

# 국내 자생 좁개구리밥 (*Lemna paucicostata*) 및 개구리밥(*Spirodela polyrhiza*)의 엽상체 증식을 통한 기내 식물체 대량 증식체계 확립

오명진<sup>1</sup> · 박종미<sup>1</sup> · 고석민<sup>3</sup> · 유장렬<sup>2</sup> · 김석원<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>한국생명공학연구원 생물자원센터, <sup>2</sup>식물시스템연구센터, <sup>3</sup>유진텍(주) 부설연구소

## High frequency plant proliferation via direct fronds regeneration of Korean endemic duckweed species

Myung Jin Oh<sup>1</sup> · Jong Mi Park<sup>1</sup> · Suk Min Ko<sup>3</sup> · Jang R. Liu<sup>2</sup> · Suk Weon Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Biological Resources Center and <sup>2</sup>Plant Systems Engineering Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea

<sup>3</sup>R&D Center, Eugentech Inc. 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea

**Abstract** High frequency plant proliferation system via direct frond regeneration of endemic duckweed plants *Lemna paucicostata* and *Spirodela polyrhiza* was established. Fronds of *L. paucicostata* and *S. polyrhiza* were able to multiply half-strength MS basal medium without plant growth regulators. However, addition of BA at a range of 1 to 3 mg/L was more effective than high concentration of BA treatments for fronds proliferation. Also half-strength MS salts was suitable for the fronds proliferation. Increase of salts concentration had inhibitory effect on fronds proliferation. Also the frequency of callus formation from fronds of *L. paucicostata* was 3.3%, when they cultured onto 1/2 MS medium supplemented with 1 mg/L of BA. Similarly the frequency of callus formation from *S. polyrhiza* was very low. After subculture of white globular structures derived from fronds of *L. paucicostata*, numerous globular somatic embryos and calluses were developed onto the surface of fronds. However these somatic embryos did not fully develop into normal plants when transferred to 1/2 MS basal medium. Therefore direct frond regeneration system was more efficient for mass proliferation of *L. paucicostata* and *S. polyrhiza*. The plant regeneration system of *L. paucicostata* and *S. polyrhiza* established in this study, might be applied to mass proliferation and genetic transformation for molecular breeding.

### 서 론

국내에 자생하는 좁개구리밥 (*Lemna paucicostata* (L.) Hegelmaier) 및 개구리밥 (*Spirodela polyrhiza* (L.) Schelid.)은 개구리밥과에 속하는 대표적인 부엽성 수생식물이다. 좁개구리밥은 개구리밥에 비하여 크기가 매우 작으며 (길이 3~4 mm, 너비 2~3 mm) 엽상체 (frond) 하나에서 1개의 수중근을 가지고 있다. 반면 개구리밥은 크기가 크며 (길이 3-8 mm, 너비 4-6 mm) 엽상체 뒷면 중앙부위에 대략 5-11개의 뿌리를 가지고 있다.

개구리밥 식물체는 최적 조건에서 개체의 복제가 2일 이내에 이

루어지는 증식 속도가 매우 빠른 식물체이다 (Landolt and Kandeler, 1987). 개구리밥의 엽상체는 건중량당 단백질 함량이 최대 45%를 차지하여 축산 사료로 잠재적 가치가 우수하다 (Chang et al. 1977; Faskin 1999). 또한 개구리밥은 붕소 (Marina and, Oronb, 2007), 우라늄 및 비소 (Mkandawire et al. 2004), 납 및 니켈 (Axtell et al. 2003; Rahmani and Sternberg 1999), 크롬 (Dirilgen, 1998), 수은 (Isaksson et al., 2007) 등 환경 유해물질에 대한 내성도 매우 강한 것으로 알려져 있으며 축산폐수 등 유기 오염원에 대한 생물학적 복구 능력이 우수하다 (Bergmann et al. 2000). 이와 같은 환경정화능 외에도 한방에서는 개구리밥의 전초를 말려서 해열, 이뇨작용은 물론 심장혈관계통 약제로 사용하고 있다. 그러나 이와 같은 약리적, 산업적 활용가치가 매우 높음에도 불구하고 국내에서는 개구리밥 식물을 이용한 바이오 신산업 활용에 관한 연구가 거의 이루어지지 않

\*Corresponding author Tel 042-860-4646 Fax 042-860-4677

E-mail: kimsw@kribb.re.kr

고 있는 실정이다.

