

돌나물 엽절편으로부터 캘러스 형성 및 식물체 분화에 미치는 생장조절물질의 영향

안정호, 이승엽*

원광대학교 식물자원과학부 생명자원과학연구소

Effects of Growth Regulators on Callus Induction and Plant Regeneration from Leaf Explants of *Sedum sarmentosum*

Jeong Ho Ahn, Seung Yeob Lee*

Institute of Life Science and Natural Resources, Division of Plant Resources Science,
Wonkwang University, Iksan, 570-749 Korea

ABSTRACT To establish the system of *in vitro* plant regeneration, the leaf segments of *Sedum sarmentosum* were cultured on MS media supplemented with different levels of 2,4-D, NAA and BA. The callus induction and growth showed a good response on MS medium supplemented with 3.0 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L BA, but a few callus induced on medium containing NAA and BA. In plant regeneration, combination of BA and NAA promoted shoot organogenesis from callus, and the highest frequency was obtained on MS medium supplemented with 0.2 mg/L NAA and 3.0 mg/L BA. When calli were transferred to the plant regeneration medium containing 0.2 mg/L NAA and 3.0 mg/L BA, healthy shoots without hyperhydricity were continuously induced (17.2 plantlets per callus) after 50 days of culture. When regenerated plantlets were transferred onto hormone-free MS medium, rooting was easily achieved from all of them.

Key words: Callus, growth regulator, plant regeneration, *Sedum sarmentosum*

서 론

돌나물 (*Sedum sarmentosum* BUNGE.)은 돌나물과에 속하는 다년생 식물로 토질을 가리지 않고 잘 자라는 자생식물이다. 돌나물과의 *Sedum*속에는 애기기린초 (*S. middendorffianum*), 태백기린초 (*S. lativalifolium*), 평의비름 (*S. drythrostichum* MIQ.), 땅채송화 (*S. oryzifolium*), 둥근잎평의비름 (*S. rotundifolium*), 세잎돌나물 (*S. sieboldii*) 등이 있는데 (Kwon and Jeong 1999), 주로 관상용으로 이용되고 있으며, 돌나물만이 식용으로 이용되고 있다. 우리 나라에서는 오래 전

부터 봄철에 새로 나온 싹을 신선채소로서 곁절이 무침이나 물김치 등으로 주로 이용하여 왔다. 또한 한방에서는 석상채 (石上採), 수분초 (垂盆草), 불갑초 (佛甲草), 석연화 (石蓮花) 등으로 불리는데, 청열소종의 효능이 있어 인후염과 만성간염의 치료에 이용되며, 해독작용도 뛰어나 독충이나 해충에 물렸을 때 환부에 붙이기도 한다. 돌나물의 꽃과 잎은 모두 관상 가치가 높는데, 줄기의 마디를 따라 3장의 잎이 윤생하며, 5~6월경에 별 모양의 꽃이 피고, 자방, 꽃잎, 꽃받침의 수가 일치한다.

식물의 조직배양은 우량종묘 및 유용물질 생산, 형질전환을 통한 저항성 유전자 도입 등의 목적으로 널리 이용되고 있다 (Choi et al. 2002; Kim et al. 2002; Seo et al. 2002). 조직배양 효율은 식물종에 따라 큰 차이를 보이며, 동일종에서도 품종 및

*Corresponding author Tel 063-850-6665 Fax 063-850-7308
E-mail: sylee@wonkwang.ac.kr

배양조직에 따라 성장조절물질의 요구도가 다른데, 이는 배양 식물체내의 내생호르몬 양과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다 (Lisowska and Wysokinska 2000; Koroch et al. 2002). 대부분의 식물에서 배양부위에 따라 옥신과 사이토키닌 등의 성장조절물질에 특이하게 반응하기 때문에 배지내 적정 성장조절물질의 종류와 농도를 결정하는 일은 매우 중요한데, 돌나물은 엽육이 두꺼운 다즙성 식물로 배양조직에 따라 성장조절물질의 요구도가 다를 것으로 보이지만, 아직까지 기내배양에 관한 연구는 전혀 없으며, *Sedum*속 식물에서도 꺾임의 잎과 줄기 절편으로부터 식물체의 재분화에 관련된 연구 외에는 거의 없는 실정이다 (Yoon 1997).

