

무궁화 품종 ‘난파’의 효율적인 재분화 체계 확립

손지희 · 선현진 · 강홍규 · 서석철 · 이효연

Establishment of an efficient regeneration system for *Hibiscus syriacus* ‘Nanpa’

Ji-Hi Son · Hyeon-Jin Sun · Hong-Gyu Kang · Seok-Chul Suh · Hyo-Yeon Lee

Received: 2 December 2019 / Revised: 20 December 2019 / Accepted: 20 December 2019

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract *Hibiscus syriacus* L., the national flower of Korea, is a commonly grown ornamental species found in parks, gardens and along roadsides in Korea. This study sought to establish a plant regeneration system of *H. syriacus* ‘Nanpa’ using mature leaves as an explant. Sterilized mature leaf explants were cultured on modified MS medium with combinations of NAA and BAP at various concentrations for 6 weeks. Among the various media evaluated, modified MS media containing 0.46 mg/L NAA and 0.5 mg/L BAP (CI-1) or 0.92 mg/L NAA and 1 mg/L BAP (CI-4) were the most effective for callus formation. Whitish-yellow calluses were observed on CI-1 medium, while green calluses formed on CI-4 medium. The whitish-yellow callus derived from CI-1 medium showed a higher frequency of shoot induction than the green callus derived from CI-4 on modified MS medium containing 0.5 mg/L BAP. Among the various media evaluated in this study, modified MS medium containing 0.46 mg/L NAA and 0.5 mg/L BAP was the most optimal for shoot-forming callus production. Our findings show that mature

leaves of *H. syriacus* ‘Nanpa’ can be used for *in vitro* plant regeneration, and the regeneration system described here may be a powerful tool for molecular breeding of *H. syriacus* ‘Nanpa’ in the future.

Keywords Callus formation, *Hibiscus syriacus* ‘Nanpa’, Mature leaf, Molecular breeding, Plant regeneration, Shoot induction

서론

아욱과에 속하는 무궁화는 낙엽 활엽 관목 식물로 정원, 공원, 도로변 등에 관상용 식물로 이용되고 있다. 무궁화의 어린 잎과 꽃은 식용이 가능하며(Anaka 1976; Hedrick 1972; Hu 2005; Kunkel 1984) 모든 부위는 약용으로 쓰인다. 무궁화의 전통적 약용식물로서의 효과는 매우 광범위하다. 꽃은 이노제, 위 보호제로서 잎은 이노제, 거담제로 뿌리 껍질은 항염증제, 진통제, 피부연화제, 해열제, 지혈제 뿐 만 아니라 설사, 이질, 복통, 생리통, 무좀 치료제 등으로 널리 이용되어 왔다. 이외에도 무궁화 추출물은 유방암 세포의 생존능력 저하기능(Hsu et al. 2015), 폐암 세포 증식 억제(Cheng et al. 2008), 피부상처 치유(di Martino et al. 2017), 항산화 효과, 콜라겐 합성 효과(Kim et al. 2018)가 있다고 보고되었고 음료 첨가제로도 이용(Hotta et al. 1989)되고 있다. 이와 같이 무궁화는 관상용 이외에 의약품과 화장품의 원료로도 사용되는 경제적 가치가 높은 식물 자원이다.

무궁화는 전세계적으로 약 200여 품종이 있고 그 중 국내에서 개발된 품종은 약 70여 품종이다. 국립산림과학원에서는 국내에서 개발된 품종 중 선덕, 원화, 개량단심, 고주몽, 난파, 칠보, 불새, 칠보아사달 등 8개 품종을 선정하여 우량

J.-H. Son
제주대학교 생명공학과
(Department of Biotechnology, Jeju National University, Jeju, 63243, Korea)

H.-J. Sun (✉) · H.-G. Kang
제주대학교 아열대원예산업연구소
(Subtropical Horticulture Research Institute, Jeju National University, Jeju 63243, Korea)
e-mail: sunhj89@jejunu.ac.kr

S.-C. Suh · H.-Y. Lee (✉)
제주대학교 생명공학과
(Department of Molecular Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Korea)
e-mail: hyoyeon@jejunu.ac.kr

