

참옷나무 (*Rhus verniciflua*) 배발생캘러스로부터 체세포배발생에 의한 식물체 재분화

김재훈^{1*}, 이원석¹, 권기원², 인준교³, 최용의⁴

¹마이크로플랜츠 부설연구소, ²충남대학교 농업생명과학대학, ³(주)바이오피어, ⁴중앙대학교 인삼산업연구센터

Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis from Embryogenic Callus of Lacquer Tree (*Rhus vernicifera* Stokes)

Jae Whune Kim^{1*}, Won Seok Lee¹, Ki Won Kwon², Jun Gyo In³, Yong Eui Choi⁴

¹Microplants Co., Ltd., Palbokdong, Jeonju 561-203, Korea

²College of Agriculture and Life Science, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

³Biopia Co Ltd., Kyunghee University, Suwon 449-701, Korea

⁴Korea Ginseng Institute, Chung-Ang University, Anseong 456-756, Korea

ABSTRACT Excised cotyledons and embryo axes of zygotic embryos of *Rhus vernicifera* were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium with various concentrations of 2,4-D. About 3-5% of explants produced callus. Embryogenic callus was preferentially induced from basal parts of embryo axis of zygotic embryos seeds when they were cultured without removal of seed coats. Somatic embryos were developed from embryogenic callus on growth regulator-free medium after 2-3 subcultures on medium with 1.0 mg/L 2,4-D and these embryos were matured to cotyledonary stage. Plantlets with well-developed shoots and roots from embryos were obtained on ¼MS medium with GA₃. After acclimatization of plantlets on artificial soil, they were exposed to soil pots.

Key words: Plant regeneration, *Rhus vernicifera*, somatic embryo.

서 론

참옷나무는 옷나무과에 속하는 낙엽활엽 교목으로 높이가 20 m에 달하고 줄기 직경이 90 cm에 이른다. 나무껍질이 어릴 때에는 매끄럽고 회백색인데 성장함에 따라서 거칠어지고 세로로 균열이 생기고 헛가지에는 털이 있으나 곧 없어진다. 옷나무에서 나오는 수액을 옷칠이라고 하며, 옷칠의 주성분은 우루시올(urushiol)이고, 칠의 도료로서 우수성은 urushiol의 함유량에 따라 결정된다. 옷칠은 칠기 및 공업용으로 동아시아 일부지역에서만 널리 이용되어 온 진귀한 천연도료로 3,000년 전에 옷칠한 재질이 그대로 보존될 정도로 내구성이 우수하여 강력한 내구성을 원하는 제품에 지금도 사용하고

있다. 또한, 한방에서는 옷나무 및 옷 수액을 구충, 복통, 통경, 변비, 빈혈, 여인경맥 불통 등에 사용하는데, 위상에서는 소화제가 되고, 간에서는 어혈약이 되어 염증을 다스리며, 심장에서는 청혈제가 되어 제반 심장병을 다스리고, 폐에서는 살충제가 되어 결핵균을 멸하며, 콩팥에서는 이수약이 되어 오장육부의 제병을 다스린다고 한다. 최근 옷칠액의 활발한 연구에 의해 주성분인 urushiol은 암세포의 증식억제효과 매우 우수한 사실을 알아냈고 (Na et al. 1998), 또한 알려진 유발물질인 urushiol 화합물이 강한 항산화활성과 항곰팡이 활성이 있는 것을 확인하였다 (Kim et al. 1997a; Kim et al. 1997b) 옷나무는 칠기, 공업용, 한방재료, 건강식품의 원료로서 소비가 급증하는 중요한 유용식물임에도 불구하고, 독특한 독성물질의 방출로 인해 배양재료로 사용하기에 많은 어려움이 있어 아직까지 참옷나무를 비롯한 다른 옷나무의 조직배양을 통한 식물체 재생에 관한 보고가 되어 있지 않다. 또한, 외국에서는