따라서 본 연구는 돌나물의 기내 식물체 재분화 체계를 확립하기 위하여, 캘러스 형성과 식물체 분화에 미치는 성장조절물질의 종류 및 농도의 영향을 조사하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

재료준비 및 캘러스 유도

치상 재료의 준비는 충남 금산군 금산읍 상리에서 수집한 금산 지역종의 신초를 채취하여, 70% 에틸알콜에 10초간 표면살균 후 0.5% sodium hypochlorite로 20분간 살균하여 멸균수로 4회 수세하였다. 멸균된 여지로 신초 표면의 수분을 제거한 다음, 성장조절제를 첨가하지 않은 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)에 마디를 1개씩 잘라서 기내증식하였다 (Figure 3A). 기내에서 새로 발생한 5 cm 크기의 신초로부터 잎을 2×5 mm 크기로 잘라 샤레당 20절편씩 5반복 치상하였다. 캘러스 유기배지는 MS 배지에 1.0, 2.0, 3.0 mg/L의 2, 4-D와 NAA를 각각 0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L의 BA와 조합한 12종의 배지를 이용하였다. 배지의 pH는 5.8로 조절하여, 4 g/L Gelrite를 첨가한 다음, 121°C, 1.2 kg/cm²에서 15분간 고압멸균하여 샤레당 20 mL씩 분주하여 사용하였다. 배양조건은 25±2°C에서 암배양하여, 50일 후 캘러스 형성율, 캘러스 생체중 및 건물중을 5반복 조사하였다. 건물중은 70°C 건조기에서 3일간 건조 후 평량하였다.

식물체 분화

캘러스로부터 식물체 분화에 미치는 성장조절물질의 종류 및 농도를 구명하기 위하여, 0, 0.2, 0.5, 1.0 mg/L NAA와 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/L BA를 조합한 20종의 배지를 조제하여, 잎절편 유래의 캘러스를 샤레당 10개씩 5반복 배양하였다. 배양조건은 25±2°C에서 27 μmol · m⁻² · sec⁻¹ (18/6 h, day/night)로 조절된 배양실에서 명배양하였다. 배양 30일 후부터 60일까지 10일 간격으로 분화된 shoot수를 조사하였다. 재분화된 식물체는 성장조절제를 첨가하지 않은 MS 기본배지에 옮겨

30일 동안 성장 및 발근을 유도한 다음, 발근된 소식물체를 버미큐라이트와 펄라이트를 1:1로 혼합한 상토를 채운 소형 포트에 이식하였다.

결과 및 고찰

캘러스 형성에 미치는 성장조절물질의 영향

돌나물의 캘러스 형성에 미치는 성장조절물질의 영향을 구명하기 위하여, 금산 지역종의 잎절편을 2, 4-D와 NAA를 BA와 혼합조제한 MS배지에 치상하여 캘러스 형성양상을 조사한 결과, 치상된 잎 절편체는 배양 1주 후부터 비대해지기 시작하였으며, 20일경에는 육안으로 캘러스 형성을 관찰 할 수 있었다. 2, 4-D와 NAA 단독 첨가배지에서는 캘러스 형성이 저조하였으며, 2, 4-D와 BA 혼합배지가 캘러스 형성에 효과적이었다 (Figure 1). 특히 3.0 mg/L 2, 4-D와 0.5~2.0 mg/L BA 첨가 배지에서 양호하였으며, 3.0 mg/L 2, 4-D와 1.0 mg/L BA 첨가 배지에서 가장 높은 캘러스 형성율을 보였다. 그러나 NAA와 BA 혼합첨가 배지에서의 캘러스 형성율은 아주 낮게 나타나 2.0~3.0 mg/L NAA와 1.0~2.0 mg/L BA 혼합첨가 배지에서만 약간의 캘러스가 형성되었다.