품종으로 보급하고 있다. 무궁화는 종자 또는 영양번식이 가능하지만 타가수정작물이므로 실생묘의 경우에는 양친의 유전적 형질에 따라 유전변이가 발생하게 되어 후대가 모본의 우수한 특성을 그대로 가지지 못하는 경우가 많다. 따라서 무궁화의 번식에는 개체의 균일성을 유지하기 위해 삽목이나 접목을 통한 영양번식법이 주로 이용되고 있다. 그러나 삽목이나 접목을 통한 번식은 증식효율이 낮은 단점이 있다(Lee et al. 1998). 따라서 우량 형질을 가진 부모세대와 유전적으로 동일하면서 무궁화를 효율적으로 증식할 수 있는 조직배양 방법의 개발이 필요하다.

‘난파’는 화색이 붉은 자주색으로서 적색이 강한 꽃으로 국내에서 육성된 품종이다. 국립산림과학원에 따르면 ‘난파’는 심한 추위에도 상해가 없는 무궁화 품종 ‘불새’와 유연 관계가 가장 가깝다고 보고되었다(Shim et al. 1999). 무궁화는 내한성이 비교적 약하여 대부분의 품종은 높은 고도에서 월동하지 못한다. 생육지역이 북한계선 남방지역에 국한되므로 국내에서 재배하는 부분에 있어서는 큰 문제점이 없으나, 한반도가 통일되는 시점에 전 지역에 무궁화를 재배하기 위해서는 내한성 품종의 개발 등 대비가 필요하다(Lee et al. 1997; Shim et al. 1999). 기존의 품종 개량 방법 중 내한성 품종의 개발에 가장 적합할 것으로 판단되는 방법은 식물 형질 전환을 통한 분자유종이며, 분자유종 기술을 적용하기 위해서는 사용 품종의 조직배양계가 확립되어야 한다.

무궁화의 기내 증식을 위한 조직배양 재료로는 신초정단부(Kim et al. 1998; Kumari 2011; Yoo et al. 1996), 주심조직(Kim and Park 2000), 액아(Jeon et al. 2009), 어린 잎(Lee et al. 2011), 원형질체(Zhao et al. 1991), 접합배(Song and Park 1998), 잎자루, 뿌리(Seo et al. 2017) 등이 이용되어 왔으나 비교적 재료의 확보가 용이한 무궁화의 성숙한 잎을 재료로 한 기내 증식 시도는 거의 없는 실정이다. 신초정단부, 원형질체, 접합배 등의 경우에는 재분화 효율이 낮고 재료의 지속적인 확보가 어려운 단점이 있고, 액아나 어린 잎도 재료를 얻을 수 있는 시기가 제한적이다. 또한 잎자루와 뿌리는 실험을 수행하기 위한 양을 확보하는데 어려움이 있다. 온실에서 재배하고 있는 무궁화로부터 성숙한 잎 재료를 확보하는 것은 시기적인 제한이 적고 한번에 많은 양의 절편을 얻을 수 있는 장점이 있다.

본 연구에서는 무궁화의 대량증식의 한계점을 극복하기

위하여 제주대학교의 온실에서 재배하고 있는 무궁화 우량 품종 ‘난파’의 성숙한 잎을 이용한 효율적인 조직배양 방법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에서는 제주대학교 아열대원예산업연구소의 온실에서 재배중인 무궁화 품종 ‘난파’의 잎을 식물재료로 사용하였다. 포장에서 재배한 무궁화를 2017년 겨울 온실로 옮겨 심은 후 개엽은 2018년 3월 초에 시작되었다. 개엽 후 3개월 이상 성장한 잎을 실험에 사용하였고, 온실에서는 시기에 관계 없이 식물재료의 안정적인 확보가 가능하였다. 채취한 잎은 멸균수로 3회 세척 후 75% 에탄올에서 1분 처리한 후 멸균수로 3회 세척하였다. 1차 소독 후 0.03% Tween 20을 첨가한 차아염소산나트륨(NaOCl) 1.5%에서 20분 소독 후 멸균수로 3회 세척하였다. 잎은 가운데 엽맥을 중심으로 약 0.5 cm x 0.5 cm 크기로 잘라 실험에 사용하였다.

