

## 홍경천 (*Rhodiola sachalinesis*)의 엽육 절편으로부터 식물체 분화에 미치는 성장조절제의 영향

배기화, 유지애, 윤의수\*

공주대학교 생명과학과

### Effect of Growth Regulators of Plant Regeneration from *Rhodiola sachalinesis* leaf segments

Ki-Hwa Bae, Ji-Ae Yoo and Eui-Soo Yoon\*

Department of Biological Science, Kongju National University, Gongju, 314-701 Korea

#### ABSTRACT

*Rhodiola sachalinensis* has been used as a traditional medicine in Asia. We were germination in vitro seedling of grow naturally in Chang bai Moutain. And callus induction from leaf segments, treated plant regeneration in plant growth regulators (Auxins and cytokinins). We investigated optimal conditions for efficient plant regeneration through callus induction and shoots formation on medium with various kinds of growth regulators. Callus induction and adventitious shoots formation was achieved when cytokinin and auxin combined to this experiment. Especially, there was the highest callus induction rates when we were used to 1 mg/L kinetin and 2 mg/L NAA (98%). Adventitious shoots formation wear obtained difference rate when cytokinin alone 1 mg/L BA (96.6%). And regenerated plantlet was acclimatized and transplanted to the soil, showed 100% survival.

**Key words :** Growth regulators, Kinetin, *Rhodiola sachalinesis*, Soil transfer

#### 서언

홍경천 (*Rhodiola sachalinensis*)은 다년생 초본식물로써 육질이 있는 근경이 있으며, 분류상으로 피자식물문 (Angiospermae), 돌나물과 (Crassulaceae), 돌꽃 (*Rhodiola*)에 속한다. 돌꽃에 속하는 식물은 전 세계에 96종이 있는데 중국에 70종이 있으며, 유럽에는 24종과 2

가지의 변종이 있어서 중국에 자생하는 돌꽃은 전체의 70%가량 차지하고 있다. 홍경천은 온도가 낮고 건조하며 낮과 밤의 온도차이가 큰 해발 2,000~3,000 m의 악조건에서 생존할 수 있는 특수한 적응성을 가지고 있다 (Jiang, 1994). 형태학적 특징은 전초는 분백색이고, 밑부분은 갈색인편으로 덮인 것이 특징이다. 원줄기는 높이가 7~30 cm에 이르고 잎은 호생하며, 도란형

\*교신저자 : E-mail : yes@kongju.ac.kr

또는 타원형이다. 열매는 빨 모양으로 4~5개 열리며, 길이 6~7 mm로서 직립한다 (Bae, 2000; Lee, 1996).

홍경천은 인삼 (*Panax ginseng*), 가시오가피 (*Acanthopanax senticosus*) 이후에 발견된 보건의약용식물의 일종으로 원기를 회복시키고 질병과 체내독소축적을 극복하고 장수하게 할 수 있어 '고원인삼'이라는 별칭을 가지고 있다. 주요한 효능은 원기회복, 산소결핍증, 한랭, 주의력 증강, 사업효율증진, 노인병예방, 체력증진, 지력증강, 산업능력개선, 혈압정상회복, 기억력회복, 각종 신경과민증, 관상동맥질환, 당뇨병, 각혈, 해혈, 폐렴, 부녀백대, 타박상, 화상 등에 유효하다고 알려져 있다 (Ming, 1988; Petkov *et al.*, 1986). 이러한 작용을 보이는 주요 생리활성 성분은 salidroside와 p-trycol로 현재까지 조사되고 있으며 (Linch *et al.*, 2000), 이외에 전분, 단백질, 지방, 탄닌, 플라본류 화합물과 미량의 휘발성 물질, 이스파라긴산, 트레오닌, 글루타민산, 글리신 등 20여종의 아미노산이 함유되어 있다. 또한 salidroside는 중추신경의 억제작용, 강심작용, 아드레날린으로 인한 혈당 농임을 억제하는 작용도 알려져 있다 (Lee *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 1991).