개구리밥 식물의 산업적 활용을 위한 기반 구축을 위한 개구리밥의 조직배양 연구는 *Lemma gibba* G3의 식물체 재생 (Chang and Chiu, 1978) 보고 이후 *Lemma gibba*의 증식에 미치는 성장조절제 영향(Moon and Stomp 1997; Moon et al. 1998), *Lemma minor*로부터 캘러스 유기를 통한 식물체 재생 (Stefaniak et al. 2002) 그리고 최근 *Spirodela* 와 *Lemma*의 식물체 재생체계 연구 (Li et al., 2004) 등 많은 보고가 이루어진 바 있다. 또한 개구리밥의 빠른 증식 및 간단한 대량 배양체계를 활용하여 인체에 유용한 의약품 단백질의 대량 생산 연구가 수행되고 있다(Yamamoto et al. 2001). 더 나아가 인체의 당쇄 패턴과 유사한 항체를 *Lemma minor*의 형질전환을 통해 생산하고자 연구가 진행되고 있다 (Cox et al. 2006).

최근 캘러스에서 면역 조절기능이 있는 pectins 및 arabinogalactans의 대량생산이 가능함이 보고된 바 있다 (Gyunter et al. 2008). 이와 같이 개구리밥 식물의 산업적 활용 가능성이 매우 큼에도 불구하고 아직 국내에 자생종인 개구리밥 식물의 배양체계 확립 및 형질전환에 대한 연구가 시도 된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 국내에 자생종인 개구리밥 및 좁개구리밥의 분자육종에 필요한 기반 연구로 개구리밥 및 좁개구리밥의 기내 배양체계 확립에 요구되는 성장조절제의 영향 및 엽상체 증식에 요구되는 무기염류 농도의 영향, 캘러스 형성 및 식물체 재생체계를 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

국내에 자생하는 개구리밥 (*Spirodela polyrhiza* (L.) Schelid.) 및 좁개구리밥 (*Lemma paucicostata* (L.) Hegelmaier) 엽상체는 2005년 5월 대전근교 논에서 채집하였으며 아주대학교 수생식물종자은행을 통하여 정확한 동정을 수행한 다음 실험에 사용하였다. 식물체의 표면 살균은 증식된 식물체를 흐르는 수돗물에 1일간 세척한 다음 10% 상염용 락스 용액에 20분간 표면살균을 하였다. 표면 살균된 식물체를 무균작업대에서 멸균수로 3~4회 세척한 다음 멸균된 여과지에서 표면의 수분을 제거하였다. 살균된 식물체를 이용하여 이후 엽상체 배양체계 확립 연구에 사용하였다.

### 좁개구리밥의 기내 식물체 증식에 미치는 배지내 무기 염류 농도 영향

표면 살균된 좁개구리밥의 식물체를 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지의 무기염류 농도를 1/2, 1, 2, 4배로 조정된 배지 및 증류수에 각각 배양을 하였다. 좁개구리밥의 엽상체는 25°C 명배양 (약 80  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; 광주기 16/8시간)하면서 개체 증식을 유도하였다. 각 처리구는 좁개구리밥 엽상체를 20개씩 3반복으로 배양배지 100 ml이 첨가된 배양병에서 유지하였다. 약 3주간 배양 후 증식이 이루어진 엽상체의 수를 조사하여 무기염류 농도에 따른 엽상체의 증식 효율을 조사하였다.

### 엽상체 증식 및 캘러스 형성에 미치는 성장조절제의 영향

개구리밥 및 좁개구리밥 엽상체를 MS배지의 모든 무기염류 농도를 1/2로 낮추고 각각 0.4 mg/L thiamine · HCl, 100 mg/L myo-inositol, 30 g/L sucrose 및 4 g/L Gelrite 가 첨가된 배지(1/2MS 배지)에 치상하여 기내 엽상체 배양을 유지하였다. 기내에서 증식중인 엽상체를 이용하여 엽상체 증식에 미치는 성장조절제 영향을 조사하였다. 기내에 유지중인 개구리밥 및 좁개구리밥 엽상체를 1/2MS 배지에 성장조절제로 BA (benzyl aminopurine) 및 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 를 각각 0, 1, 3, 10과 30 mg/L 첨가된 배지에 치상하였다. 각 처리구는 엽상체를 20개씩 3반복으로 치상한 후 상기의 배양조건에 따라 명배양하였다. 배양개시 4주 후 치상된 엽상체로부터 대량증식이 이루어진 엽상체 수를 조사하여 성장조절제에 따른 엽상체의 증식 효율을 조사하였다.

또한 성장조절제가 개구리밥 및 좁개구리밥 엽상체로부터 캘러스 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 엽상체 (길이 약 3 mm) 및 뿌리 (길이 약 5 mm)를 절단하여 BA와 2,4-D 가 각각 0, 0.1, 0.3, 1, 3 및 10 mg/L 첨가된 1/2MS 배지에 배양하였다. 각 처리구는 엽상체 및 뿌리를 20개씩 3반복으로 치상하였으며 상기의 배양 조건에 따라 배양하였다. 배양개시 4주 후 치상된 엽상체로부터 캘러스 형성이 이루어진 엽상체 수를 조사하여 성장조절제가 개구리밥 및 좁개구리밥 캘러스 형성에 미치는 영향을 조사하였다.