기본 배지

무궁화 ‘난파’의 잎으로부터 캘러스 및 신초 재분화를 유도하기 위한 배지로는 MS배지에서 철, 염화칼슘 및 비타민의 농도가 변형된 MS배지(Christensen et al. 2008)를 기본으로 사용하였다(Table 1).

캘러스 유도 및 증식

캘러스의 유도에는 변형된 MS 배지에 식물생장조절호르몬 NAA (Naphthalene acetic acid, Duchefa, Haarlem, The Netherlands)와 BAP (6- benzylaminopurine, Duchefa, Haarlem, The Netherlands)를 각각 다른 농도로 조합한 4종류의 배지를 사용하였다(Table 2). 약 0.5 cm x 0.5 cm 크기로 절단한 잎 절편을 각 캘러스 유도 배지가 포함된 페트리디쉬(SPL, Korea)에 10개씩 치상하고 6주간 배양하였다. 배양 6주 후에 캘러스 유도율과 색깔 및 성장 정도 등을 조사하였다. 캘러스 유도

Table 1 Difference between MS medium and modified MS medium used in this study

Ingredients	MS basal medium	Modified MS medium
$CaCl_2$	332.2 mg/L	1161.38 mg/L
Fe	FeSO ₄ 27.8 mg/L Na ₂ 37.3 mg/L	Fe-EDTA 17.53 mg/L
Vitamins	Nicotinic acid	1 mg/L
	Thiamine-HCl	0.1 mg/L
	Pyridoxine-HCl	0.5 mg/L

Table 2 Composition of the medium used for callus induction (CI) and adventitious shoot regeneration (RE) for tissue culture of *H. syriacus* ‘Nanpa’

Medium	Composition
CI	
1	Modified MS, 0.46 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP
2	Modified MS, 0.92 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP
3	Modified MS, 0.46 mg/L NAA, 1 mg/L BAP
4	Modified MS, 0.92 mg/L NAA, 1 mg/L BAP
RE	Modified MS, 0.5 mg/L BAP

를 위한 기내 배양은 24±1°C, 암조건 하에서 수행하였다. 각 실험은 3반복으로 수행하였다.

신초 재분화 및 발근

각 캘러스 유도배지에서 유도된 캘러스를 변형된 MS배지에 BAP 0.5 mg/L를 첨가한 재분화배지(Table 2)에 치상하고 3주간 배양하였다. 배양 3주 후에 신초 형성율을 조사하였고, 캘러스에 신초가 1개 이상인 것을 조사하였으며 하나의 캘러스에 복수의 신초가 형성된 것도 하나로 간주하였다. 또한 신초 형성 과정, 신초의 변이 여부 등을 관찰하였다. 형성된 신초는 생장을 촉진하기 위해 신초 부분을 캘러스에서 잘라내어 GA₃를 0.5 mg/L로 첨가한 변형된 MS배지에 옮겨 배양하였다. 그 후 신초 생육이 우수한 개체들은 변형된 MS 배지에 IAA (Indole amino acetic acid, Duchefa, Haarlem, The Netherlands) 0 mg/L 또는 0.5 mg/L를 첨가한 배지에 옮겨 발근을 유도하였다. 재분화를 위한 모든 실험은 23±1°C, 16시간 광주기에서 수행하였다.