식물의 조직배양은 우량종묘 육종 및 유용물질의 분리와 정제, 외래의 유용한 유전자를 도입하는 등의 목적으로 이용되고 있다 (Choi *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Seo *et al.*, 2002). 조직배양의 효율은 대상식물에 따라 큰 차이를 보이며, 동일종에서도 배양조직에 따라 성장조절제의 요구도가 다르다. 이는 대상 식물체의 내생 호르몬과 관계가 있는 것으로 알려져 있다 (Liowska and Wysokinska, 2000; Koroch *et al.*, 2002). 또한, 대상식물의 배양부위에 따라서 외부에서 공급하는 성장조절물질에 다양하게 반응하기 때문에 배지내의 적정 성장조절물질의 종류와 농도를 결정하는 일이 매우 중요하지만, 염육이 두꺼운 다즙성 식물인 홍경천의 배양조직에 따라 성장조절물질의 요구도

홍경천 (*Rhodiola sachalinesis*)의 염육 절편으로부터 식물체 분화에 미치는 성장조절제의 영향

다를 것으로 보인다. 하지만 아직까지 홍경천의 기내배양에 관한 연구가 없으며, 같은 들나물과인 *Sedum*속 식물로 핑의 비름의 잎과 줄기 절편으로부터 식물체 재분화에 관련된 연구 (Yoon, 1997)와 들나물의 잎절편으로부터 식물체 재분화에 관한 연구밖에 없는 실정이다 (Ahn and Lee, 2004).

따라서 본 연구는 홍경천의 기내 재분화 체계를 확립하기 위하여 재분화에 미치는 성장조절물질의 종류와 농도의 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 배양조건

본 실험의 재료인 홍경천 (*R. sachalinensis*)은 2000년 백두산에서 종자를 채취하였다. 채취한 종자는 공주대학교 유리온실에서 파종하여 유지하였으며 본 실험에 사용된 잎은 가장 말단에 새로이 생겨나는 잎을 재료로 사용하였다. 식물재료의 멸균은 말단의 잎을 채취하여 70% EtOH에 15분간 침지 후 2~3회 멸균 증류수로 수세하고 1% NaOCl에 15분간 멸균하여 표면 살균하였다. 그리고 멸균 증류수로 4회 세척한 후 잎은 10분간 멸균된 필터페이퍼 (110mm Dia, Whatman, USA) 위에서 수분을 제거 하였다. 잎은 1×0.5 cm 정도로 3등분 횡절단하여 사용하였다. 배지는 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본배지에 3% sucrose와 3.5 g/L의 gerlite (Schweizerhall, South Plainfield, USA)를 첨가하고 성장 조절제는 BA (0, 1, 3, 5, 7) 또는 Kinetin (0, 1, 3, 5, 7) 또는 2-ip (0, 1, 3, 5, 7) 과 NAA (0.1, 1, 2, 4) mg/L 혼용처리하였다. 절편은 식물성장조절제의 처리에 따라 petri-dish (SPL, South Korea)당 10개씩, 총 30개씩 각각 치상하였고 25±3℃, 16시간 광주기, 1900 Lux 광도의 배양실에서 배양하였다. 실험에 사용한 모든 배지

와 기구는 121℃, 1.5기압으로 15분간 고온 고압 멸균하여 사용하였다.

### 캘러스 유도에 미치는 성장조절제의 영향

기본 배지는 MS기본배지에 30 g/L sucrose, 8 g/L의 agar를 첨가하였으며, pH는  $5.7 \pm 0.5$ 로 조정하였다. 성장조절제는 조식배양에서 많이 사용되는 옥신과 시토키닌을 사용하였다. 옥신으로는 NAA (Naphthaleneacetic acid)를 사용하였다. 시토키닌으로는 BA (6-benzylaminopurine), Kinetin (6-furfurylaminopurine)를 사용하였다. Auxin과 cytokinin의 조합은 1.0 mg/L BA, Kinetin와 0.1, 1.0, 2.0, 5.0 mg/L NAA를 각각 조합하여 사용하였다.

### 식물체 분화에 미치는 성장조절제의 영향

식물체 재분화에 미치는 성장조절제의 종류 및 농도를 구명하기 위하여 0.1, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L BA, Kinetin, 2-ip (N6-3-methylbut-2-enyladenine)를 단용한 16종의 배지를 제조하여 잎 절편 유래의 캘러스를 petri-dish 당 10개씩 3회 반복실험 하였다. 배양 4주후에 분화된 shoot의 수를 조사하였다. 분화된 식물체는 성장조절제를 첨가하지 않은 MS배지에 계대배양하여 shoot를 신장시켜서 20 × 20 cm 배양병 (Gaoze, Korea) 에서 증식시켰다.