### 좁개구리밥 엽상체 유래 캘러스의 현탁배양체계 확립

좁개구리밥 캘러스로부터 현탁배양체계를 확립하기 위하여 1 mg/L BA가 첨가된 1/2MS 배지(1/2 MS1BA 배지)에서 유도된 캘러스를 사용하였다. 1/2 MS1BA 액체배지 20 ml이 첨가된 Erlenmeyer flask (250 ml)에 증식된 캘러스(약 1 g)를 옮겨준 다음 25°C, 100 rpm으로 현탁배양을 개시하였다. 약 1주간 배양한 다음, 동일 조성의 액체배지를 각각 20 ml 첨가하여 1 주간 배양하였다. 이후에는 현탁배양세포 10 ml를 동일 조성의 액체배지 50 ml이 첨가된 Erlenmeyer flask로 옮겨 약 2주 간격으로 계대배양하였다.

현탁배양중인 세포주로부터 식물체 재생을 위하여 약 2주 배양된 세포괴를 성장조절제가 첨가되지 않은 1/2 MS 기본배지로 옮겨 각 Petri dish(87 × 15 mm) 당 세포괴를 10개씩 치상하였으며 총 3 개의 반복구를 준비하여 25°C 명배양하였다.

### 개구리밥 및 좁개구리밥 대량 배양 및 건중량 생산성 조사

개구리밥 및 좁개구리밥의 엽상체로부터 대량증식 체계를 이용하여 자연 상태에서 바이오매스 생산량을 조사하고자 인공 수조에서 대량 배양체계를 확립하였다. 기내에서 재생된 좁개구리밥 및 개구리밥 식물체를 약 0.63m<sup>2</sup> 수조에 옮긴 다음 하이포네스 영양액 (0.25g/L)을 첨가하였다. 이후 자연 상태에서 배양을 개시하였으며 각각의 식물체가 수조 표면을 충분히 덮을 정도로 증식이 이루

어진 상태에서 1주일 간격으로 수조 표면에 떠 있는 식물체의 약 절반을 수거하여 수돗물로 세척한 다음 표면의 수분이 제거되도록 방치한 다음 생중량 약 10 g씩 3개의 반복구를 준비하였다. 건중량은 60°C 건조기에서 24시간 말린 다음 조사하였다. 연간 바이오매

스 생산량은 1주일간격으로 수집된 개구리밥 및 좁개구리밥의 총 건중량을 기준으로 단위 수조 면적에 대한 연간 생산량 추정치를 계산하였다.

