

Stevia 절편체 종류의 배양에 따른 식물체 재분화

박규환, 김경민^{1*}

상주대학교 생명자원과학대학 식물자원학과, ¹경북대학교 유전공학연구소

Factors Affecting Plant Regeneration in the Culture of Different Explants of Stevia (*Stebia rebaudiana* Bertoni)

Gyu-Hwan Park, Kyung-Min Kim^{1*}

Department of Plant Resources, College of Life and Resources, Sangju National University

¹Institute of Genetic Engineering, Kyungpook National University

ABSTRACT This study was conducted to determine the optimal concentrations of plant hormones (2,4-D, picloram, dicamba, NAA, kinetin) and the suitable explants among seeds, hypocotyl, and cotyledons on callus formation and plant regeneration of stevia (*Stebia rebaudiana* Bertoni). The frequency of callus fomation was higher in the young leaf-explants then the older ones, and in the seeds then the hypocotyls and cotyledons on MS medium with 1 mg/L 2,4-D. After transfer of seed-derived stevia callus producing embryogenic callus on plant-regeneration medium, the frequency of plant regeneration from callus was 23.8% on MS medium with 1 mg/L NAA and 3 mg/L kinetin.

Key words: Plant regeneration, seed, stevia

서 론

감미료로서 가장 많이 사용되어 온 것은 설탕이지만 과다 섭취에 기인하는 부작용이 널리 인식되면서, 그 수요가 선진국에서는 1970년대 말경부터 점차 감소하는 추세에 있고 (Park and Lee 1997), 이를 대체할 다양한 종류의 대체감미료가 개발되고 있다. 천연 대체감미료로서 현재 가장 많이 사용되고 있는 stevioside는 남미 파라과이가 원산지인 국화과 다년생 초본 stevia (*Stebia rebaudiana* Bertoni)에 함유된 배당체로, 감미도는 설탕의 250~300배에 달하며, 설탕의 감미질과 가장 유사한 감미료로서 설탕의 단점인 당뇨병과 비만을 예방할 수 있는 천연 감미료로 주목받고 있다. Stevia 건엽은 파라과이, 브라질 등 남미에서는 수 백년 동안 사용되어 왔으며, 현재 일본, 한국을 중심으로 의약품, 과자, 스낵, 소주, 장류, 절임식품, 수산가공품 등에 사용되고 있다. Stevioside는 사카린

아니 아스파탐이 갖는 발암성, 열과 pH에 대한 불안정, 낮은 용해도 등의 문제점을 가지지 않는 천연물 유래 감미료로서, 사용량이 점차 증가하고 있다 (Franta and Beck 1986; Bakal and Nabors 1990).

가자과 식물의 조직배양에서는 기내배양된 세포나 조직으로부터 embryogenesis 과정을 거쳐서 식물체가 재분화된다는 것이 조직배양 초기부터 알려져 왔다. 근년의 조직배양 기술의 발전과 더불어 진주조 (Swedlund and Vasil 1985), 밀 (Brown et al. 1989), 보리 (Thomas and Scott 1985), 옥수수 (Pareddy and Petolino 1990), 벼 (Chen et al. 1985) 등과 같은 화분과 작물의 조직배양에서도 배발생캘러스가 유도되며 이러한 배발생캘러스는 그 색깔이 희거나 연한 황색을 띠고, 불투명하며 캘러스 덩어리는 compact 하고 그 표면은 광택이 있으면서 nodular하여 비배발생캘러스와는 외부 형태적인 측면에서 구별이 되는 특징을 가지고 있으면서 비배발생캘러스에 비해 재분화 능력도 높고 비교적 오랫동안 계대배양하여도 쉽게 재분화력이 상실되지 않는 것으로 보고되고 있다 (Vasil and Vasil 1984).

*Corresponding author Tel 053-950-5711 Fax 053-958-6880
E-mail kkm@bh.knu.ac.kr

*Stevia*의 경우 유엽조직으로 유래된 캘러스 배양에서 식물체재분화가 보고(Chae and Yu 1984)된 이후 근년까지 식물체재분화 효율 향상이나 배발생캘러스와 비배발생캘러스 등의 연구가 수행되고 있지 않은 실정이다. 또한 캘러스의 형태에 대한 보고도 전혀 이루어지고 있지 않은 실정이다. 벼를 비롯한 여러 식물의 연구에서 배양재료로 이용하여 배발생캘러스의 유기와 부정배 형성에 대한 연구결과가 보고되고 있으나, 이러한 배발생캘러스의 유기에는 모식물의 genotype이나 배양에 이용되는 조직부위도 중요한 영향을 미치며, 배지의 조성, 배양조건과 방법에 따라서도 배발생캘러스의 유기양상과 부정배 형성 효율이 크게 상이한 것으로 알려지고 있다 (Swedlund and Vasil 1985; Brown et al. 1989; Thomas and Scott 1985; Pareddy and Petolino 1990; Chen et al. 1985).