### 토양 순화

계대 배양 90일 후 얻은 온전한 식물체 30개체를 멸균된 인공배양토 (perlite : 부토, 3 : 1, v/v)에 이식하였다. 인공 배양토를 증류수로 적당히 적신 후 유리병 (6 × 6 × 12 cm, 500 mL)에 담아 121℃, 1.2기압에서 15분간 멸균하였다. 이식 작업은 무균 상태에서 이루어졌으며 뿌리 부위를 멸균수로 3회 수세한 다음 인공 배양토에 옮겨 심었다. 배양 조건은 상기의 조건과 동일하게 수행하였으며, 인공 배양토에서 4

주간 순화를 거친 식물체를 3 mm채로 거른 마사토에 이식하여 생장시켰다.

## 결과 및 고찰

### 캘러스형성에 미치는 성장조절제의 영향

캘러스 형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 잎 절편을 BA, Kinetin을 NAA와 혼합 제조한 MS배지와 NAA를 단독으로 첨가한 MS배지에 치상하여 캘러스 분화양상을 조사한 결과, 치상된 잎 절편체는 배양 2주후 후부터 비대해지기 시작하였으며, 3주후에는 육안으로도 관찰할 수 있는 크기가 되었다 (Fig. 1A). NAA를 단독첨가한 배지에서는 다른 조합배지보다 캘러스형성이 저조하였으며, Kinetin 1 mg/L와 NAA 2.0 mg/L를 첨가한 배지에서 가장 높은 캘러스 형성률을 보였고 BA가 첨가된 배지에서는 auxin(NAA)단독배지보다 callus 형성률이 저조하였다. (Table 1). 본 실험에서 홍경천의 캘러스 생장은 옥신과 사이토키닌의 혼합비가 중요한 것으로 나타났는데, Kinetin 1 mg/L 과 NAA 2.0 mg/L를 첨가한 배지에서 높은 캘러스 성장률을 보였다. 이는 할미꽃에서 PVP와 사이토키닌의 비율이 2 : 1 일때 현저한 캘러스 증가를 보인 경우 (Yoon, 1996)와 비교적 일치하고, Sedium 속 식물인 평의 비름과도 일치하는 결과를 나타낸다 (Yoon, 1997). 이와 같이 배지에 첨가하는 성장조절제의 종류와 농도에 따라 캘러스 형성 양상이 크게 다른데 (Ryu *et al.*, 1992), 캘러스 유도 및 성장에는 세포의 성장과 분열을 촉진하는 옥신의 첨가가 필수적이며, 사이토키닌을 첨가했을 때는 분화를 촉진하는 작용을 한다고 보고되고 있고 본 실험에서도 위와 비슷한 결과를 얻을 수 있었다 (Devlin, 1975; Skoog *et al.*, 1965).

### 식물체 분화에 미치는 성장조절제의 영향

홍경천 (*Rhodiola sachalinesis*)의 엽육 절편으로부터  
식물체 분화에 미치는 성장조절제의 영향

캘러스로부터 식물체 분화에 미치는 성장조절제의 종류와 농도를 알아보기 위하여 잎 절편에서 유도된 캘러스를 0.1, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L BA, Kinetin, 2-ip가 단독으로 첨가된

MS 배지에 옮겨서 식물체 분화양상을 조사한 결과, 사이토키닌 단독첨가배지는 비교적 양호한 분화양상을 보이며, 특히 2 mg/L BA를 첨가한 배지에서는 30개의 절편중 29개의 절편에서

Table 1. Effect of growth regulators on callus induced from leaf segment after 2 weeks on solid medium

Growth regulators (mg/L)		Frequency of callus induction	
		Callus size (cm)	Induction of callus (%)
Control	0	0	
NAA	0.1	1.02 ± 0.62a	76
	1.0	1.21 ± 0.25	86
	2.0	1.32 ± 0.28	88
	4.0	2.07 ± 0.17	92
BA 1.0 NAA	0.1	1.23 ± 0.45	56
	1.0	1.24 ± 0.23	58
	2.0	1.56 ± 0.12	62
	4.0	2.01 ± 0.36	80
KIN. 1.0 NAA	0.1	1.65 ± 0.23	78
	1.0	1.65 ± 0.36	80
	2.0	3.27 ± 0.21	98
	4.0	2.36 ± 0.23	91

\*means standard error.