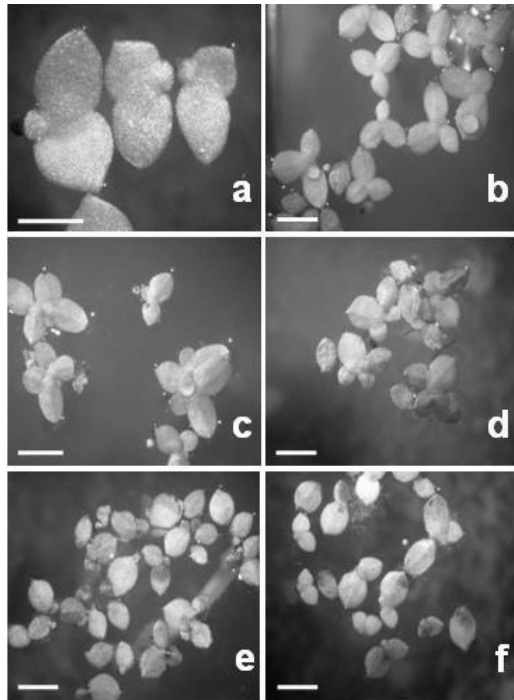
**결과 및 고찰**

**좁개구리밥 엽상체 증식에 미치는 MS salts의 영향**

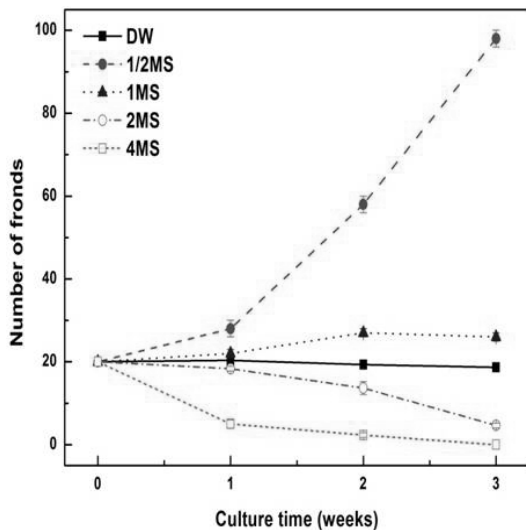
좁개구리밥의 엽상체 증식에 요구되는 MS 배지의 무기염류 농도를 조사한 결과 (Fig. 1) 좁개구리밥 엽상체는 MS 배지의 무기염류 농도를 1/2로 낮춘 배양 조건에서 엽상체 증식이 배양 3주 동안 5배 이상 증식이 이루어짐을 알 수 있었다 (Fig. 1B). MS 무기 염류 농도가 증가할수록 엽상체 증식은 오히려 감소하였으며 MS 무기 염류 농도가 4배로 농축된 배지에서는 엽상체 증식 효율이 감소하면서 엽상체가 백화되면서 사멸하였다 (Fig. 1f). MS 무기염류가 전혀 첨가되지 않은 증류수에서도 3주 동안 증식은 이루어지지 않지만 엽상체가 녹색을 띠며 식물체 생존이 가능하였다 (Fig. 1B). 1/2MS 배지에서 엽상체의 증식속도는 배양개시 1주일간은 증식속도가 낮지만 이후 배양 기간이 증가될수록 엽상체 증식속도가 빠르게 증가됨을 알 수 있었다 (Fig. 1B). 또한 하나의 엽상체에서 엽상체 수가 약 4-6개로 증식됨을 알 수 있었다. 이상의 결과로 미루어볼 때 좁개구리밥 엽상체 증식에 요구되는 MS 배지의 무기염류 농도는 MS 무기염류 농도를 1/2로 낮춘 배양조건일 것으로 판단된다. 따라서 이후 모든 실험은 1/2MS 배지 조건에서 수행하였다.

**좁개구리밥 엽상체 증식 및 캘러스 형성에 미치는 생장조절제의 영향**

좁개구리밥의 엽상체는 캘러스 형성을 거치지 않고 기존의 엽상체 (mother fronds) 기저부에서 새로운 엽상체 (daughter fronds)가 양쪽에서 동시에 또는 한쪽에서 신장이 이루어지면서 증식이 이루어졌다 (Fig. 2A). 좁개구리밥 엽상체는 생장조절제가 첨가되지 않은 1/2MS 기본배지에서도 증식이 가능하였으며 배양기간이 4주

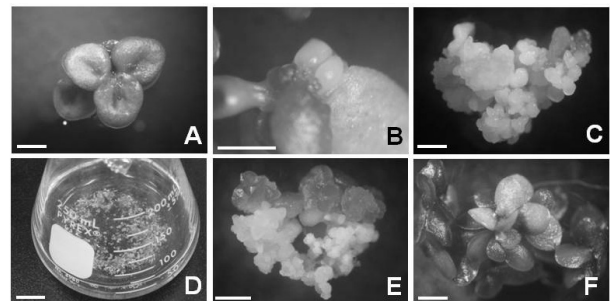


(A)



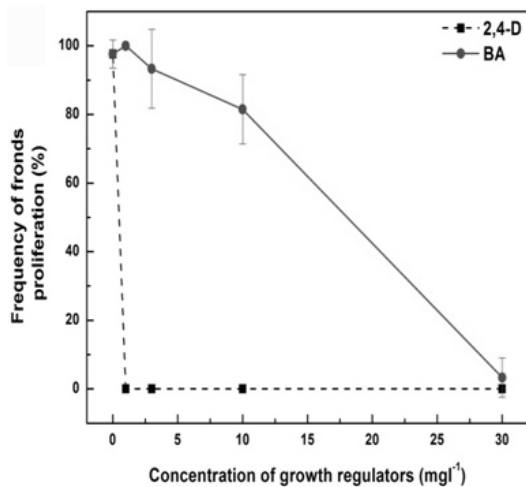
(B)

**Figure 1.** Effect of inorganic MS salts concentration on fronds proliferation of *L. paucicostata*. a: wild plants; b: DW; c: 1/2MS; d: 1x MS; e: 2x MS; f: 4x MS salts. Scale bars represent 2 mm (A). Total number of regenerated fronds was examined after 3 weeks of culture at 25°C in the light (approximately 80 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> with 16h photoperiod)(B). Error bars represent standard deviation

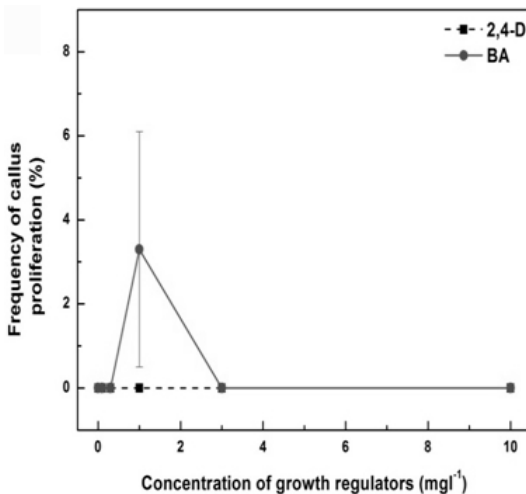


**Figure 2.** Plant regeneration of *L. paucicostata* via direct fronds proliferation. A: Fronds; B: Formation of abnormal fronds; C: Formation of white globular structures and calluses; D: Establishment of embryogenic cell suspension; E: Development of somatic embryos and green plantlets from cell suspension culture; F: Fronds proliferation. Scale bars represent 2 mm (A, B, C, E and F) and 2 cm (D)

