

번행초의 잎 절편으로부터 신탄의 재분화

황성진[†] · 표병식 · 황백*

동신대학교 식품생물공학과, * 전남대학교 생물학과

Shoot Regeneration from the Leaf Explants of *Tetragonia tetragonoides* O. KUNTZE

Sung Jin Hwang[†], Byoung Sik Pyo and Baik Hwang*

Department of Food and Biotechnology, Dongshin University, Naju

* Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju, Korea

ABSTRACT : A protocol has been developed for differentiation of adventitious shoots directly from leaf segments of *Tetragonia tetragonoides* O. Kuntze. Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 2 mg/L N⁶-benzyladenine (BA) and 0.5 mg/L α -naphthaleneacetic acid (NAA) supported the induction of adventitious shoots from leaf explants. Adventitious shoots were multiplied by subculturing on the double strength MS (2MS) medium supplemented with 0.5 mg/L NAA and 2 mg/L BA. Shoots were rooted on MS basal medium without any growth regulators.

서 언

번행초(*Tetragonia tetragonoides* O. Kuntze)는 석류과(Aizoaceae)에 속하는 육질(肉質)의 다년생 초본으로 남해안 섬지역의 모래땅에 자생하고 있다. 민간에서는 어린순을 나물로 먹거나 전초를 위압, 위궤양, 종기(腫氣), 충독(蟲毒)등의 치료제로 사용하고 있으며, 주요 성분으로는 vitamine A, B, 그리고 항균작용을 나타내는 tetragonin등이 전초에 함유되어 있다 (Sung, et al, 1998). 번행초는 서식 환경이 고염조건으로 제한되어 있기 때문에 육지에서 양질의 재배가 용이하지 않고, 봄부터 가을까지 개화가 이루어지나 종자에 의한 번식이 쉽게 이루어지지 않고 있다. 노지재배나 자생하는 약용 자원식물의 경우 서식지의 자연환경의 영향을 크게 받을 뿐만아니라 성장 단계나 품종간에 특정 약리성분의 생합성량이 차이를 나타내기 때문에 균질화된 약리물질의 생산을 위한 다양한 기술의 개발이 절실히 요구되고 있

다. 번행초의 경우 아직까지 국내외적으로 체계적인 재배 기술이나 조직배양에 의한 체세포배의 유도, 재분화, 형질전환 등과 같은 연구 결과가 보고된 바 없다.

본 연구에서는 국내 자생하는 약용 자원식물로부터 유용물질의 획득과 우량 품종의 생산을 위한 조직배양 기술의 개발을 위한 연구의 일환으로 남해안 도서 지역에 자생하는 번행초를 채취하여 기내(*in vitro*)배양 방법을 조사 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

번행초(*Tetragonia tetragonoides* O. Kuntze)는 전남 해안 도서지역에서 채취하여 밀폐된 비닐 용기에 넣어 온 반 후 10℃ 저온 보관된 재료들 중 상태가 양호한 것만을 선별하여 사용 하였다.

[†] Corresponding author (Phone) : Sung Jin Hwang, 061-330-3225, E-mail : Jinsci@lycos.co.kr

Received April 15 2002 / Accepted May 31 2002

2. 부정아의 유도

재료의 표면 살균은 70%(v/v) ethanol에서 5분, 그리고 1%(v/v) sodium hypochlorite 용액에서 5분간 침지시킨 후 멸균수로 5회 세척하였다. 표면살균된 모식물체는 멸균된 여과지 위에서 여분의 수분을 제거한 다음 잎, 줄기, 뿌리를 절취하여 고형배지에 치상 하였다. 부정아를 유기하기 위한 기본 배지는 MS배지를 사용 하였으며, 여기에 BA와 kinetin을 0.5-5 mg/L 농도로 단독 처리 하거나 NAA, IAA, 그리고 IBA를 0.1-1 mg/L 농도로 혼합하여 첨가 하였다. 탄소원으로 2%(w/v) sucrose와 고형제인 0.3%(w/v) Phytagel을 첨가 하였으며, 배지의 pH는 1N NaOH로 5.7로 조정 하였다. 모든 배지는 121℃에서 15분간 감압멸균 하였으며, 식물성장 조절물질은 0.2 μm pore size의 일회용 membrane filter를 사용해 여과멸균 한 후 첨가 하였다. 배양체는 16/8의 광주기(24 μmol. m⁻² s⁻¹)로 25±1℃로 배양 하였다.

3. 신초의 증식

신초의 증식을 위해 약 1.5 cm 정도 자란 부정아를 절취하여 MS 기본배지와 무기염의 농도가 두배로 증가된 2MS 배지, 그리고 무기염의 농도를 절반으로 줄인 1/2MS배지에 옮겨 각각 배양 하였다. 식물성장조절물질은 0.5 mg/L NAA에 BA를 1-5 mg/L 조합하여 배지에 첨가하였으며, 탄소원은 1-5%(w/v)까지 처리 하였다.