Table 2. Effect of growth regulators on shoot formation from leaf segments after 4 weeks on solid culture medium

Growth regulators (mg/L)		Frequency of shoots formation	
		No. of shoots	Induction of shoots(%)
Control	0	0	0
BA	0.1	26 ± 1.2a	86.6
	1.0	29 ± 2.3	96.6
	2.0	21 ± 1.6	70
	4.0	17 ± 1.3	56.6
Kinetin	0.1	21 ± 1.5	70
	1.0	27 ± 1.2	90
	2.0	16 ± 2.3	53.3
	4.0	18 ± 2.6	60
2-ip	0.1	21 ± 2.3	70
	1.0	27 ± 2.1	90
	2.0	23 ± 1.9	76.6
	4.0	20 ± 1.7	66.6

\*means standard error. amean standard error.

모두 shoot가 분화가 되었으며 (Fig. 1B), Kinetin, 2-ip를 첨가한 배지에서도 60%이상의 shoot 형성률을 보였다 (Table 2). 이렇게 shoot가 형성이 된후 홀몬이 첨가되지 않은 MS 배지에 계대를 하면 shoot의 신장과 발근이 일어남을 관찰 할 수 있었다(Fig. 1C). 이와 같이 캘러스로부터 식물체 분화에는 지황 (Rha and Kim, 1996)에서와 같이 BA단독처리가 효과가 있다는 결과와 일치하며, BA단독처리가 신초분화에 효과적인 경우도 있지만, 대부분의 경우 NAA와 BA혼합배지에서 양호한 결과를 얻었는데, 바위솔의 줄기배양에서는 0.5

mg/L NAA와 2.0 mg/L BA를 혼합 첨가한 배지에서 shoot 분화가 가장 좋았으며 (Choi *et al.*, 1994), 꿩의 비름 잎 절편 캘러스에서는 2.0 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA혼합첨가 배지에서 부정아의 분화가 가장 양호하다 (Yoon, 1997). 하지만 본 실험에서도 옥신 (NAA)을 혼용처리한 실험이 있었는데 이 실험에서는 10%도 안되는 분화율을 보였다. 이는 홍경천의 경우 내생옥신의 비율이 대체적으로 높다고 사료된다. 갯기름의 잎과 엽병 배양에서 2.5 mg/L NAA와 10.0 mg/L BA첨가배지에서 식물체 분화율이 가장 높았다 (Kim *et*