본 연구에서는 잎절편체, 하배축, 상배축 및 배양재료의 안정적인 공급이라는 측면에서 종자 등을 이용하여 캘러스 형성과 식물체 재분화에 관여하는 몇 가지 요인에 대한 실험을 수행하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

본 실험에는 2001년 상주대학교 농과대학 실습포장에서 재배하고 있는 3년생 *stevia*의 잎, 종자 및 종자로부터 발아한 cotyledon과 hypocotyl을 공시재료로 이용하였다.

공시재료의 완숙종자로부터 솜털을 제거한 종자를 70%에 탄을 용액에 30초, 1% sodium hypochlorite 용액에 40 분간 침지한 후, 살균수로 3~5회 씻은 다음 멸균수 (5~6 mL)를 넣은 200 mL 배양병에 20립씩 파종하였다. 파종 14일 후에 발아된 *stevia*의 cotyledon과 hypocotyl을 5 mm 크기로 절단하여 배지가 20 mL씩 분주된 샤프레 (Ø 9 cm)에 10개씩 배양하여 캘러스 형성을 유도하였다. 종자의 경우는 캘러스 형성 배지가 분주된 샤프레에 10개씩 치상하여 캘러스 형성을 유도하였다. 특히 잎절편체의 치상은 잎이 줄기로부터 생성된 시기를 기점으로 하여 어린잎은 3일된 것, 중간잎은 7일 자란 것, 늙은잎 14일 자란 것의 잎을 채취하여 각각 잎절편체의 크기를 지름이 5 mm 정도의 크기로 만들어 캘러스 형성배지에 치상하였다.

캘러스 형성 정도를 조사하기 위하여, 1~2 mg/L 2,4-D, 1~2 mg/L picloram, 1~2 mg/L dicamba, 300 mg/L casein hydrolysate, 10 mM proline 및 2 g/L gelrite가 첨가된 MS배지 (Murashige and Skoog 1962)를 이용하였다. 식물체 재분화에는 1 mg/L NAA, 3~5 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose 및 2 g/L gelrite가 첨가된 MS배지를 이용하였다. 캘러스 형성은 26±1°C의 암상태에서, 식물체재분화는 캘러스 형성 배지에서 30일 정도 자란 캘러스를 약 5 mm 크기로 세분하여 식물체재분화 배지가 20 mL씩 분주된 샤프레에 10개씩 이식하여 26±1°C, 16시간 명상태 (2500 Lux)에서 배양하였다. 식물체

재분화 배지에 이식한 캘러스는 녹색점이 생성되면 test tube (Ø 2.3×17.5 cm)에 이식하여 유식물체로 발달 시킨다. 건전한 식물체로 발달 시키기 위하여 먼저 뿌리 형성을 위하여 MS배지가 20 mL 든 배양병 (Ø 5×11 cm)에 이식하여 뿌리를 발육시킨 후 2~3일 배양병의 두껍을 열어 순화시켜, vermiculite가 든 pot에 이식하여 30°C의 기온이 유지되는 온실에서 재배한다. 캘러스 형성을 조사는 배양 30일 후에, 식물체재분화를 조사는 캘러스 이식 40일 후에 조사하였다.

결과 및 고찰

*Stevia*의 잎절편의 연령별로 캘러스 형성배지에 배양하여 30일 후에 각 절편체의 형성된 캘러스의 형성정도를 조사한 바 (Table 1), 어린잎이 중간잎과 늙은잎에 비해 캘러스 형성이 양호하였으며, 특히 늙은잎은 어떠한 배지 조건에서도 캘러스 형성이 되지 않았다. 그리고 식물생장조정제인 2,4-D, picloram, dicamba 및 특히 벼에서 embryogenic callus 형성에 영향을 미치는 casein hydrolysate 와 proline이 함유된 배지 (Chen et al. 1985)에서는 1 mg/L 2,4-D가 함유된 배지에서 가장 높은 23.8%의 캘러스 형성률을 나타내었다. Chae와 Yu (1984)는 잎절편체를 2 mg/L NAA와 1 mg/L kinetin이 함유한 배지가 가장 양호하게 캘러스 형성이 된다고 보고하고 있어서, 본 실험에 사용된 식물생장조정제 중 2,4-D가 가장 양호

