별하게 채취되고 있으며 그 수요를 따르지 못해 상당량이 중국에서 수입되어 이용되고 있다. 그러므로 헛개나무의 안정적인 공급을 위해 종묘의 대량 번식 및 육종이 연구되어야 한다. 헛개나무의 대량생산을 위하여 생리생태적 특성을 밝히고 종자의 발아율 향상과 발아기간 단축을 위한 연구(Lee *et al.*, 2001)가 보고된 바가 있다. 국내학회지에 발표된 헛개나무에 관

한 연구는 대부분이 성분분석 및 성분의 기능성 분석이고, 그 외에는 생태, 종자 및 광합성생리, 그리고 Eom *et al.*(2002)이 보고한 헛개나무의 체세포발생 및 식물체 재분화에 의한 헛개나무의 대량생산 체계확립이 있을 뿐이다. 본 연구에서는 대량증식 가능성을 연구하기 위하여 수행하였다. 헛개나무에 대한 조직 배양 연구는 극소수를 제외하고는 우리나라에서 많이 되어 있지 않기에 캘러스 형성 및 multiple shoot 유도를 위한 적절한 배지, 성장조절물질, 탄소원 및 배양 환경을 조사하였다.

재료 및 방법

헛개나무(*Hovenia dulcis* Thunb)의 열매는 강원도 양양군 자생지에서 채취하였으며 이를 본 실험에 사용하였다. 황산 원액에 20분 동안 침지시켜 과피를 제거한 후 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 배배양하였으며 이를 통해 얻어진 식물체의 조직을 배양 재료로 이용하였다. 배양 조건은 25, 16 시간의 광과 8시간 암 조건하로 하였다.

1. 배지 조제

기본 배지로 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. 캘러스 유기

각 성장조절물질의 절편체 부위에 따른 캘러스 형성율을 조사하기 위해 배배양을 통해 얻어진 기내 식물체의 자엽, 잎, 줄기, 뿌리를 절취하여 상처

Table 1. Effect of single treatment of growth regulators on callus formation of *Hovenia dulcis* after 4 weeks

Growth regulator(mg/)	BA	TDZ	IAA	IBA	NAA	2,4-D
0.01	40.3±2.0	92.0±2.3	-	-	8.9±2.0	20.7±0.8
0.05	-	84.3±0.9	-	-	-	-
0.1	58.0±1.9	90.5±1.7	75.2±0.8	98.9±1.1	33.1±1.1	72.2±1.6
0.5	75.3±1.3	80.1±1.4	66.0±1.3	64.6±1.4	58.2±2.6	89.0±1.0
1	60.5±0.6	-	56.6±0.2	61.5±1.3	56.1±2.2	77.8±1.6
2	98.5±1.3	-	-	49.9±0.3	52.1±2.2	78.6±1.2
5	98.3±1.8	-	-	-	53.0±2.3	47.4±0.9
LSD			3.1			

Table 2. Effect of combination treatments of growth regulators and explants on callus formation of *Hovenia dulcis* after 4 weeks

Medium	Growth regulator mg/		Explant			
			Leaf	Cotyledon	Stem	Root
MS	BA 0.1	+ NAA 0.1	91.1±1.2	99.0±1.5	98.9±1.8	82.5±0.7
		+ NAA 1	93.0±2.2	87.0±2.2	98.2±1.9	98.4±2.6
		+ IAA 0.1	77.2±2.2	98.5±1.6	98.4±1.7	99.2±2.4
		+ IAA 1	97.6±1.4	83.9±0.9	99.8±0.3	100.0±0.0
		+ IBA 1	76.2±3.1	85.9±0.9	99.1±1.5	98.3±1.5
		+ 2,4-D 0.1	92.8±3.0	87.4±1.7	98.1±1.7	85.9±1.0
		+ 2,4-D 1	97.7±2.7	99.6±0.7	99.2±1.4	100.0±0.0
	BA 1	+ NAA 0.1	98.1±1.7	98.4±1.4	99.5±0.8	99.5±0.9
		+ NAA 1	94.3±2.5	99.1±1.6	97.8±1.2	100.0±0.0
		+ IBA 0.1	91.8±1.6	72.2±0.7	97.5±1.6	97.9±1.8
	TDZ 0.1	+ NAA 0.1	59.6±1.5	42.4±1.5	42.9±0.2	72.2±0.7
		+ NAA 1	71.9±1.6	84.4±2.1	45.5±2.8	72.8±1.4
		+ 2,4-D 1	97.8±1.9	68.2±2.0	100±0.0	100±0.0
	TDZ 1	+ NAA 0.1	82.4±0.3	62.5±0.4	72.8±1.7	55.6±2.7
		+ NAA 1	70.8±1.6	50.8±1.4	66.2±0.8	51.4±1.3
		+ 2,4-D 1	99.5±0.9	97.1±2.3	98.5±0.8	96.4±0.6
	LSD		3.4	2.3	2.0	2.7