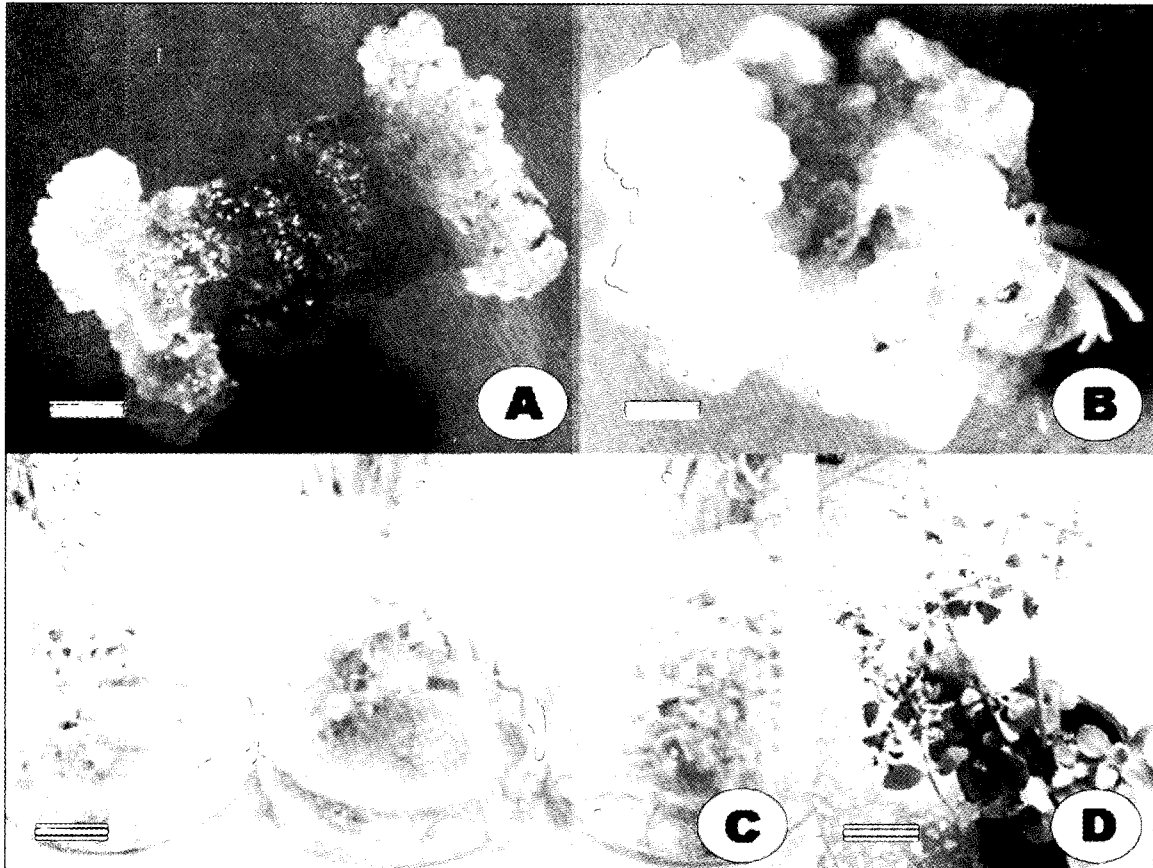


Fig. 1. Plant regenerated of *R. sachalinensis*.

A. Callus induction of leaf segments (Kinetin 1.0 mg/L+NAA 2.0 mg/L), bar=5 mm.

B. Adventitious shoot formation of callus (BA 2 mg/L), bar=5 mm.

C. Shoots induced from the excised primordia segment(C) cultured on MS medium for 4 weeks later (Bar= 5 cm).

D. Acclimatized *R. sachalinensis* plants in pot and flower formation from regenerated plant for 6 months later (Bar= 7 cm).

al., 2001). 옥신과 시토키닌의 비율이 형태형성에 영향을 미치는데 옥신이 상대적으로 높으면 부정근이 형성되고, 옥신이 상대적으로 적으면 부정아가 형성된다 (Warren, 1991). 그리고 옥신의 농도가 높으면 분열조직과 같은 세포의 형성을 촉진하지만 기관 성장을 억제하는 역할을 한다. 시토키닌은 뿌리형성을 억제하고 낮은 옥신 농도에서 형태형성은 촉진된다 (Pennazio, 1975). 그러나 본 실험에서는 시토키닌인 2-ip에서 부정근이 상대적으로 높게 나타났으며(데이터 미제시), 특이하게도 뿌리의 끝부분에 붉은색 색소가 침적되어 있는 것을 관찰 할 수 있었다.

### 토양순화

계대 배양 후 얻은 재분화체를 멸균된 인공 배양토에 이식하여 4주 후에 관찰하였다. 멸균된 인공 배양토에서 순화된 식물체는 3 mm 채로 거른 마사토로 비멸균 상태의 토양에 이식하여 배양실에서 성장시킨 결과 100%의 생존율을 나타냈다. 1차적으로 pot에 이식한 30개체의 재분화체를 온도와 습도가 일정하게 유지되는 온실에 이식한 결과 30개체 모두 생존하였으며, 약 4주 후에 모두 흰색의 꽃이 피는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1D).

### 적요

백두산에 자생하는 홍경천의 종자를 기내에서 발아시켜 잎 절편으로부터 캘러스를 유도 할 수 있었으며, 식물성장조절제의 처리로 기관분화도시킬 수 있었다. 토양순화는 약 8주후면 멸균되지 않은 토양에서도 홍경천의 뿌리활착이 활발함을 알 수 있었다. 캘러스의 유도율은 Kinetin 1 mg/L와 NAA 2 mg/L를 첨가한 배지에서 가장 높은 98%의 캘러스 형성률을 보였다. 캘러스에서 부정아의 유도는 BA가 1 mg/L 첨가된 MS배지에서 96.6%의 높은 부정아형성률을 보였으며 뿌리와 신초의 신장은 옥신은 첨가되지

않은 배지에서 다량으로 유도됨을 관찰할 수 있었다. 토양순화는 100% 성공적 이었다.