또한 캘러스 형성이 양호한 2, 4-D와 BA 혼합 첨가배지에서의 캘러스 성장을 비교하기 위하여 캘러스의 생체중과 건물중을 비교조사한 결과, 2, 4-D 단독처리에서는 캘러스 생장이 저조하였으며, 3.0 mg/L 2, 4-D와 0.5~2.0 mg/L BA 첨가

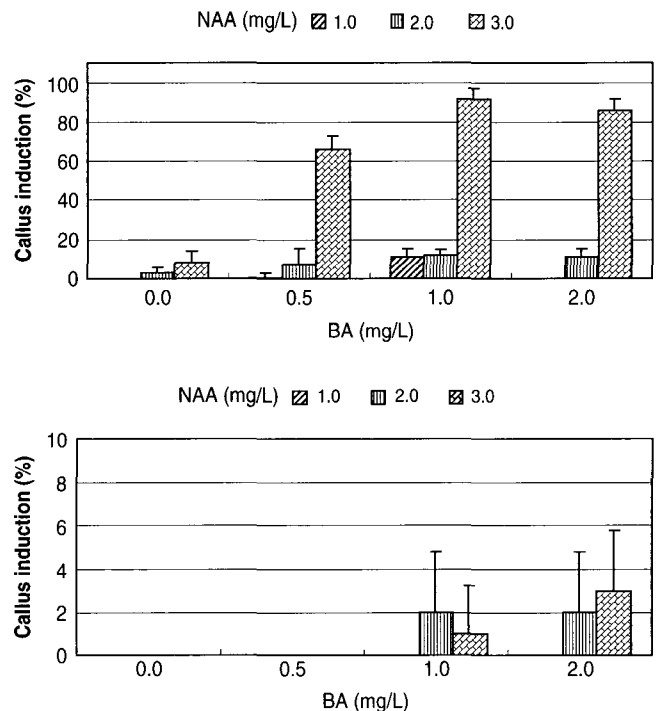


Figure 1. Effect of growth regulators on callus induction from leaf explants of *Sedum sarmentosum*.

배지에서 양호한 캘러스 성장을 보였다 (Table 1).

본 실험에서 돌나물의 캘러스 생장은 auxin과 cytokinin의 혼합비가 중요한 것으로 나타났는데, 2, 4-D 농도가 1.0 mg/L 일 경우 0.5 mg/L BA 첨가배지에서, 2, 4-D 농도가 2.0 mg/L 일 경우 1.0 mg/L BA 첨가배지에서, 그리고 2, 4-D 농도가 3.0 mg/L 일 경우 1.0~2.0 mg/L BA 첨가배지에서 높은 생체중 및 건물중을 보이는 것으로 보아, 대체로 2, 4-D와 BA의 혼합비율이 2 : 1일때 캘러스 생장이 양호한 경향을 보였다 (Table 1, Figure 3B). 이러한 결과는 다음의 연구결과와도 일치하는 것으로 할미꽃에서 auxin 또는 PVP와 cytokinin의 비율이 2 : 1 일 때 현저한 캘러스 증가를 보였으며 (Yoon 1996), 돌나물과 같은 *Sedum*속 식물인 평의비름에서도 엽절편으로부터 캘러스 형성은 2.0 mg/L 2, 4-D와 1.0 mg/L BA 혼합배지에서 100%의 캘러스 형성율을 보였고 (Yoon 1997), 바위솔의 줄기 배양에서도 4.0 mg/L 2, 4-D와 2.0 mg/L BA의 혼합첨가 배지에서 캘러스 형성이 가장 효과적이라고 하였다 (Choi et al. 1994). 또한 Lee 등 (2002)은 털머위의 캘러스 형성에서 auxin이 첨가되지 않은 배지에서는 캘러스가 형성되지 않았고, 2, 4-D와 BA 혼합첨가 배지에서는 캘러스 형성과 생장이 양호하였으나, NAA와 BA 혼합 첨가배지에서는 캘러스 형성이 관찰되지 않았고, 절단부위에 비대 현상만 나타났다고 하여, 본 실험 결과와 같은 경향을 보였다. 이와 같이 배지에 첨가하는 식물생장조절제의 종류와 농도에 따라 캘러스 형성 양상이 크게 다른 데 (Ryu et al. 1992), 캘러스 유기 및 성장에는 세포의 성장과 분열을 촉진하는 auxin의 첨가가 필수적이며, cytokinin을 함께 첨가하였을 때 상승적 촉진 작용을 한다 (Devlin 1975; Skoog et al. 1965).