*Corresponding author Tel 063-211-6005 Fax 063-211-6012

E-mail jwkim@microplants.com

urushiol이 피부가 민감한 서양인들에게는 심한 옷오름 (Kalish 1990)을 일으켜서 옷나무를 도료나 약용자원으로 연구하지 않고 면역학적 연구나 피부염에 대한 연구를 위해 urushiol을 연구해 왔다 (Epstein 1989). 본 연구에서는 옷나무에서도 가장 경제적인 가치가 높은 것으로 알려진 참옷나무의 조직배양을 통해 식물체 재분화 시스템을 확립하여 참옷나무의 품종개량 및 외래유전자 도입에 의한 고부가가치 신기능성 물질의 효율적인 생산을 위한 기초 자료를 제공하고 자 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

배양재료로 사용한 참옷나무 (*Rhus vernicifera* Stokes) 종자는 전라북도 산림환경연구소에서 분양 받았다. 참옷나무 종자를 70%에탄올에 30초간, 2% sodium hypochlorite에 20분간 소독하여 멸균수로 3회 세척한 후 딱딱한 종피를 제거하고, 자엽과 배축을 무작위로 여러 가지 형태로 절단하여 배지에 옮겨 배양하거나 종피를 제거하지 않은 종자를 그대로 멸균한 후 배지에 옮겨 각각 200개체씩 배양하였다.

배발생캘러스 유도

참옷나무 종자로부터 캘러스를 유도하기 위해 여러 농도 (0.2, 1.0, 3.0, 10.0 mg/L)의 2,4-D가 단독 첨가된 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지에 3% sucrose 그리고 0.4% Gelrite를 첨가하여, pH를 5.8로 조정하고 121°C에서 15분간 고압멸균한 후 페트리디쉬 (87×15 mm)에 25 mL씩 분주해서 사용하였다. 배양은 25±1°C 암상태에서 6주간 배양하여 캘러스 유도율을 조사하였다. 캘러스 중에서 부서지기 쉬운 배발생캘러스만을 선별하여 1.0 mg/L 2,4-D가 함유된 MS배지 또는 생장조절물질이 첨가되지 않은 MS배지에서 2주 간격으로 3~4회 계대배양하였고, 그 이후의 계대배양은 생장조절물질을 첨가하지 않은 배지에서 계대배양하였다.

체세포배 발생 및 유식물체 발달

생장조절물질이 들어있지 않은 배지에서 증식된 배발생캘러스로부터 다량의 정상적인 체세포배를 얻기 위해 여러 종류 (MS, B5, WPM, SH - Duchefa Biochemie B.V., The Netherlands)의 배지에서 계대배양하면서 체세포배가 자엽기까지 발달하는 것을 조사하였다. 자엽기 체세포배로부터 뿌리와 shoot를 유도하기 위해 식물생장조절물질을 첨가한 MS배지에 무기염류의 농도(¼배, ½배, 1배)를 달리하고, 3% sucrose를 첨가하여 25±1°C 온도, 1,500 Lux 형광등 밑에서 명암시간을 18 : 6 비

율로 배양한 후 체세포배의 발아율을 조사하였다.

식물체 순화

뿌리와 shoot가 정상적으로 잘 발달한 유식물체는 인공배양토 (버미큘라이트와 펄라이트를 1 : 1의 비율로 혼합)에 옮겨 80%이상의 습도가 유지되도록 비닐로 밀봉하고, 25±1°C, 3,000 Lux 형광등 밑에서 명암시간을 18 : 6 비율로 키워 순화하였다.

결과 및 고찰

배발생캘러스 유도

참옷나무 종자는 딱딱한 종피로 둘러싸여 있어서 종피를 제거하는데 펜치 및 칼과 같은 도구를 사용하였다. 종피를 제거하면 종피내부의 대부분을 차지하는 등근 모양의 자엽과 두 개의 자엽사이에 작은 배축이 있는 종자를 얻을 수가 있다. 종자의 자엽과 배축을 여러 형태로 절단하여 0.2, 1.0, 3.0, 10.0 mg/L 2,4-D가 함유된 MS배지에 옮겨 암처에서 배양하면서 캘러스 유도율을 조사하였을 때 1.0~3.0 mg/L의 2,4-D가 함유된 MS 배지에서 3~5%의 낮은 캘러스 유도율을 보였다 (Table 1). 배양재료로 사용한 종자의 절단면으로부터 나온 갈색의 삼출물에 의해 배양 1주경부터 배지색이 갈색으로 변형되어 배양재료들은 검은색을 띠면서 고사하였다. 일부 배지와 직접 접촉되지 않은 재료의 윗부분에서 유도된 캘러스의 경우에도 계대배양을 2~3번 실시하면 검은색을 띠면서 고사하였다. 배양재료에서 발생하는 독성물질로 인하여 캘러스배양이 어려운 식물의 경우 이를 방지하기 위해 배지에 여러 가지