이상 유지되면 1/2MS 기본배지에 치상된 엽상체에서는 뿌리의 신장 및 발달이 관찰되었다. 그러나 1 mg/L BA 처리구에서는 엽상체의 직접적인 증식이 더욱 활발하게 이루어졌다 (Fig. 2F). 좁개구리밥 엽상체 증식에 미치는 BA의 농도별 효과를 조사한 결과 1~3 mg/L BA 처리구에서 엽상체의 증식이 93% 이상으로 매우 왕성하게 이루어졌다 (Fig. 3A). 그러나 10 mg/L BA 처리구에서는 엽상체 증식률이 81.5%로, 30 mg/L BA 처리구에서는 3.3%로 감소하였다 (Fig. 3A). 성장조절제로 2,4-D의 영향은 BA와 달리 배양 초기 엽상체의 팽창이 이루어지지만 증식은 전혀 일어나지 않았으며 배양 1~2주까지는 녹색 유지하다가 약 4주 배양한 결과, 2,4-D 처리구에서는 농도가 증가할수록 엽상체가 백색으로 괴사되었다. 이상의 결과로 좁개구리밥의 엽상체 증식에는 1~3 mg/L 범위내에 BA 처



(A)



(B)

**Figure 3.** Effects of BA and 2,4-D on fronds regeneration (A) and callus formation (B) of *L. paucicostata*. Frequency of fronds proliferation and callus formation was examined after four weeks of culture, respectively. Symbols represent 2,4-D (-■-) and BA (-●-). Error bars represent standard deviation

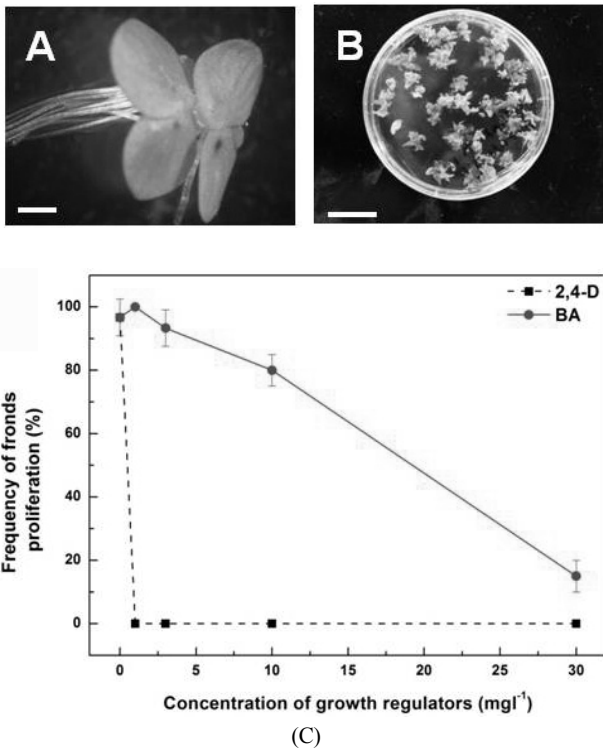
리가 엽상체 증식에 효과적임을 알 수 있었다.

좁개구리밥 엽상체로부터 캘러스 형성을 유도하기 위하여 엽상체 및 뿌리를 배양한 결과, 1 mg/L BA 가 첨가된 1/2MS 에 배양중인 엽상체에서만 매우 낮은 빈도 (3.3%)로 캘러스 형성이 이루어졌을 뿐, 나머지 모든 처리구에서 캘러스 형성이 이루어지지 않았다 (Fig. 3B). 좁개구리밥의 캘러스 발달 양상은 엽상체의 기저부 쪽에서 새로운 엽상체가 돌출되어 증식이 이루어지지만 (Fig. 2A) 낮은 빈도로 새로운 엽상체가 돌출되는 부분에서 기형의 엽상체 (Fig. 2B)가 발생하며, 동시에 인근부위에서 백색의 구형 구조물이 형성되는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 2B). 백색의 구형 구조물이 발생한 엽상체 조직을 동일 조성의 배지에 계대배양하여 증식한 결과, 구형의 체세포배 유사구조가 다수 발달함을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 2C). 증식된 백색의 좁개구리밥 캘러스로부터 현탁배양을 통하여 좁개구리밥 세포주로의 증식체계를 확립하였다 (Fig. 2D). 현탁배양중인 세포주로부터 식물체 재생을 위하여 약 2주 배양된 세포괴를 성장조절제가 첨가되지 않은 1/2MS 기본배지로 옮겨 25°C 명배양한 결과 다수의 백색의 구형 체세포배 및 녹색의 좁개구리밥 세포괴가 발달하였다 (Fig. 2E). 이와 같은 좁개구리밥 체세포배는 비정상적인 분화가 이루어져 정상적인 식물체로 거의 발달하지 못하였지만 캘러스의 증식은 빠른 속도로 이루어졌다. 한편 좁개구리밥 뿌리 배양의 경우에는 전혀 캘러스 형성이 이루어지지 않았다 (자료 미제시). 본 연구에서 좁개구리밥 엽상체로부터 캘러스 형성빈도는 Li 등 (2004)이 제시한 배양방법 (95%)에 비해 매우 낮았다. 이는 실험에 사용된 좁개구리밥의 특성 차이가 큰 원인이라 사료되며 국내에 자생중인 좁개구리밥의 생태학적, 유전학적 보완 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