Table 1. Effect of growth regulators on the callus growth derived from leaf and stem of *Sedum sarmentosum*.

Growth regulator (mg/L) ^y		Callus Growth (mg/10 calli) ^x	
2, 4-D	BA	Fresh wt	Dry wt
1.0	0.0	20.8d	3.6f
	0.5	98.4c	8.3ab
	1.0	97.2c	8.3abc
	2.0	42.4d	4.8def
2.0	0.0	27.2d	4.3ef
	0.5	100.8bc	8.4cde
	1.0	110.8abc	9.6bc
	2.0	104.8abc	9.2bcd
3.0	0.0	28.0d	4.4df
	0.5	112.4abc	11.2ab
	1.0	128.4a	13.2a
	2.0	124.4ab	11.6ab

^yGrowth regulators were supplemented to MS basal medium.
^xData were investigated after 50 days of culture. Data followed by the same letter in each column were not significantly different at the 0.05 probability level based on Duncan's multiple range test.

식물체 분화에 미치는 생장조절물질의 영향

캘러스로부터 식물체 분화에 미치는 생장조절물질의 종류 및 농도를 구명하기 위하여, 돌나물의 엽절편 유래 캘러스를 NAA와 BA를 첨가한 배지에 옮겨 식물체 분화양상을 조사한 결과, NAA 단독첨가 배지에서는 전혀 식물체 분화가 이루어지지 않았고, BA 단독첨가 배지에서는 1.0 mg/L에서 비교적 양호하였으나, BA 단독첨가 배지보다는 NAA와 BA 혼합 첨가배지에서 고농도의 식물체가 분화되었다 (Table 2). 가장 높은 식물체 분화율을 보인 것은 0.5 mg/L NAA와 4.0 mg/L BA 첨가배지였다, 캘러스 당 식물체수는 0.2 mg/L NAA와 3.0 mg/L BA 에서 가장 양호하였고, 기형의 신초나 잎비대 현상도 거의 없어 돌나물의 캘러스로부터 식물체 분화배지로 가장 적합하였다 (Figure 3C). 이와 같이 캘러스로부터 식물체 분화에는 지황 (Rha and Kim 1996)에서와 같이 BA 단독 처리가 신초 분화에 효과적인 경우도 있지만, 대부분의 경우 NAA와 BA 혼합배지에서 식물체 분화가 양호한 결과를 얻었는데, 바위솔의 줄기배양에서는 0.5 mg/L NAA와 2.0 mg/L BA를 혼합첨가한 배지에서 shoot 재분화가 가장 좋으며 (Choi et al. 1994), 평의비름 엽절편 캘러스에서는 2.0 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 혼합첨가 배지에서 부정아의 분화가 가장 양호하다 (Yoon 1997). 식물종에 따라서는 고농도의 cytokinin이 요구되

Table 2. Effects of NAA and BA on plant regeneration of callus derived from leaf explant of *Sedum sarmentosum*.

Growth regulator (mg/L) ^z		Regenerated callus (%)	No. of plantlet/callus
NAA	BA		
0.0	0.0	0.0f	0.0e
	1.0	92.0abc	8.2ab
	2.0	90.0a-d	6.4a-d
	3.0	72.5cde	6.0a-d
0.2	4.0	97.5ab	5.8bcd
	0.0	0.0f	0.0e
	1.0	75.bcd0	5.5bcd
	2.0	70.0cde	6.3a-d
0.5	3.0	90.0a-d	9.2a
	4.0	92.0abc	8.9ab
	0.0	0.0f	0.0e
	1.0	70.0cde	3.7cd
1.0	2.0	90.0a-d	5.6bcd
	3.0	87.5a-d	6.9abc
	4.0	100.0a	6.9abc
	0.0	0.0f	0.0e
1.0	1.0	48.0e	3.0de
	2.0	97.5ab	5.5bcd
	3.0	66.0de	3.0cd
	4.0	82.0a-d	4.5de

^zGrowth regulators were supplemented to MS basal medium; a total of 50 calluses was transferred with 5 replications. Data were investigated after 30 days of culture. Significant differences among treatments ($\alpha=0.05$) are indicated with different letters by DMRT.