결과 및 고찰

캘러스 유도

무궁화 ‘난파’의 성숙한 잎을 이용하여 캘러스를 유도하기

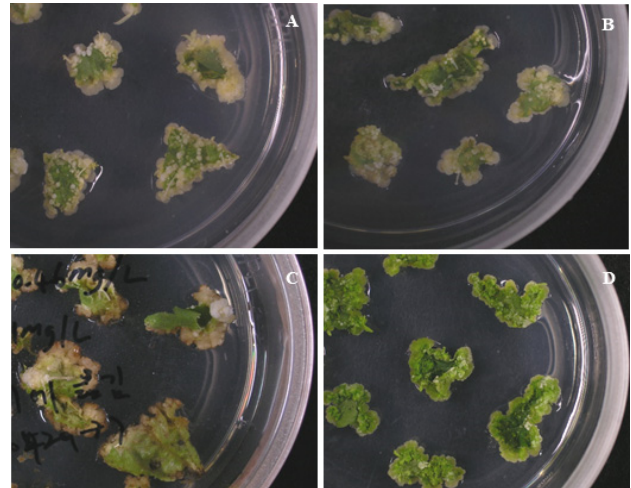


Fig. 1 Callus induction and callus formation from mature leaf explants of *H. syriacus* ‘Nanpa’ on the different callus induction (CI) media. (A) CI-1, (B) CI-2, (C) CI-3, (D) CI-4

위하여 잎 절편을 잘라 NAA 0.46 mg/L와 BAP 0.5 mg/L (CI-1), NAA 0.92 mg/L와 BAP 0.5 mg/L (CI-2), NAA 0.46 mg/L와 BAP 1 mg/L (CI-3), NAA 0.92 mg/L와 BAP 1 mg/L (CI-4)를 각각 조합한 캘러스 유도배지(Callus induction, CI)에 치상하여 암조건 하에서 배양하였다. 그 결과 잎 절편 가장자리부터 캘러스가 형성되기 시작했고 사용한 모든 캘러스 유도배지에서 캘러스의 형성이 관찰되었다. 암조건 하에서 NAA 0.92 mg/L와 BAP 1 mg/L를 포함한 캘러스 유도배지(CI-4)에서 유도된 캘러스는 짙은 녹색을 띠고 다른 배지에 비해 캘러스의 성장 정도도 가장 빨랐다(Table 3). 그 외 다른 캘러스 유도배지에서 형성된 캘러스는 노란 빛이 도는 흰색을 나타냈다(Fig. 1). 유도된 모든 캘러스의 질감은 딱딱하고 쉽게 부숩지 않았으며 캘러스 유도배지 CI-1과 CI-4에서는 캘러스가 증식함에 따라 신초도 함께 형성되는 것이 관찰되었다(Fig. 2). 또한 캘러스 유도율은 CI-1 배지와 CI-4 배지에서 100%로 가장 높은 효율을 나타내었다(Table 3). 본 결과는 ‘난파’ 성숙 잎 절편체로부터의 캘러스 유도에는 식물생장 호르몬 NAA와 BAP의 혼용처리가 적합함을 시사한다.

Table 3 Effects of different concentrations of NAA and BAP on callus induction frequency

Callus induction (CI) medium	Growth regulator (mg/L)		Callus induction frequency (%)	Callus growth ^a	Callus color
	NAA	BAP			
1	0.46	0.5	100±0.00	+++	Whitish yellow
2	0.92	0.5	98±3.4	+++	Whitish yellow
3	0.46	1	84.1±5.45	++	Whitish yellow
4	0.92	1	100±0.00	++++	Green

Callus induction frequency was estimated after 6 weeks of culture in the dark. Each value represents the mean ± SD of three experiments with at least 30 explants each.

^a -: None, +: Low, ++: Medium, +++: High, ++++: Very high

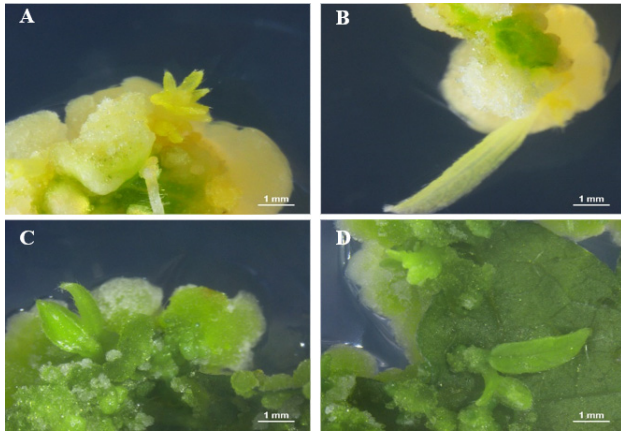


Fig. 2 Effects of different concentrations of growth regulators on callus induction. Adventitious shoots were observed on 6 weeks old callus. (A and B) Callus induced from CI-1, (C and D), Callus induced from CI-4. White bar represents 1 mm