Table 1. Effect of medium on callus induction in leaf explants of *stevia*

Explants of leaf age	2,4-D (mg/L)	Picloram (mg/L)	Dicamba (mg/L)	No. of inoculated leaf segment	No. of induced callus	Rate of induced callus (%)
Young	0	0	0	80	0	0
	1	0	0	80	18	23.8
	2	0	0	80	3	3.8
	1*	0	0	80	0	0
	0	1	0	80	9	11.3
	0	2	0	80	4	5.0
	0	0	1	80	0	0
	0	0	2	80	0	0
	0	0	0	80	0	0
	1	0	0	80	4	5.0
Medium	2	0	0	80	0	0
	1*	0	0	80	0	0
	0	1	0	80	9	11.3
	0	2	0	80	0	0
	0	0	1	80	0	0
	0	0	2	80	2	2.5
	0	0	0	80	0	0
	1	0	0	80	0	0
	2	0	0	80	0	0
	1*	0	0	80	0	0
Old	0	1	0	80	0	0
	0	2	0	80	0	0
	0	0	1	80	0	0
	0	0	2	80	0	0
	0	0	0	80	0	0
	0	0	0	80	0	0

* added 300 mg/L casein hydrolysate and 10 mM proline.

한 캘러스 형성을 나타낸 것과 비교하여 stevia의 조직 절편체는 auxin류의 식물생장조정제만 배지 내에 첨가하여도 캘러스가 형성됨을 알 수 있었다.

2,4-D 농도에 따른 stevia 종자의 캘러스 형성률 (Table 2)은 1 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS배지에서 17%의 캘러스가 형성이 되었다. 캘러스 형성은 종자를 치상한 후 약 7일 정도 종자의 배부분에서 처음으로 유기 되며 (Figure 1A), 배양 30일 정도가 되면 유기된 캘러스 내에서 캘러스의 색깔이 희고 불투명한 배발생캘러스 (Figure 1B: embryogenic callus)와 황갈색을 띤 비배발생캘러스가 혼재되어 형성됨을 확인할 수 있었다 (Figure 1B: non-embryogenic callus).

Stevia 절편체 종류에 따른 캘러스 형성률 (Table 3)은 하배축과 상배축보다 종자에서 19% 정도로 높게 나타났다. Chae와 Yu (1984) 및 Yu와 Chae (1984)는 배양 절편체를 잎을 사용하였으나, 잎의 조직절편체는 재료의 안정적인 공급이 힘들어 지속적인 연구를 수행할 수가 없는 단점이 있으나, 본 실험에서는 종자에서부터 캘러스를 형성시켜 재료의 안정적인 공급을 받을 수 있다는 장점이 있다고 사료된다.

종자로부터 형성된 stevia 캘러스를 식물체재분화배지에 이식한 후 식물체재분화율 (Table 4)은 3 mg/L kinetin과 1 mg/L NAA가 첨가된 MS배지에서 38%의 식물체재분화율을 나타내었다. Chae와 Yu (1984)는 NAA 농도를 0.01에서 0.1 mg/L와 kinetin 농도는 0.5에서 10 mg/L까지 각각 혼용하여 실험한바, 식물체 형성보다는 뿌리의 생성이 89%로 높게 나타났으며, 지상부 생성은 10% 내외로 저조하였다. 본 실험에서는 식물체재분화가 38%로 높게 나타나 식물체재분화 조건을 향

상시킬 수 있었을 뿐만 아니라, 유식물체 (Figure 1C) 유도에도 효과적이었다. Stevia 캘러스를 5 mg/L kinetin과 1 mg/L NAA가 첨가된 MS배지에 이식한 후 7일 후 16%의 녹색점이 형성되었다가 이들이 모두 유식물로 발달되는 것이 약간 저조한 경향을 나타내었다. Figure 1D는 캘러스를 식물체재분화배지에 이식한 후 약 40일이 경과한 후 캘러스로부터 유식물체가 발달되는 모양이며, Figure 1E는 유식물체를 MS 배지 20 mL을 넣은 배양병에 이식하여 뿌리 형성을 하고 있는 양상이며, Figure 1F는 vermiculite에 이식하여 온실에서 식물체가 건전하게 자라고 있는 모양이다.

적 요

본 연구는 stevia의 조직절편체의 종류 및 식물호르몬 첨가가 캘러스 형성률과 식물체재분화 효율에 미치는 영향을 조사하고, 조직배양 기법을 이용한 stevia의 품종개량의 기초자료를 얻고자 실험을 수행하여 아래와 같은 결과를 얻었다. Stevia 절편체의 연령과 배지종류에 따른 캘러스 형성률은 어린잎을 배양재료로 하여 1 mg/L 2,4-D를 넣은 배지에서 23.8%로 가장 높았다. 2,4-D 농도에 따른 stevia 종자의 캘러스 형성률은 1 mg/L 2,4-D를 넣은 배지에서 캘러스 형성이 이루어졌으며, stevia의 절편체 종류에 따른 캘러스 형성률에 있어서도 발아된 유식물의 하배축과 상배축보다 발아전 종자 상태가 비교적 캘러스 형성률이 좋았다. 종자로부터 형성된 배발생 캘러스를 갖는 stevia 캘러스를 식물체 재분화 배지에