를 낸 후 다음 배지에 치상 하였다. 성장조절물질은 cytokinin류인 BA 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2, 5 mg/ , TDZ 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/ 과 auxin류 계통인 IAA 0.1, 0.5, 1, 2 mg/ , IBA 0.1, 0.5, 1, 2 mg/ NAA 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2, 5 mg/ , 2,4-D 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2, 5 mg/ 의 농도로 단독 처리하였다. Cytokinin류인 BA, TDZ 0.1, 1mg/ 과 auxin류인 IAA, IBA, NAA, 2,4-D 0.1, 1 mg/ 를 조합 처리하였다. 배양 5주에서 6주 후

캘러스 형성을 조사하였다.

3. 마디 배양을 통한 multiple shoot 유도

성장조절물질에 의해 유도되어지는 multiple shoot는 종묘의 대량 생산을 기대할 수 있다. Multiple shoot 형성율을 높이기 위해 기본배지로는 MS, 1/2MS, WPM배지를 사용하였으며 성장조절물질은 무처리 및 BA, TDZ 0.1, 1 mg/ 과 NAA 0.1, 1

Table 3. Effect of growth regulators on multiple shoot formation from node culture of *Hovenia dulcis* Thunb

Growth regulator (mg/)	Shoot height(cm)	No. of shoot/explant	Root length (cm)	No. of root/explant	Root induction rate(%)
BA 0.1	1.7±0.2	1.9	2.1	4.8	41.9
BA 1	1.1±0.5	1.3	0.5	1.5	5.6
NAA 0.1	2.1±0.3	4.0	0	0	0
NAA 0.5	1.7±0.2	3.0	0	0	0
NAA 1	3.0±0.2	3.5	0	0	0
BA 0.1 +NAA 0.1	2.4±0.1	5.3	0	0	0
BA 0.5 +NAA 0.1	1.2±0.1	1.0	0.7	3.0	22
BA 1 +NAA 0.1	1.3±0.6	4.5	0	0	0
LSD	0.6	0.6	-	-	-

Table 4. Shoot formation from node culture of *Hovenia dulcis* Thunb.

Medium	Growth regulator (mg/)	Shoot height(cm)	No. of shoot/explant	Root length (cm)	No. of root/explant	Root induction rate(%)
1/2MS	-	0.8 0.1	2.4	0.8	5.0	32.0
	BA 0.1	+NAA 0.1	2.7±0.2	6.4	2.2	1.8
	LSD		0.9	0.4	-	-
WPM	-		1.7±0.2	1.7	1.8	1
	BA 0.1	+NAA 0.1	6.3±0.3	7.0	0	0
	BA 1	+NAA 0.1	1.4±0.2	1.0	0	0
	BA 0.1	+NAA 1	3.2±0.3	6.5	0	0
LSD		0.4	0.5	-	-	-

mg/ 단독 또는 조합처리 하였으며 4주 간격으로 계대배양 하였다. 배양 4주 후 multiple shoot 형성을 및 shoot 성장율을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 캘러스 유기

기내 발아한 헛개나무의 잎, 자엽, 줄기, 뿌리를 절취하여 상처를 낸 후 배양을 했을 때 배지 종류와 성장조절물질의 종류 및 처리 농도가 캘러스 형성에 미치는 영향을 조사하였다.

MS(Murashige and Skoog) 배지에서 성장조절물질을 단독처리 하였을 때 배양 1주 후 상처 부위에서 캘러스가 형성되기 시작했으며 배양 4주 후 캘러스

형성율은 Table 1과 같다. BA 2mg/ 을 처리하였을 때 캘러스 형성율이 98.5%를 보임으로써 가장 좋은 결과가 나왔다. TDZ의 0.01mg/ 에서 캘러스 형성에 가장 효율적이었으며 더 높은 농도에서는 장기간 배양했을 때 갈변하였다. Auxin 계통의 성장조절물질 처리 시 2,4-D 0.5mg/ 에서 89.9%로 캘러스 형성율이 가장 높았으며 IAA, IBA, NAA 처리 시 캘러스 형성율이 낮았으며 상처 부위에서만 캘러스가 형성되었다. 기내 배양 된 헛개나무의 각 부위별 잎, 자엽, 줄기, 뿌리를 다음 cytokinin과 auxin이 조합 처리된 배지에 치상하였으며 배양 4주 후 캘러스 형성을 조사하였다(Table 2). MS 기본 배지에 cytokinin 계통인 BA, TDZ 0.1, 1mg/ 과 auxin 계통인 IAA, IBA, NAA, 2,4-D 0.1, 1 mg/ 를 조합 처리하였다.