Table 1. Frequency of callus and embryogenic callus formation from different parts of zygotic embryos of *Rhus vernicifera*.

Explants	MS medium + 2,4-D (mg/L)	Formation of callus (%)	Formation of embryogenic callus (%)
Cotyledons	0.2	2.0	0
	1.0	5.0	0
	3.0	3.5	0
	10.0	2.0	0
Embryonic axis	0.2	3.0	0
	1.0	4.5	0
	3.0	4.0	0
	10.0	1.5	0
Seeds without seed coat	1.0	2.0	0
	3.0	3.0	0
	10.0	4.0	0
Seeds with seed coat	1.0	2.0	0.5
	3.0	1.5	0
	10.0	0	0

About 2 hundred explants were culture per treatment

생장조절제 및 항산화제 등을 첨가하여 배양했다는 보고가 있다 (Wainwright and Flegmann 1985; Hirasuna et al. 1996). 종자를 발아시켜 배양재료로 사용하기 위해 종피에서 꺼낸 종자를 생장조절제가 첨가되지 않은 MS배지에 옮겨 배양하였지만 발아가 거의 되지 않았다.

참꽃나무의 종자배양 시 우연히 종피를 제거하지 않고 그대로 배지에 옮겨 배양하였을 때 극히 일부의 것에서 흰 배발생캘러스가 생성되는 것이 관찰되었다. 종피를 제거하지 않은 딱딱한 종자를 멸균하여 그대로 1.0 mg/L 2,4-D 배지에서 배양하였을 때 배양 4주 경에 종피의 배병부위에서 흰색의 부서지기 쉬운 배발생캘러스가 생성되었다. 종피를 제거하지 않은 종자는 독성물질이 발생하지 않아 배지색이 거의 변하지 않았다. 그러나 배양재료의 형태도 변화가 없어 캘러스가 거의 유도되지 않았고 단지 극소수의 종피에서 흰색의 배발생캘러스가 생성되었다 (Table 1). 배발생캘러스는 종피의 배병부위에서 유도되었고, 유도된 배발생캘러스는 1~2주만에 왕성하게 증식하였다. 배양개시 후 4주정도 지나면 배지 내 여러 성분이 자연분해되어 캘러스 증식에는 적합하지 않을 것으로 사료되지만 배발생캘러스는 형태적으로 전혀 변하지 않고 잘 증식하였다. 이와 같은 배발생캘러스의 발생과정은 초본식물 (Nomura and Komamine 1985; Kim and Soh 1996; Been and Kim 1997)에서는 거의 볼 수 없는 특이한 현상으로 목본식물 (Choi et al. 1999; Kim et al. 1999)의 경우에 비슷한 현상이 관찰되는 것으로 보고되었다.