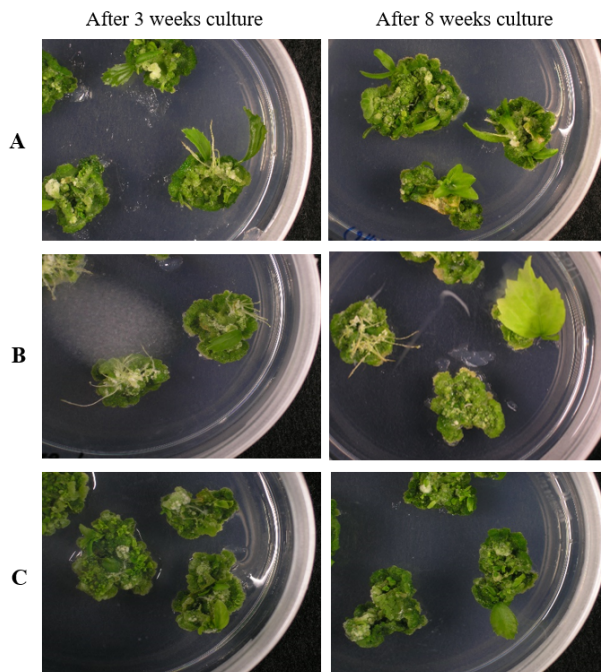


Fig. 3 Effect of callus induction medium supplemented with different concentrations of growth regulators on shoot regeneration. (A) Shoot regeneration of callus derived from CI-1 medium, (B) Shoot regeneration of callus derived from CI-2 medium, (C) Shoot regeneration of callus derived from CI-4 medium

캘러스 유도배지가 신초 형성에 미치는 영향

Hibiscus 속 식물은 신초 유도시 BAP의 농도가 높으면 한 캘러스 당 형성되는 신초의 수가 증가한다는 보고(Christensen et al. 2008)에 따라 본 실험에서는 변형된 MS배지에 BAP를 0.5 mg/L 농도로 단독 처리한 신초 재분화배지를 사용하였다. 캘러스 형성률이 가장 낮았던 CI-3 캘러스 유도배지 유래의 캘러스를 제외하고 나머지 CI-1, CI-2 및 CI-4배지에서

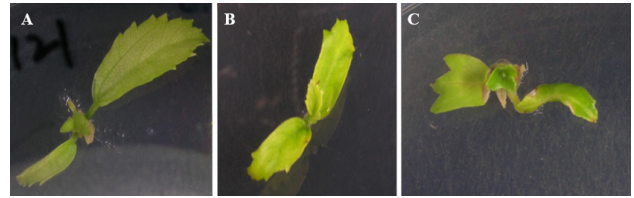


Fig. 4 Morphological variation in shoots regeneration from mature leaves of *H. syriacus* 'Nanpa'. (A and B) Normal shape leaf, (C) Modified shape leaf

Table 4 Effect of callus induction medium supplemented with different concentrations of growth regulators on shoot regeneration efficiencies

Medium used for callus induction	Shoot regeneration efficiency (%)
CI-1	100 ± 0.00
CI-2	40 ± 5.77
CI-4	83.7 ± 9.86

The callus induced from different callus induction medium was transferred to shoot regeneration (RE) medium and the shoot regeneration efficiency was calculated after 3 weeks of culture. Each value represents the mean ± SD of three experiments with at least 20 explants each.