4. 신초의 발근

기내(*in vitro*)에서 증식된 신초의 발근은 무기염의 농도를 반으로 줄인 1/2MS와 MS 배지를 기본으로 여기에 IAA와 NAA를 각각 0, 0.1, 1 mg/L 씩 첨가 하거나 성장조절물질이 완전 제거된 배지를 각 실험구로 하여 발근을 유도 하였다.

결과 및 고찰

1. 부정아의 형성

표면살균 처리된 식물체로부터 절취한 줄기, 잎, 뿌리의 조직 절편을 MS 기본배지에 BA와 kinetin을 단독 처리하거나 IAA, IBA, 그리고 NAA와 함께 농도별로 처리하여 치상 하였을 때 2 mg/L BA와 0.5 mg/L NAA가 함께 처리된 실험구에서 잎의 절편 조직으로부터 부정아가 직접 형성 되었다(Table 1). 조직절편으로부터 직접 기관의 형성을 유도하기 위해서는 BA를 단독 처리하거나 BA와 NAA를 조합하여 처리하는 경우가 많다 (Tripepi, 1997; Shivasta and Rajani, 1999; Hazra et al., 2000). 번행초의 경우에 있어서 시토키닌류의 단독

처리구나 IAA, IBA를 처리한 실험구 모두에서 부정아는 형성되지 않았다. 한편, 잎을 제외한 뿌리나 줄기의 절편으로부터는 모든 배지 조건에서 직접 기관형성을 유도할 수 없었으나, 1-2 mg/L BA와 0.1-1 mg/L NAA의 조합 처리구에서는 줄기 절편으로부터 캘러스가 유기 되었다. Figure 1.은 성장조절물질이 첨가된 MS 기본배지에 치상한 잎의 절편으로부터 배양 6주 후 형성된 부정아를 보여주고 있다. 이와같이 잎의 절편으로부터 부정아의 직접적인 분화는 배지조건, 식물성장조절물질, 그리고 재료에 따라 많은 차이를 나타내는 것으로 *Pinellia* (Tsay et al., 1989), *Dianthus* (van Alvorst et al., 1994),

Table 1. Effect of BA and NAA on direct regeneration from leaf segments of *T. tetragonoides*

PGRs (mg/l)	Percentage explants producing shoots ^a
BA 0.5 NAA 0.1	0.0
	0.5
	1.0
BA 2.0 NAA 0.1	68.6
	0.5
	1.0
BA 3.0 NAA 1.0	42.1
	0.5
	1.0

^a Experiments were repeated three times with 25-30 explants per treatment.

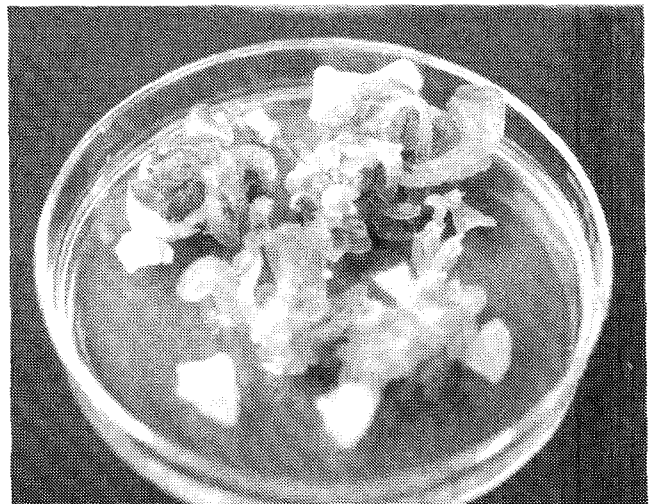


Fig. 1. Adventitious shoot buds regenerated from leaf explants in MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA and 2 mg/L BA

Petasites (Wildi et al., 1998), *Alstroemeria* (Lin et al., 1997), *Verbascum* (Turker et al., 2001)등도 같은 연구 결과를 통하여 보고한 바 있다.

2. 신초의 증식

유기된 부정아로부터 유묘를 대량으로 얻기위해 기저부를 절취하여 0.5 mg/L NAA에 BA의 농도를 각기 다르게 조합 처리한 MS배지로 옮겨 배양 하였다.

Table 2. Effect of PGRs and culture media on shoot multiplication in *T. tetragonoides*

Media	PGRs (mg/L)		No. of shoots/explant (Responding explants % ^a)
1/2MS	NAA 0.5	BA 1.0	0.4 ± 0.3 (56.3)
		2.0	1.2 ± 0.4 (42.1)
		3.0	ND*
MS	NAA 0.5	BA 1.0	ND
		2.0	6.3 ± 0.2 (97.8)
		3.0	1.6 ± 0.2 (76.2)
2MS	NAA 0.5	BA 1.0	ND
		2.0	0.8 ± 0.4 (23.4)
		3.0	ND

* ND ; not detected

^a Experiments were repeated three times with 25-30 explants per treatment.