배발생캘러스 유지 및 증식

증식된 배발생캘러스를 1.0 mg/L 2,4-D가 단독 첨가된 MS 배지에서 여러 번 계대배양하면 흰색의 작고 조밀한 세포괴 형태로 증식하였다 (Figure 2A). 배발생캘러스가 만들어지면 2,4-D 첨가배지에서 계대배양하면서 배발생캘러스를 유지시키거나 증식하는 것이 효율적인 것으로 알려져 있다 (Jansen et al. 1990; Parrott 1991). 그러나 참꽃나무의 경우 2,4-D 첨가배지에서 계속 계대배양하면 배발생세포가 너무 작아 체세포배로 발달하는데 시간이 오래 소요되고, 재분화능이 현저하게 떨어지는 현상이 관찰되어 배지에 첨가하는 2,4-D의 양을 낮추거나 (0.2 mg/L), 첨가하지 않고 배양하였다. 그 결과 생장조절물질이 첨가되지 않은 조건에서 배양한 배발생세포는 잘 증식되고, 그 과정에 일부는 체세포배로 발달하였다 (Figure 2B). 따라서 생장조절물질 무첨가 배지에서 배양하는 것이 배발생세포의 배발생능을 잘 유지하는 것이고, 이들로부터 체세포배를 단기간에 대량으로 얻는 것이 효과적인 방법으로 사료된다. 또한, 참꽃나무의 배발생캘러스를 유도할 때는 암조건에서 실시하였지만 일단 배발생캘러스가 만들어지면 이들은 1,500 Lux의 형광빛 환경에서도 배발생능의 성질이나 증식에 전혀 영향을 받지 않았다. 이것은 배발생세포의 배발생능 유지나 증식에 빛은 거의 영향을 미치지 않는다는 것을 시사한다.

배발생세포로부터 체세포배 과정을 통한 유식물체 발달

생장조절물질이 첨가되지 않은 여러 배지 (MS, B5, WPM, SH)에서 배발생세포를 계대배양하여 체세포배가 자엽시기까지 발달하는 상태를 조사하였을 때 MS배지에서 체세포배의 발달이 가장 양호하였다 (Figure 1). 참꽃나무의 배발생세포로부터 구형 상태 (globular stage)로 생성되는 기간이 비교적 길고, 심장형 (heart-shaped)이나 어뢰형 (torpedo-shaped)은 기간은 짧아 자엽형 시기 (cotyledonary-stage)의 체세포배는 다른 시기의 체세포배와 함께 혼재되어 발달하는 양상을 보였다 (Figure 2C). 자엽기 체세포배는 생장조절물질이 첨가되지 않은 배지에서는 shoot와 뿌리의 발달이 잘 이루어지지 않았으므로 shoot와 뿌리가 잘 발달한 유식물체를 얻기 위해 배지의 조성비를 바꾸거나 여러 생장조절물질을 첨가하여 자엽기 체세포배를 배양하였다. 그 결과 자엽기의 체세포배는 GA₃가 첨가된 배지에서는 shoot의 발달이 잘 되었고, ¼MS배지 조건에서는 뿌리의 발달이 잘 이루어졌다 (Table 2). 특히, GA₃가 첨

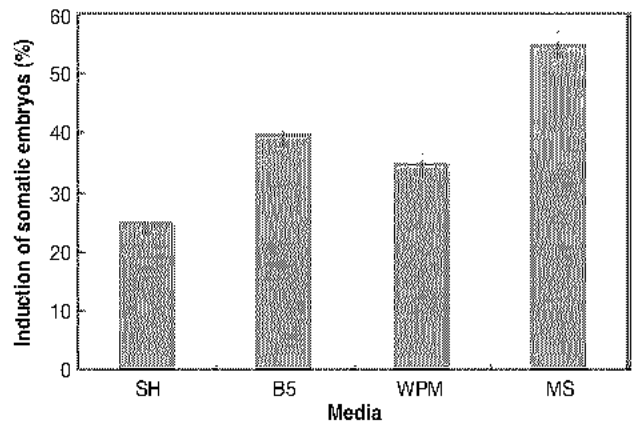


Figure 1. Somatic embryogenesis from embryogenic callus of *Rhus verniciflua* on various kinds of media.

Table 2. Germination effect of somatic embryos of *Rhus verniciflua*.

MS Media strength	Growth regulators (0.5 mg/L)	Germination	
		Shoot elongation	Root elongation
¼X	Zeatin	++	+
	GA ₃	+++	++
	IBA	-	++
	BA	-	-
½X	Zeatin	++	++
	GA ₃	+++	+
	IBA	-	++
	BA	-	-
1X	Zeatin	++	-
	GA ₃	++	+
	IBA	-	+
	BA	-	-

+++ , > 70%; ++ , 70-40%; + , 40-10%; - , < 10%

가된 1/4MS배지에서는 shoot와 뿌리가 고루 잘 발달한 정상적인 유식물체를 얻을 수 있었다 (Figure 2D).