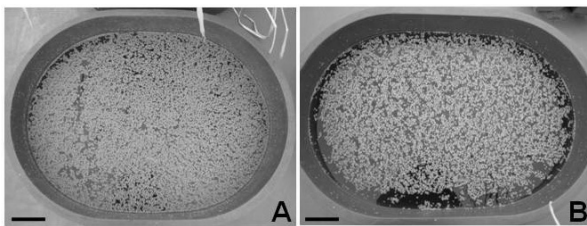
개구리밥 엽상체 증식 및 캘러스 형성에 미치는 성장조절제의 영향

개구리밥 엽상체는 좁개구리밥과 마찬가지로 캘러스 형성 단계를 거치지 않고 엽상체로부터 새로운 엽상체의 직접적인 복제를 통한 증식 체계를 확립하였다 (Fig. 4A, B). 좁개구리밥 엽상체 증식에 미치는 BA의 농도별 효과를 조사한 결과 1~3 mg/L BA 처리구에서 엽상체의 증식이 95% 이상으로 매우 왕성하게 이루어졌다 (Fig. 4C). 그러나 10 mg/L 이상의 고농도 BA 처리구에서는 좁개구리밥과 동일하게 엽상체 증식률이 크게 감소하였다 (Fig. 4C). 2,4-D 역시 배양 초기 엽상체의 팽창이 이루어지지만 엽상체 증식을 유도하지 못하였으며 2,4-D 처리 농도가 증가할수록 엽상체가 백색으로 괴사되었다. 이상의 결과로 볼때 개구리밥 역시 좁개구리밥과 마찬가지로 1~3 mg/L 범위내에 BA 처리가 엽상체 증식에 효과적임을 알 수 있었다.

개구리밥 엽상체로부터 캘러스 형성을 유도하기 위하여 엽상체 및 뿌리를 좁개구리밥과 동일한 방법으로 조사하였으나 모든 처리구에서 캘러스 형성을 관찰 할 수 없었다 (자료 미제시). 개구리밥 엽상체로부터 캘러스 형성빈도가 낮은 원인 역시 실험에 사용된 개구리밥의 특성 차이에서 기인할 것으로 추측된다. 아직 국내에 자



**Figure 4.** Plant regeneration of *S. polyrhiza* via direct fronds proliferation. A: Fresh isolated fronds; B: Fronds proliferation on the culture medium; C: Effects of 2,4-D and BA on fronds proliferation. Scale bars represent 2 mm (A) and 2 cm (B). Error bars represent standard deviation

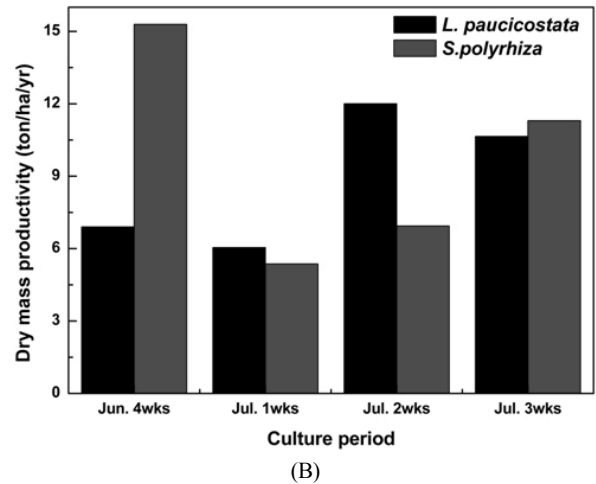
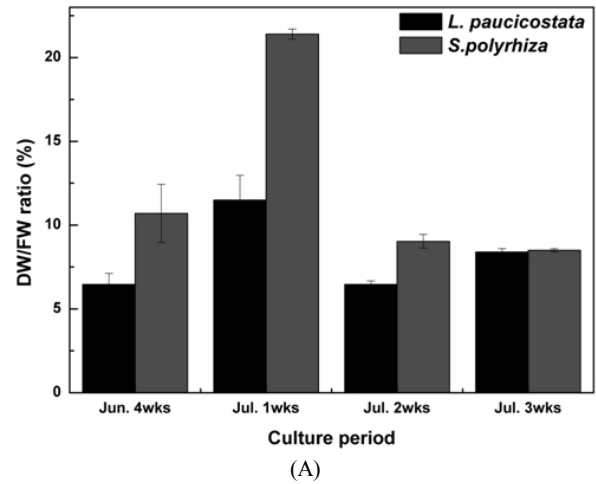