### 인용문헌

- Ahn, J.H. and S.Y. Lee. 2004. Effects of growth regulators on callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Sedum sarmentatum*. Kor J Plant Biotech 31:25-29.
- Bae, K.H. 2000. The medicinal plants of Korea. Kyohak Publishing Seoul, pp200.
- Choi, H.K., J.S. Son, G.H. Na, S.S. Hong, Y.S. Park and J.Y. Song. 2002. Massproduction of paclitaxel by plant cell culture. Kor. J. Plant Biotech 29:59-62.
- Choi, S.U., S.H. Nam, G.J. Yang, M.J. Cho and M.S. Yang. 1994. Plant regeneration from the stem tissue of *Orostachys japonicus* A. Berger. Kor J Plant Biotech 21:65-68.
- Devlin, R.M. 1975. Plant growth hormones, In: Plant physiology (3rd), (ed) D. Van Nortrand Company, New York, pp411-517.
- Jiang, M., W. Zhong and H. Han. 1994. Studies on producing effective medicinal ingredients of *Rhodiola sachalinensis* by tissue culture. Chin J Shen Univ 25:355-359.
- Kim, O.T., K.S. Kim, J.C. Ahn and B. Hwang. 2001. Plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis from *Peucedanum japonicum* Thub. Kor J Plant Biotech 28:21-24.
- Kim, O.T., M.Y. Kim, Y.J. Park, M.H. Hong, J.C. Ahn, M.H. Oh and B. Hwang. 2002. Production of triterpene glycosides from whole plant cultures of *Centella asiatica* L. Urban. Kor J Plant Biotech 29:282-285.
- Koroch, A., H.R. Juliani, J. Kapteyn and J.E. Simon. 2002. In vitro regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants. Plant Cell Tiss Org Cult 69:79-83.

- Lee, M.W., Y.H. Lee, H.M Park, S.H. Tosh, E.J. Lee, H.D. Jang and Y.H. Kim. 2000. Antioxidant phenolic compounds from the roots of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. Arch pharm Res 23:455-458.
- Lee, U.C. 1996. Standard illustrations of Korean Plant. Academy Publishing Seoul, pp144.
- Linch, P.T., Kim Y.H., Hong S.P., Jian J.J., Kang J.S. 2000. Quantitative determination of salidroside and tyrosol from the chromatography. Arch Pharm Res 23:349-352.
- Lisowska, K. and H. Wysokinska. 2000. *In vitro* propagation of *Catalpa ovata* G. Don. Plant Cell Tiss Org Cult 60:171-176.
- Ming, H.Q., G.C. Xia and R.D. Zhang. 1988. Advanced research on *Rhodiola*. Chin Trad Herbal Drugs 19:229-234.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-479.
- Pennazio, S. 1975. Effect of adenine and kinetin on development of camation tips cultured *in vitro*. J Hort Sci 50:161-164.
- Petkov, V.D., D. Yonko, A. Mosharoff, T. Kambourova, L. Alova, V. Petkov and I. Todorov. 1986. Effects of alcohol aqueous extract from *Rhodiola rose* L. root on learning and memory. Act Physiol Pharmacol Bulg 12:3-16.
- Rha, E.S. and Kim J.L. 1996. Plant regeneration in leaf explant cultures of *Rehmannia glutinosa* Lib. Kor J Plant Biotech 23:299-302.
- Ryu, J.H., H.S. Doo and T.H. Kwon. 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, M.S., C.H. Bae, D.O. Choi, S.L. Rhim, S.C. Seo, P.S. Song and H. Y. Lee. 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., F.M. Strong and C.O. Miller. 1965. Cytokinin. Science 148:532-533.
- Warren, G. 1991. The regeneration of plants from cultured cells and tissues. In: A. Stafford and G. Warren (eds.), Plant Cell and Tissue Culture Open University Press. Milton Keynes UK, pp82-100.
- Yoon, E.S. 1996. Effect of polyvinylpyrrolidone on callus growth and plant regeneration of *Pulsatilla koreana*. Kor J Plant Tiss Cult 23:349-354.
- Yoon, E.S. 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.
- Zhong, Y., K. Lowell, J.A. Ping, C.T. Che, J.M. Pezzuto and H.H. Fong. 1991. Phenolic constituents of *Rhodiola coccinea* a tibetan folk medicine. Planta Med 57:589.

(접수일 2005. 2. 15)

(수락일 2005. 6. 10)