식물체 재분화 시스템 확립

뿌리와 shoot가 고루 잘 발달한 정상적인 유식물체는 용기에서 꺼내 순화시키기 전에 한천배지에 저밀도로 다시 한번 키우면 잎이 나오고, 뿌리도 더욱 견실하게 자랐다 (Figure 2E). 잎이 나온 유식물체를 버미큘라이트와 펄라이트를 1 : 1의 비율로 혼합한 인공배양토가 담긴 플라스틱 포트에 이식하여 80%이상의 고습도를 유지하면서 3~4개월 순화시켜 재분화된 식물체를 얻을 수 있었다 (Figure 2F). 본 연구에서 확립한 참웃나무의 배발생세포를 통한 재분화 시스템은 최근 건강식품이나 옷칠로서 그 가치가 재인식되고 있는 참웃나무의 품종개발에 유용하게 적용할 수 있고, 외래유전자 도입에 의한 형질전환연구에도 효율적으로 이용할 수 있을 것이다. 자연산 참웃나무는 한방치료효과가 우수한 것으로 알려져 있

지만 알러지를 유발하는 화합물을 포함하고 있어 치료제로 사용하는데 각별한 주의가 필요하다. 그러나 참웃나무의 어린 순에는 알러지 물질이 거의 없어 오래 전부터 민간에서 옷순을 식용으로 하고 옷순 주를 담아 먹기도 한 것으로 알려져 있다 (Na et al. 1998). 배양 유식물체도 알러지 성분이 거의 없거나 매우 미약해서 식용으로 사용할 수 있을 가능성이 높으므로 자연산 참웃나무 성분과 비교 분석하여 배양체를 신기능성 물질의 신소재로 이용할 수 있는지 그 가능성을 연구할 필요가 있다고 사료된다.

적 요

참웃나무 종자의 자엽과 배축을 여러 가지 형태로 절단하여 1.0~3.0 mg/L 2,4-D가 함유된 MS 배지에서 배양하였을 때 3~5%의 캘러스 유도율을 보였다. 배발생캘러스는 종피를 제거하지 않고 그대로 배양한 종자의 배병부위에서 유도되었다. 증식된 배발생캘러스를 1.0 mg/L 2,4-D가 단독첨가된 MS 배지에서 2~3회 계대배양한 후 생장조절물질이 첨가되지 않은 배지에서 배양하면 배발생능이 잘 유지되고, 단기간에 체세포배를 대량으로 얻기에 효과적이었다. 생장조절물질이 첨가되지 않은 MS배지에서 배발생세포를 계대배양하면 체세포배가 자엽시기까지 잘 발달하였다. 자엽기의 체세포배를 GA₃가 첨가된 1/4MS배지에서 배양하였을 때 shoot와 뿌리가 고루 잘 발달한 정상적인 유식물체를 얻을 수 있었다. 기내배양한 유식물체를 80% 이상의 고습도를 유지하면서 3~4개월 순화시켜 재분화된 어린식물체를 얻었다.

사사 - 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21 사업 연구비로 수행되었음.

인용문헌

Been CG, Kim BD (1997) Totipotential, morphological, biochemical comparisons between nonembryogenic callus and embryogenic callus in water dropwort (*Oenanthe stolonifera* DC). *Kor J Plant Tiss Cul* 24: 167-173
 Choi YE, Kim JW, Yoon ES (1999) High frequency of plant production via somatic embryogenesis from callus or cell suspension cultures in *Eleutherococcus senticosus*. *Ann Bot* 83: 309-314
 Epstein WL (1989) Topical prevention of poison ivy/oak dermatitis. *Arch Dermatol* 125: 199-501
 Hirasuna TJ, Petchanker L, Srinivasan V, Shuler ML (1996) Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*. *Plant Cell Tiss Org Cul* 44: 95-102
 Jansen MAK, Booij H, Schel JHN, De Vries SC (1990) Calcium