각각 유도된 캘러스를 재분화배지에 옮겨 3주간 배양한 후 신초 형성율을 조사하였다. 그 결과 캘러스 유도배지에서 이미 신초의 형성이 관찰되었던 CI-1과 CI-4 유래의 캘러스는 더욱 비대해짐과 동시에 신초의 형성이 가속화됨이 관찰되었다(Fig. 3). CI-1과 CI-4 배지 유래의 캘러스는 높은 신초 형성율을 나타냈고, 특히 CI-1 유래 캘러스에서의 신초형성율은 100%로 조사되었다(Table 4). 이에 비해 CI-2 유래의 캘러스는 다소 낮은 신초형성율을 나타냈다. CI-2 유래 캘러스의 신초형성율을 개선할 수 있는지를 확인하기 위해 신초가 형성되지 않은 캘러스 덩어리를 여러 개로 분할하여 동일한 재분화배지에 옮겨 10일간 배양한 후 신초형성 여부를 조사하였다. 그 결과 여러 개의 조각으로 분할된 CI-2 유래 캘러스의 신초형성율은 약 67%로 증가하였다(데이터 미제시). 이 결과는 캘러스의 크기가 크면 재분화 빈도가 낮아진다는 보고(Haque and Islam 2015)와 일치하며 CI-1 및 CI-4 유래의 캘러스도 적절한 크기로 분할하여 배양하면 더 많은 신초형성이 가능함을 시사한다. 신초 형성 후 약 1 cm 이상 성장된 신초는 변형된 MS배지에 IAA 0.5 mg/L를 첨가한 배지에서 쉽게 발근이 유도되었다. '난파'의 성숙 잎으로부터 얻은 재분화 식물체는 극히 일부에서 잎 형태에 있어서의 변이가 관찰되었으나 대부분의 재분화 식물체는 정상적인 잎과 형태적 특성이 동일하였다(Fig. 4).

본 연구를 통해 확립된 성숙한 잎을 이용한 무궁화의 재분화 체계는 식물재료를 얻는데 시기적인 제한을 받지 않고 보다 적은 비용으로 많은 양의 잎 절편을 얻을 수 있는 장점이

있다. 또한 재분화 효율이 매우 높으므로 향후 우수 무궁화 품종의 대량증식 및 무궁화의 분자육종을 통한 신품종 개발에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

결론

무궁화는 우리나라를 상징하는 나라 꽃으로 공원, 정원, 도로변 등에 관상용으로 널리 이용되고 있다. 본 연구는 무궁화 품종 ‘난파’의 성숙 잎을 재료로 이용하여 재분화 체계를 확립하기 위하여 수행되었다. 표면 살균한 성숙 잎 절편을 각기 다른 농도로 조합 처리된 NAA와 BAP를 포함하는 변형된 MS배지에서 배양하였다. 이들 배지 중 0.46 mg/L NAA와 0.5 mg/L BAP를 포함하는 변형된 MS 배지(CI-1)와 0.92 mg/L NAA와 1 mg/L의 BAP를 포함하는 변형된 MS 배지(CI-4)가 캘러스 형성에 가장 효과적이었다. CI-1 배지에서는 흰색을 띤 노란색의 캘러스가 관찰되었고, CI-4 배지에서는 녹색의 캘러스가 형성되었다. BAP를 0.5 mg/L의 농도로 포함하는 변형된 MS배지에서의 신초형성율은 CI-1배지 유래의 캘러스가 CI-4 유래의 캘러스보다 높았다. 본 연구에서 사용된 배지 중 신초형성능을 가진 캘러스의 생산에는 0.46 mg/L NAA와 0.5 mg/L BAP를 포함하는 변형된 MS 배지가 가장 적합하였다. 본 연구의 결과는 무궁화 품종 ‘난파’의 식물 재분화에 성숙 잎이 사용 가능함을 보여주고 있고, 본 연구에서 확립된 재분화 시스템은 향후 ‘난파’ 품종의 분자육종에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

사사

이 논문은 2019년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2019R1A6A1A11052070).