기도 하는데, 갯기름나물의 잎과 엽병 배양에서 2.5 mg/L NAA와 10.0 mg/L BA 첨가배지에서 식물체 분화율이 가장 높다 (Kim et al. 2001).

한편 15 μ M AgNO₃와 250 mg/L Glutamine을 첨가한 MS 기본배지에 0.2 mg/L NAA와 3.0 mg/L BA를 조합한 분화배지로 잎절편 유래 캘러스를 육긴 후 30~60일까지 10일 간격으로 캘러스당 식물체수를 조사한 결과, 60일까지도 식물체수는 계속 증가하지만 BA의 농도가 높기 때문에 분화된 신초의 길이 비대해져 기형식물체가 증가하였다 (Figure 2). 따라

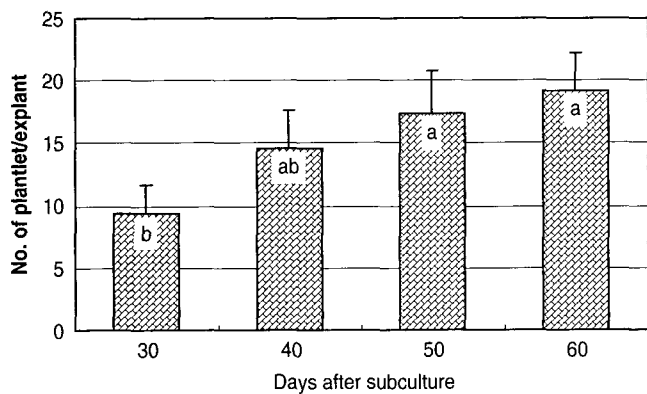


Figure 2. Regeneration of plantlets from leaf callus of *Sedum samentosum*. Significant differences among treatments ($\alpha=0.05$) are indicated with different letters by DMRT. Medium was used MS supplemented with 0.2 mg/L NAA, 3 mg/L BA, 15 μ M AgNO₃ and 250 mg/L glutamine.

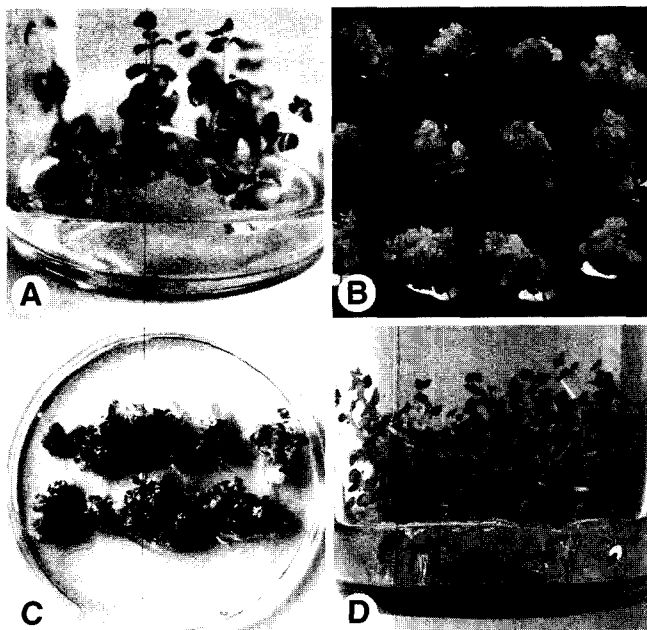


Figure 3. Callus induction and plant regeneration from leaf explant of *Sedum samentosum*.

- A. Culture materials derived from *in vitro* node culture.
- B. Callus derived from leaf segments.
- C. Plantlets regenerated from callus.
- D. Young plants grown in hormone-free MS medium.

서 엽록소 황화현상 및 기형 식물체가 발생하기 전 계대배양 적기는 캘러스를 육긴 후 40~50일경에 성장조절제를 첨가하지 않은 MS 기본배지로 분화된 식물체를 계대배양하는 것이 발근 및 신초생장이 양호하여, 건전 식물체를 다수 획득할 수 있었다 (Figure 3D). 분화된 식물체는 버미큐라이트와 펠라이트를 1:1로 혼합한 상토를 넣은 소형 포트에 이식후 순화재 배한 결과, 95% 이상의 생존율을 보였다.