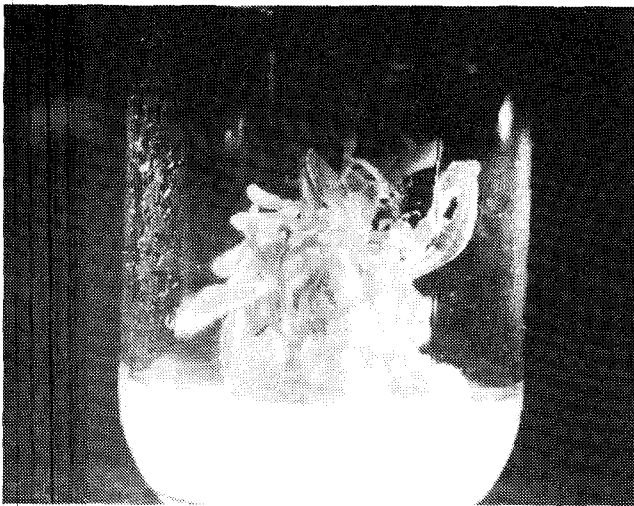


Fig. 2. Induction and elongation of multiple shoots from adventitious shoots in MS medium supplemented with 2 mg/L BA and 0.5 mg/L NAA

Stefaan등(1994)은 신초의 증식 시 BA가 가장 효과적이라고 보고한 바 있으나, 변행초의 경우 신초로부터 부정아의 형성은 2 mg/L BA를 조합 처리한 실험구에서 배양 6주 후 약 6.3±0.2개로 가장 높게 형성 되었다 (Table 2, Fig. 2). 한편, 신초의 지속적인 성장을 위해 배양 3주 후 무기염의 농도를 2배로 높인 2MS배지로 옮겨 주었다. MS배지에서 지속적으로 신초를 배양한 결과 대부분의 배양체에서 유리화현상(vitrification)이 유발되었으며, 신초의 성장이 또한 지연되었다. 그러나, 2MS배지로 옮겨 배양한 신초는 진한 녹색을 띄며 지속적으로 성장 하였다(Fig. 3). 이와같은 결과는 고염 조건에서 서식하는 모식물체의 생활환경과도 관련지어 볼 수 있으나, *Lilium spp.*을 비롯한 일부 식물종의 기내 (*in vitro*) 배양 과정에서 모식물체의 서식환경과 다르게 고농도의 무기염을 필요로 하는 경우도 보고된 바 있다 (Takayama and Misawa, 1979).

3. 신초의 발근

길이가 2-3 cm 정도 자란 신초의 기저부를 절취하여 IAA와 NAA가 첨가된 기본 배지에 치상하여 발근을 유도 하였다. 오옥신의 처리구에서는 모두 발근이 이루어 지지 않았으며, 농도가 증가 할 수록 절취부에서 캘러스가 유기 되었다. 발근을 촉진하기 위하여 저농도의 오옥신을 첨가해주는게 효과적일 수 있으나(Boggetti, et al., 1999), 변행초의 경우 *Salvia spp.* (Cuenca and Amom-Marco, 2000)와 *Safflower* (George and Rao, 1982; Tejovathi and Anwar, 1987)에서 처럼 신초의 발근은 모두 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 기본배지에서 이루어 졌으며, 고농도의 오옥신 처리구에서는 오히려

Table 3. Effect of PGRs and culture media on root formation in *T. tetragonoides*

Media	PGRs (mg/L)	Root no./explants (rooting % ^a)
1/2MS	-	7.3 ± 0.03 (98.4)
	IAA 0.1	1.2 ± 0.03 (12.1)
	NAA 0.1	ND*
MS	-	6.4 ± 0.04 (98.7)
	IAA 0.1	2.1 ± 0.03 (23.4) C**
	1.0	C

* ND ; not detected, ** C ; callusing

^a Experiments were repeated three times with 25-30 explants per treatment.

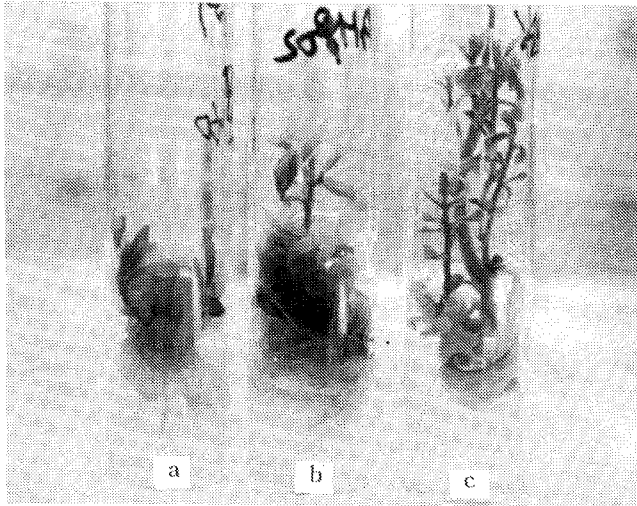


Fig. 3. Adventitious shoots cultured on (a) 1/2MS, (b) MS, and (c) 2MS medium without PGRs.