Table 2에 나타나듯이 BA와 auxin 계통 성장조절물질을 조합 처리했을 때 잎과 자엽에 비해 줄기와 뿌리에서 캘러스 형성율이 높았으며, 특히, 모든 처리에서 줄기 절편체를 배양했을 때 97%이상의 캘러스 형성율을 보였다. BA 0.1mg/와 2,4-D 0.1, 1mg/의 조합처리에서 잎 절편을 배양했을 때 각각 92.6%, 92.4%의 캘러스 형성율을 보였으며 뿌리가 분화되었으며 하얗고 부서지기 쉬운 형태의 캘러스를 형성하였다. IAA, IBA 조합처리 하였을 때에도 역시 뿌리가 발생한 캘러스가 형성되었다.

2. 마디 배양을 통한 multiple shoot 유기

헛개나무의 마디 배양을 통한 식물체의 대량 생산을 위해 multiple shoot 형성을 위한 최적 배지와 성장조절물질을 조사하였다. 배양 4주 후 MS 배지에서 BA 0.1mg/ +NAA0.1mg/ 에서 shoot의 수가 5.3개로 가장 높았으며 1/2 MS 배지에서도 동일한 성장조절물질 처리에서 6.4개로 mutiple shoot 형성이 좋았다. WPM 배지의 BA 0.1mg/ +NAA0.1mg/ 에서 절편당 shoot가 7개였으며 shoot의 길이 생장은 6.0cm 로 가장 높았다.

적 요

본 연구에서는 헛개나무 조직 배양에서 체세포 배 유도 및 식물체 재분화를 위한 적절한 배지, 성장조절물질, 탄소원 그리고 배양 환경을 조사하였으며 대량 번식 시스템을 위해 체세포 배로부터 식물체로 재분화 하기 전 세포 동조화와 건설한 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/ 에서 43.6%로 형성율이 가장 높았으며 절편체 당 shoot의 수도 2.8개였다. NAA와 BA 조합처리하였을 때 BA 0.1mg/ + NAA 1mg/ 에서 38.1%의 형성율을 보였으며 절편

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

사 사

본 연구는 과기부의 지역개발용역사업(강원도 농산자원의 고부가치 창출을 위한 핵심기술개발, 과제번호 0101029-1(2001213)의 지원으로 수행된 것으로 이에 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).
- 고경식 1993. 야생식물 생태도감. 석성문화사.
- 김영길, 이미경, 김태환, 이현용, 이진하 1998. 강원도 양양산에 헛개나무 추출물의 미생물과 동물세포를 이용한 항암 및 항돌연변이 활성 비교. *추계학술발표대회.* pp. 257-258.
- 김세현, 나천수, 김만조, 정남철 2001. The Characteristics of Propagation and Distribution of *Hovenia dulcis* Thunb var. *Koreana* Nakai. *한국임학회. 하계총회 및 학술연구발표회.* PP. 123-124.
- 문혜연, 최명철, 문지은, 이인순 2001a. 헛개나무 (*Hovenia dulcis* Thunber var. *Koreana* Nakai.) 추출물이 손상된 간 조직에 미치는 생리적 효과. *한국생물공학회.* pp. 251-254.
- 문혜연, 최명철, 이인순, 황현익 2001b. 헛개나무 (*Hovenia dulcis* Thunber var. *Koreana* Nakai.) 추출물이 alcohol 및 acetaldehyde의 분해에 미치는 생화학적 효과. *한국생물공학회. 춘계학술발표* pp. 247-250.
- 박근형, 문제학, 조정용 2000. 헛개나무 열수추출물로부터 항산화 및 항미생물 활성을 갖는 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid 와 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid의 분리 및 동정. *한국식품과학회지*, 32(6): 1403-1407.
- 심기환, 정창호 2000. Some Functional Properties of Extracts from Leaf and Fruit Stalk of *Hovenia dulcis*. *농산물저장유통학회지.* 7(3): 291-296.
- 임록재 1990. *조선약용식물지. 현대의약약용식물편 I.* 한국문화사.

(접수일 2002.7.22)

(수락일 2002.9. 3)