**Figure 5.** Establishment of mass proliferation system of *L. paucicostata* (A) and *S. polyrhiza* (B) via direct fronds proliferation. Scale bars represent 10 cm

생존인 개구리밥의 자생지별 생태학적, 유전학적 연구가 거의 이루어지지 않은 상태이다. 이와 같은 특성 규명이 이루어져야 보다 재분화능이 우수한 개구리밥 라인 선발이 가능할 것으로 기대된다.

#### 개구리밥 및 쯤개구리밥 대량 배양 및 건중량 생산성

개구리밥 및 쯤개구리밥의 엽상체로부터 대량증식 체계를 이용하여 자연 상태에서 바이오매스 생산량을 조사하였다 (Fig. 5). 기 내에서 재생된 쯤개구리밥 (Fig. 5A) 및 개구리밥 (Fig. 5B) 식물체를 수조에서 대량 증식 시킨 후 1주일 간격으로 수집하여 건중량/생중량 비율을 조사한 결과 쯤개구리밥의 건중량/생중량 비율은



**Figure 6.** Evaluation of weekly variation of dry/fresh weight ratio (A) and biomass productivity (B) during the culture. Error bars represent standard deviation

6.5~11.5%로 식물체 전체 수분 함량이 88.5~93.5%임을 알 수 있었다 (Fig. 6A). 반면에 개구리밥의 경우 건중량/생중량 비율이 8.5~21.4%로 식물체 전체 수분 함량이 79.6~91.5%임을 알 수 있었다 (Fig. 6A). 건중량/생중량 비율은 두 식물 모두 채집기간별로 차이를 보였으며 개구리밥의 수분 함량 변화가 쯤개구리밥에 비해 상대적으로 더 큼을 알 수 있었다. 또한 1주일 간격으로 수집된 쯤개구리밥의 총건중량을 기준으로 연간 바이오매스 생산성을 추정 계산한 결과 쯤개구리밥 및 개구리밥의 연간 건조 바이오매스 생산량은 각각 8.9톤 및 9.8톤이었다 (Fig. 6B). 이와 같은 바이오매스 생산성은 타작물에 비해 낮지 않은 것으로 개구리밥 식물의 바이오매스를 다른 바이오산업 분야에 활용이 가능할 것으로 기대된다.

본 연구에서는 개구리밥 및 쯤개구리밥의 엽상체의 직접적인 증식방법을 통해 기내 대량증식 체계를 확립하였다. 따라서 본 연구에서 확립된 개구리밥 및 쯤개구리밥의 기내 배양체계는 유용 유전자 도입을 통한 형질전환 개구리밥 식물의 개발의 직접적인 연구소재로 활용이 가능할 것으로 기대되며 아울러 이를 통한 개구리밥

식물의 산업적 활용가치 증대에 기여할 수 있을 것으로 예상된다.

## 적 요

국내에 자생종인 좁개구리밥 (*Lemna paucicostata*) 및 개구리밥 (*Spirodela polyrrhiza*)의 엽상체로부터 엽상체의 직접적인 분화 기작을 통하여 식물체의 대량증식체계를 확립하였다. 좁개구리밥 및 개구리밥의 엽상체는 성장조절제가 첨가되지 않은 1/2MS 기본배지에서도 증식이 가능하였으며 1~3 mg/L 범위의 BA 처리가 엽상체 증식을 촉진시킴을 알 수 있었다. 반면에 고농도의 BA 처리는 오히려 엽상체 증식을 억제시켰다. 엽상체 증식에 미치는 배양배지의 무기염류 농도의 영향을 조사한 결과 1/2MS 배지가 고농도의 무기염류보다 엽상체 증식에 더욱 효과적임을 알 수 있었다. 좁개구리밥 엽상체로부터 캘러스 형성빈도는 1 mg/L BA 가 첨가된 1/2 MS배지에서 3.3% 로 매우 낮았으며 개구리밥 역시 캘러스 형성빈도가 매우 낮았다. 백색의 구형 구조물이 발생한 엽상체 조직을 동일 조성의 배지에 계대배양하여 증식한 결과 다수의 구형 체세포 배 유사구조가 발달하였으며 동시에 캘러스 증식이 가능하였다. 그러나 구형 체세포배 유사구조를 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 배양배지로 옮겨 배양하였으나 식물체 재생은 이루어지지 않았다. 따라서 좁개구리밥(*Lemna paucicostata*) 및 개구리밥(*Spirodela polyrrhiza*)의 엽상체로부터 직접적인 엽상체의 분화 기작을 통한 식물체의 증식체계가, 캘러스 형성을 통한 식물체 재생 보다 더욱 효과적임을 알 수 있었다. 본 연구에서 확립된 좁개구리밥 및 개구리밥의 식물체 재생체계는 본 식물의 대량증식은 물론 분자 육종을 통한 우량 형질 도입 연구 소재로 직접적인 활용이 가능할 것으로 기대된다.