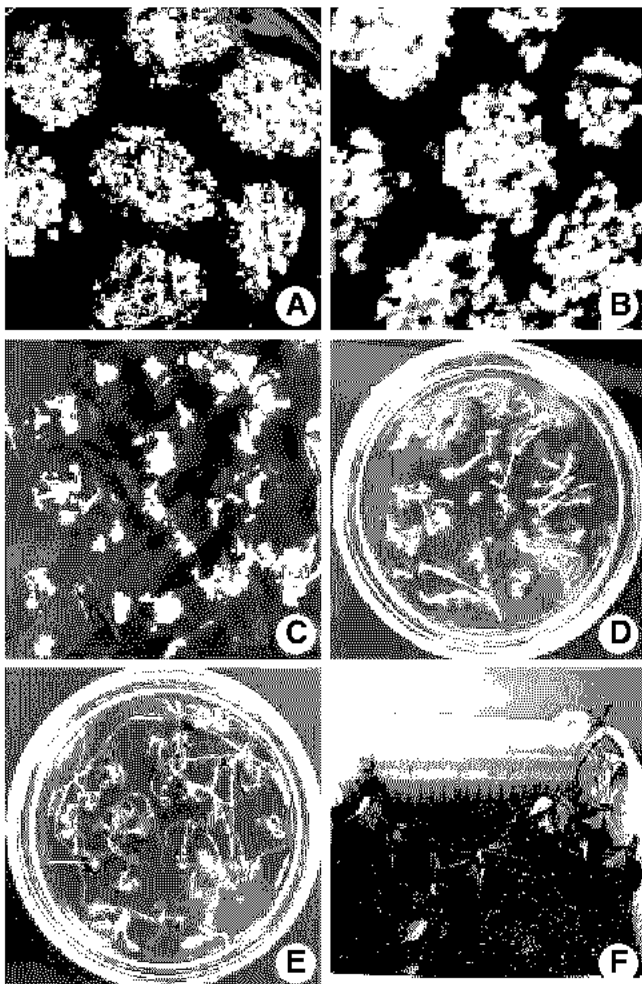


Figure 2. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic callus of *Rhus verniciflua*. A, Embryogenic callus; B, Somatic embryos induced from embryogenic callus; C, Cotyledonary somatic embryos; D, Germinated seedlings; E, Plantlets with leaves and roots; F, Soil transferred plants.

- increases the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Rep* 9: 221-223
- Kalish RS (1990) The use of human T-lymphocyte clones to study T-cell function in allergic contact dermatitis to urushiol. *J Invest Dermatol* 90: 108-111
- Kim JW, Soh WY (1996) Plant regeneration through somatic embryogenesis from suspension cultures of *Allium fistulosum* L. *Plant Sci* 114: 215-220
- Kim MJ, Choi YH, Kim WG, Kwak SS (1997a) Antioxidative activity of urushiol derivatives from the sap of lacquer tree (*Rhus vernicifera* Stokes). *Kor J Plant Res* 10: 227-230
- Kim MJ, Kim CJ, Kwak SS (1997b) Antifungal activity of urushiol components in the sap of Korean lacquer tree (*Rhus vernicifera* Stokes). *Kor J Plant Res* 10: 231-234
- Kim YW, Youn Y, Noh ER, Kim JC (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tiss Org Cult* 58: 93-97
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol Plant* 15:473-49
- Na CS, Jung NC, Oh KI (1998) *In vitro* cytotoxic activity of urushiol in the sap of *Rhus verniciflua* Stokes. *J Kor For Soc* 87: 260-269
- Nomura K, Komamine A (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol* 79: 988-991
- Parrott WA (1991) Auxin-stimulated somatic embryogenesis from immature cotyledons of whit clover. *Plant Cell Rep* 10: 17-21
- Wainwright H, Flegmann AW (1985) The micropropagation of gooseberry (*Ribes uvacrispa* L.): I. Establishment *in vitro*. *J Hortic Sci* 60: 215-221

(접수일자 2003년 9월 8일, 수리일자 2003년 9월 22일)