Table 2. Effect of 2,4-D on callus induction in the culture of stevia seeds

2,4-D (mg/L)	No. of inoculated seed	No. of induced callus	Rate of induced callus (%)
0	100	0	0
1	100	17	17
2	100	4	4

Table 3. Effect of explants on callus induction in stevia

Explants	No. of inoculated explants	No. of induced callus	Rate of induced callus (%)
Seed	100	19	19
Hypocotyl	100	5	5
Cotyledone	100	3	3

Table 4. Effect of kinetin on plant regeneration in the culture of stevia seeds

NAA (mg/L)	Kinetin (mg/L)	No. of inoculated callus	No. of green spot (%)	No. of plant (%)
1	3	100	38 (38)	38 (38)
1	5	100	16 (16)	13 (13)

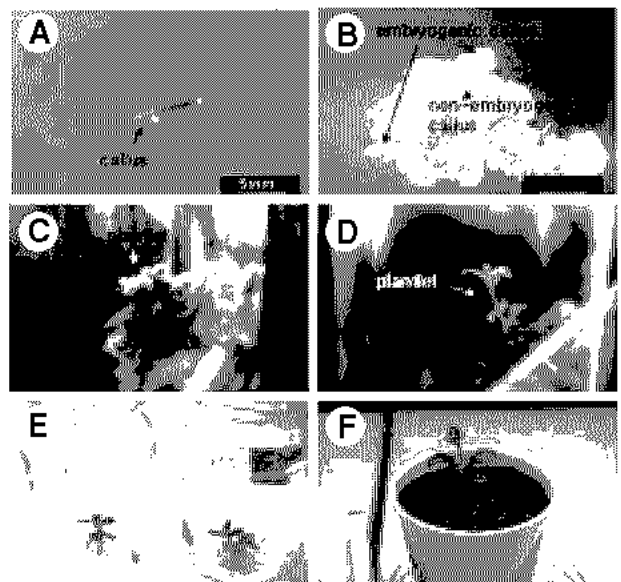


Figure 1. Plant development from seed-derived callus of stevia. A: Calli formed from seeds after 7 days of culture. B: Calli formed from four-week-old seed. C: Plantlet from embryogenic callus. D: Plantlet from callus after 40 days of culture. E: Rooting of plantlet in culture-bottle. F: Plant transferred onto pot in greenhouse.

이식한 후 식물체 재분화 효율을 조사한바, 1 mg/L NAA와 3 mg/L kinetin이 함유된 배지에서 식물체 재분화 효율이 좋았다.

인용문헌

- Bakal AI, Nabors LO (1990) Stevioside. In: Nabors LO, Gelardi RC (eds.), Alternative sweeteners, Ed2. Marcel Dekker, New York, pp 295
- Brown C, Brooks FJ, Pearson D, Mathias RJ (1989) Control of embryogenesis and organogenesis in immature wheat embryo callus using increased medium osmolarity and abscisic acid. *J Plant Physiol* 133: 727-733
- Chae YA, Yu CY (1984) Plant regeneration from leaf explants in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Korean J Plant Tiss Cult* 11: 55-5
- Chen TH, Lam L, Chen SC (1985) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured young inflorescences of *Oryza sativa* L. (rice). *Plant Cell Tiss Org Cult* 4: 51-54
- Franta R, Beck B (1986) Alternatives to cane and beet sugars. *Food Technol* 40: 116
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Pareddy DR, Petolino JF (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences of several elite inbreds of maize. *Plant Sci* 67: 211-219
- Park DC, Lee YH (1997) Production, transglycosylation and application of stevioside. *Stevioside. Food Industry and Nutrition* 2: 31-44
- Swedlund B, Vasil IK (1985) Cytogenetic characterization of embryogenic callus and regenerated plants of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. *Theor Appl Genet* 69: 575-581
- Thomas MR, Scott KJ (1985) Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus initiated from immature embryos and immature inflorescences of *Hordeum vulgare*. *J Plant Physiol* 121: 159-169
- Vasil V, Vasil IK (1984) Induction and maintenance of embryogenic callus cultures of Gramineae. In: Vasil IK (ed), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Vol 1, Academic Press, Orlando, Florida. pp 36-42
- Yu CY, Chae YA (1984) In vitro propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Korean J Crop Sci* 29: 102-107

(접수일자 2003년 2월 11일, 수리일자 2003년 4월 11일)