적 요

돌나물 (*Sedum samentosum*)의 기내 식물체 재분화 체계를 확립하기 위하여, 성장조절물질을 다르게 조합한 MS 배지에 잎절편을 치상한 후, 캘러스 유기 및 식물체 분화에 미치는 성장조절물질의 영향을 조사하였다. 캘러스 유기는 3.0 mg/L 2, 4-D와 1.0 mg/L BA 첨가 배지에서 가장 높은 캘러스 유기를 보였으나, NAA와 BA 혼합첨가 배지에서는 캘러스 형성율이 0~3% 이하로 극히 낮았다. 식물체 분화는 NAA 단독첨가 배지에서는 전혀 분화되지 않았으며, 0.2 mg/L NAA와 3.0 mg/L BA 첨가배지에서 가장 양호하였다. 캘러스를 식물체 분화배지에 계대배양 후 50일까지는 신초수 증가와 함께 (17.2 개/캘러스), 식물체의 기형이나 잎비대 현상도 적어 식물체 분화배지로 가장 적합하였다. 분화 식물체는 성장조절물질을 첨가하지 않은 MS 기본배지로 계대배양하였을 때 발근 및 생육이 양호하였다.

사사 - 본 연구는 2002년도 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Choi HK, Son JS, Na GH, Hong SS, Park YS, Song JY (2002) Mass production of paclitaxel by plant cell culture. *Kor J Plant Biotech* 29: 59-62
- Choi SU, Nam SH, Yang GJ, Cho MJ, Yang MS (1994) Plant regeneration from the stem tissue of *Orostachys japonicus* A. Berger. *Kor J Plant Biotech* 21: 65-68
- Devlin RM (1975) Plant growth hormones, In: *Plant physiology* (3rd), (ed) D. Van Nostrand Company, New York, pp. 411-517
- Kim OT, Kim KS, Ahn JC, Hwang B (2001) Plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis from *Peucedanum japonicum* Thunb. *Kor J Plant Biotech* 28: 21-24
- Kim OT, Kim MY, Park YJ, Hong MH, Ahn JC, Oh MH, Hwang B (2002) Production of triterpene glycosides from whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Kor J Plant Biotech* 29: 282-285
- Koroch A, Juliani HR, Kapteyn J, Simon JE (2002) *In vitro*

- regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants. *Plant Cell Tiss Org Cult* 69: 79-83
- Kwon ST, Jeong JH (1999) Genetic relationship among *Sedum* species based on morphological characteristics and RAPD analysis. *Kor J Hort Sci Tech* 17: 490-494
- Lee SY, Yoo SO, Bae JH, Lee JH (2002) Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration of *Farfugium japonica*. *Kor J Plant Biotech* 29: 45-49
- Lisowska K, Wysokinska H (2000) *In vitro* propagation of *Catalpa ovata* G. Don. *Plant Cell Tiss Org Cult* 60: 171-176
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Rha ES, Kim JL (1996) Plant regeneration in leaf explant cultures of *Reitmannia glutinosa* Liboschuitz. *Kor J Plant Biotech* 23: 299-302
- Ryu JH, Doo HS, Kwon TH (1992) Induction of haploid plants by anther culture in sesame (*Sesamum indicum* L.) I. Effects of growth regulators and difference between genotypes on callus induction. *Kor J Plant Biotech* 19: 171-177
- Seo MS, Bae CH, Choi DO, Rhim SL, Seo SC, Song PS, Lee HY (2002) Investigation of transformation efficiency of rice using *Agrobacterium tumefaciens* and high transformation of GPAT (glycerol-3-phosphate acyltransferase) gene relative to chilling tolerance. *Kor J Plant Biotech* 29: 85-92
- Skoog F, Strong FM, Miller CO (1965) Cytokinins. *Science* 148: 532-533
- Yoon ES (1996) Effect of polyvinylpyrrolidone on callus growth and plant regeneration of *Pulsatilla Koreana*. *Kor J Plant Tiss Cult* 23: 349-354
- Yoon ES (1997) Effect of plant growth regulators on plant regeneration from leaf and stem explant culture of *Sedum erythrostichum* Miq. *Kor J Plant Biotech* 24: 285-289

(접수일자 2003년 11월 29일, 수리일자 2004년 2월 6일)