캘러스화 현상을 유발 하였다. 배지 조건에따는 발근율은 1/2MS와 MS배지에서 유의적인 차이없이 3주 후 모두 발근이 이루어졌으나, 2MS배지의 경우 초기에 발근이 억제 되는 현상을 확인할 수 있었다 (Table 3, Fig. 3).

적 요

번행초(*Tetragonia tetragonoides*)의 잎 절편으로부터 가내(*in vitro*) 증식을 유도 하였다. 2 mg/L BA와 0.5 mg/L NAA가 조합 처리된 MS 기본배지에서 잎 절편으로부터 직접 기관형성 과정을 통하여 부정아가 형성 되었다. 유의한 부정아는 절취하여 2 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA이 첨가된 MS배지로 옮겨 유묘의 대량 증식을 시도 하였으며, 배양 3주 후 싹초의 지속적인 성장을 위해 무기염의 농도가 두배로 증가된 2MS배지로 옮겨 배양 하였다. 증식된 싹초로부터 발근은 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 1/2MS와 MS배지 모두에서 이루어 졌다.

사 사

본 연구는 200년도 한국학술진흥재단 지원연구비(DP-0482)에 의해 수행 되었음

LITERATURE CITED

Boggetti B, Jasik J, Mantell S (1999) *In vitro* Multiplication of

Anacardium occidentale L. using shoot node explants of glass-raised plants. *Plant Cell Rep.* 18 : 456-461

Cuena S, Amo-Marco JB (2000) *In vitro* Propagation of two spanish endemic species of *Salvia* through bud proliferation. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant.* 36 : 225-229

George L, Rao PS (1982) *In vitro* Multiplication of *Carthamus tinctorius* through tissue culture. *Proc. Indian Acad. Sci.* 99 : 293-296

Hazra S, Kulkarni AV, Nalawade SM, Banerjee AK, Agrawal DC, Krishnamurthy KV (2000) Influence of explants, genotypes, and culture vessels on sprouting and proliferation of pre-existing meristems of cotton. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant.* 36 : 505-510

Lin HS, De-Jen MJ, Jacobson E (1997) Direct shoot regeneration from excised leaf explants of *in vitro* grown seedlings of *Alstroemeria*. *Plant Cell Rep.* 16 : 770-774

Shivasta N, Rajani M (1999) Multiple shoot regeneration and tissue culture studies on *Bocopa monnieri* L. *Plant Cell Rep.* 18 : 919-923

Stefaan P, Werbrouck O, Deberg PC (1994) Applied aspects of plant regeneration. *In Plant Cell Culture: A practical approach.* Dixon, R. A. and R. Z. Gonzales ed. Oxford Univ. Press NY, pp.127-145

Sung CK, Kimura T, But PPH, Ji-Xian Guo, Han BH (1998) *In* International collation of traditional and folk medicin. *World Sci. Press* pp.27-28

Takayama S, Misawa M (1979) Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. *Physiol. Plant.* 46 : 184-190

Tejowath G, Anwar SY (1987) Plantlet regeneration from cotyledonary cultures of *Carthamus tinctorius* L. *In Plant cell and tissue cultures of economically important plants.* Reddy, G. M. ed. Hyderabad India, Osmania Univ. pp.347-353

Tripepi RR (1997) Advantitious shoot regeneration. *In Biotechnology of ornamental plants.* Geneve, R. L., Preece, J. E., Merkle, S. A. ed. Wallingford, UK. pp. 45-71

Tsay HS, Gau TG, Chen CC (1989) Rapid clonal propagation of *Pinellia temata* by tissue culture. *Plant Cell rep.* 8 : 450-454

Turker AU, Camper ND, Gurel E (2001) *In vitro* Culture of common mullein (*Verbascum thapsus* L.). *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant.* 37 : 40-43

van-Alvorst AC, Koehorst HJJ, Bruinsma T, Dons JJM (1994) Improvement of advantitious shoot formation from carnation leaf explants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 37 : 87-90

Wildi E, Schaffner W, Berger K (1998) *In vitro* Propagation of *Petasites hybridus* (Asteraceae) from leaf and petiole explants and inflorescence buds. *Plant Cell Rep.* 18 : 336-340