References

- Anaka T (1976) Tanaka's cyclopaedia of edible plants of the world. Keigaku Publishing, Tokyo, 924 pp
- Cheng YL, Lee SC, Harn HJ, Huang HC, Chang WL (2008) The extract of *Hibiscus syriacus* inducing apoptosis by activating p53 and AIF in human lung cancer cells. *Am J Chin Med* 36:171-184
- Christensen B, Sriskandarajah S, Serek M, Muller R (2008) In vitro culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: Influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 93:151-161
- di Martino O, Tito A., De Lucia A, Cimmino A, Cicotti A, Apone F, Colucci G, and Calabrò V (2017) *Hibiscus syriacus* extract from an established cell culture stimulates skin wound healing. *BioMed Res Int* 2017, 7932019
- Haque M, Islam SMS (2015) Callus age and size of barley (*Hodrdium vulare* L.) improves regeneration efficiency. *Not Sci Biol* 7:189-191
- Hedrick UP (1972) *Sturtevant's edible plants of the world*. Dover Publications. New York. pp 686
- Hotta M, Ogata K, Nitta A, Hosikawa K, Yanagi M, Yamazaki K (1989) *Useful plants of the world*. p. 1499. Heibonsha, Tokyo, Japan
- Hsu RJ, Hsu YC, Chen SP, Fu CL, Yu JC, Chang FW, Chen YH, Liu JM, Ho JY, Yu CP (2015) The triterpenoids of *Hibiscus syriacus* induce apoptosis and inhibit cell migration in breast cancer cells. *BMC Complement Altern Med* 15:65
- Hu SY (2005) *Food plants of China*. The Chinese University Press, Hong Kong, pp 844
- Jeon SB, Kang SW, Kim WS, Lee GP, Kim SH, Seo SG (2009) In vitro plant regeneration from axillary buds of *Hibiscus syriacus* L. *J Plant Biotechnol* 36: 174-178
- Kim JH, Park SM (2000). In vitro regeneration system from nucellus of fertilized ovules in *Hibiscus syriacus* L. *J Plant Biotechnol* 11: 28-38
- Kim EK, Yoo YK, Kim KS (1998) Thidiazuron-induced shoot formation of *Hibiscus syriacus* L. 'Honghwarang' by suspension culture. *Kor J Hort Sci Technol* 16:525-527
- Kim M, Kim YJ, Park SY (2018) Effects of white *Hibiscus syriacus* L. root extracts as functional cosmetic materials. *Asian J Beauty Cosmetol* 16: 477-486
- Kumari S, Pandey RK (2011) In vitro plant regeneration from shoot tip explants of *Hibiscus syriacus* L. *Int Q J Life Sci* 6:647-648
- Kunkel G (1984) *Plants for human consumption: an annotated checklist of the edible phanerogams and ferns*. Koeltz Scientific Books, Koenigstein, pp 393
- Lee HS, Lee JS, Kwack BH (1997) Cold hardness of *Hibiscus syriacus* cultivars and evaluation of assay methods in determination of cold hardness. *J Kor Soc Hort Sci* 38: 541-545
- Lee HS, Lee JS, Kwack BH (1998) Characteristics of rooting and shoot growth influenced by cultivar and flower types in *Hibiscus syriacus* hardwood cutting. *Kor J Hort Sci & Tech* 16:528-530
- Lee JY, Kang EJ, Kim SH, Kim DS, Kim JB, Ha BK, Kang SY (2011) The effect of plant growth regulators on callus induction and shoot regeneration from the dwarf type variety, *Hibiscus syriacus* L.var. Ggoma. *J Radiat Ind* 5:231-236
- Seo SG, Ryu SH, Zhou Y, Kim SH (2017) Development of an efficient protocol for high-frequency regeneration system in *Hibiscus syriacus* L. *J Plant Biotech* 44:164-170
- Song KH, Park HG (1998) High frequency plant regeneration through suspension culture in *Hibiscus syriacus*. *J Kor Soc Hort Sci* 39: 843-848
- Shim KK, Kim KH, Seo BK (1999) Top growth, flowering, cold hardness, and aphids resistance of *Hibiscus syriacus* cultivars. *J Kor Soc Hort Sci* 40:99-106

Yoo EH, Yoo YK, Kim KS (1996) Effects of growth regulators, sucrose, light, and medium on callus and shoot formation in shoot-tip culture of *Hibiscus syriacus* L. 'Honghwarang'. J Kor Soc Hort Sci 37:317-323

Zhao YX, Yao DY, Harris PJC (1991) Isolation and culture of protoplasts from callus tissue of *Hibiscus syriacus* L. Plant Cell Tiss Organ Cult 25:17-19