## 사 사

본 논문은 농촌진흥청 바이오그린21사업(ABC 1000912) 및 KRIBB 기관고유사업의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다. 아울러 국내 자생 개구리밥 식물의 학명 확인에 도움을 주신 아주대학교 최홍근교수님께 감사드립니다.

## 인용문헌

- Axtell NA, Sternberg SPK, Claussen K (2003) Lead and nickel removal using microspora and *Lemna minor*. *Bioresource Technol* 89:41-48
- Bergmann BA, Cheng J, Classen J, Stomp AM (2000) In vitro selection of duckweed geographical isolates for potential use in swine lagoon effluent renovation. *Bioresource technol* 73:13-20
- Chang SM, Yang CC, Sung SC (1977) The cultivation and the nutritional value of Lemnaceae. *Bull Inst Chem Acad Sin* 24:19-30
- Chang WC, Chiu PL (1978) Regeneration of *Lemna gibba* G3 through callus cultures. *Z Pflanzenphysiol* 89:91-94
- Cox KM, Sterling JD, Regan JT, Gasdaska JR, Frantz KK, Peele CG, Black A, Passmore D, Moldovan-Loomis C, Srinivasan M, Cuisson S, Cardarelli PM and Dickey LF (2006) Glycan optimization of a human monoclonal antibody in the aquatic plant *Lemna minor*. *Nat Biotechnol* 24:1591-1597
- Dirilgen N (1998) Effects of pH and chelator EDTA on Cr toxicity and accumulation in *Lemna minor*. *Chemosphere* 37:771-783
- Faskin EA (1999) Nutrient quality of leaf protein concentrates produced from water fern (*Azolla africana* Desv) and duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L. Schleiden). *Bioresource Technol* 69:185-187
- Gyunter EA, Popeiko OV, Ovodov YS (2008) Production of polysaccharides by callus cultures of common duckweed. *Appl Biochem and Microbiol* 44:104-109
- Isaksson R, Balogh SJ, Farris MA (2007) Accumulation of mercury by the aquatic plant *Lemna minor*. *International Journal of Environmental Studies* 64:189-94
- Landolt E, Kandeler R (1987) The family of Lemnaceae. a monographic study, vol 2. Veroff Geobot Inst ETH, Stiftung Rubel, Zurich, pp 65-69
- Li J, Jain M, Vunsh R, Vishnevetsky J, Hanania U, Flaishman M, Perl A, Edelman M (2004) Callus induction and regeneration in *Spirodela* and *Lemna*. *Plant Cell Reports* 22:457-464
- Marina CMD, Oronb G (2007) Boron removal by the duckweed *Lemna gibba*: A potential method for the remediation of boron-polluted waters. *Water Res* 41:4579-4584
- Mkandawire M, Taubert B, Dudel EG (2004) Capacity of *Lemna gibba* L. (Duckweed) for uranium and arsenic phytoremediation in mine tailing waters. *Int J Phytoremediation* 6:347-362
- Moon HK, Rajbhandari N and Stomp AM (1998) Effect of media components and phytohormones on in vitro frond proliferation of *Lemna gibba* G3 and 24 additional *L. gibba* strains. *Plant Res* 1:98-104
- Moon HK, Stomp AM (1997) Effects of Medium Components and Light on Callus Induction, Growth, and Frond Regeneration in *Lemna gibba* (Duckweed). *In Vitro Plant Cellular & Developmental Biol* 33:20-25
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Rahmani N, Sternberg SPK (1999) Bioremoval of lead using *Lemna minor*. *Bioresource Technol* 70:225-230
- Stefaniak B, Wonzy A, Bunda I (2002) Callus induction and plant regeneration in *Lemna minor* L. *Biologia Plantarum* 45:469-472
- Stomp AM (2005) The duckweeds: A valuable plant for biomanufacturing. *Biotechnol Annu Rev* 2005:11:69-99
- Yamamoto YT, Rajbhandari N, Lin X, Bergmann BA, Nishimura Y, Stomp AM (2001) Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor*. *In Vitro Cellular and Development Biol-Plant* 37:349-353

(접수일자 2009년 5월 6일, 수리일자 2009년 5월 20일)