

들깨의 자엽절편배양을 통한 고효율 식물체 재분화

김경민^{1*}, 이현숙²

¹상주대학교 생명자원과학대학 환경원예학과, ²경북대학교 식물생명공학부

High Frequency Plant Regeneration from the Cultures of Cotyledon Explants of Perilla (*Perilla frutescens* L.)

Kyung-Min Kim^{1*} and Hyeon-Suk Lee²

¹Department of Environmental Horticulture, College of Life Science and Natural Resources, Sangju National University, Sangju, Gyeongbuk 742-711, Korea

²Division of Plant Biosciences, Department of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University, Daegu, Korea

ABSTRACT A reliable and effective tissue culture system was established for *Perilla frutescens* (perilla) using different cultivar, explant source, and growth regulator composition in medium. MS medium supplemented with 2.0 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA was maximum at shoot induction. Cotyledon explants formed more shoots than hypocotyl explants. The frequency of plant regeneration through organogenesis was higher (22.8%) than that (6.1%) of somatic embryogenesis. Five genotypes of perilla were screened for the feasibility of shoot regeneration, cotyledon explant of 'Manbaek' showed the highest shoot induction at a frequency of 27.3% among the tested cultivars.

서 론

꿀풀과 (*Labiatae*) 속하는 *Perilla frutescens*는 1년생 초본 식물로 인도, 중국, 일본, 한국 등지에서 유료작물로 재배되어 왔다 (Nitta et al. 2003). *Perilla* 속에는 4종에 1변종이 있으며 (Ito et al. 1996), 재배종은 *P. frutescens* var. *frutescens* (들깨)와 *P. frutescens* var. *crispa* (차조기), 야생종에는 *P. citriodora*, *P. hirtella*, *P. setoyensis* 등이 있고 (Nitta et al. 2003), 우리나라에서 재배되고 있는 것은 *P. frutescens* var. *frutescens* (들깨)이다. 최근까지 개발된 들깨 품종을 보면 종실용 들깨는 18품종이 개발되어 있으며, 잎과 열매를 함께 이용하는 엽실용 들깨는 8품종에 불과하다 (Jung et al. 1999). 들깨의 용도를 보면 잎과 종실은 대부분 식용 및 약용으로 이용되고 있지만, 여러 가지 가공단계를 거쳐 천연식용 색소, 화장품의 원료 (Ohara et al. 2003)나 공업용 재료로도 활용되고 있다. 이와 같이 다양한 용도를 갖고 있는 들깨의 조직배양 연구는 약에서 최초로 보고 된 이래 (Lee et

al. 1994), 자엽, 배축, 및 잎으로부터 캘러스와 싹을 유도하였고 (Kim et al. 1993, Lee et al. 2004) *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 (Lee et al. 2003, Kim et al. 2004) 등이 시도되었다.

식물체 재분화는 성장조절제의 조성고 절편체의 종류, 배양재료의 유전형 등에 따라 많은 차이가 있으며 (Lee et al. 2003, Moon et al. 2000, Kim et al. 2002), 들깨에서는 약을 이용한 경우에는 NAA와 kinetin의 혼용 (Lee et al. 2003)과 자엽과 하배축인 경우에는 BA와 NAA의 혼용 (Jung et al. 1999)이 식물체재분화에 효과적이어서 절편체의 종류와 유전자형 및 성장조절제의 조성에 따라 연구자에 따라 다르게 보고 되어 있다. 들깨의 유전자원 확대를 위해서는 방사선이나 화학물질에 의한 돌연변이의 창출과 더불어 외래의 유용유전자를 직접 도입하는 형질전환 방법 또한 대안으로 제시되고 있다. 그러나 형질전환을 통한 외래유전자의 도입은 대부분 기내에서 세포배양의 과정을 거쳐 이루어지기 때문에 식물의 세포나 조직을 이용한 형질전환 연구가 성공적으로 수행되기 위해서는 조직배양체계의 확립이 선행되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 형질전환 들깨를 개발하기 위해 일

*Corresponding author Tel 054-530-5233 Fax 054-530-5239

E-mail: kkm@sangju.ac.kr

차적으로 들깨의 식물체 재분화 효율을 향상시키고자, 들깨의 조직배양에 관여하는 몇 가지 요인에 대한 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

실험에 사용한 들깨 (*Perilla frutescens* L.)는 2003년 작물과학원 영남농업연구소에서 분양받은 ‘만백들깨’, ‘만추들깨’, ‘남천들깨’, ‘일엽들깨’, ‘잎들깨’ 등 5품종을 이용하였다. 종자의 표면살균은 70% 에탄올에 1분 침지 후 멸균수로 2번 헹군 후 1% 치아염소산나트륨에 30분간 침지한 후, 멸균수로 4번 세척한 후 MS (Murashige and Skoog 1962)배지에 치상하여 기내배양 하였다. 기내 발아 후 5~7일된 유식물의 자엽 (5×5 mm)과 배축 (5 mm)를 절취하여 신태 형성에 이용하였다.

MS 배지에 30 g/L sucrose 및 2.0 mg/L 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)와 0.5~1.0 mg/L BA (6-benzylaminopurin)을 조합한 배지에, 자엽과 하배축을 10개/petri dish에 치상하여 25±2°C (암상태)에서 배양하면서 3주, 4주 후에 배발생 캘러스의 형성률을 관찰하였다. 배양조건은 온도 25±2°C, 압 조건에서 배양하였다. 캘러스 형성배지에서 형성된 캘러스를 MS 배지에 30 g/L sucrose 및 0.1~0.5 mg/L NAA (α -Naphthalene acetic acid)와 1.0~2.0 mg/L BA가 혼용된 배지에 3주마다 계대배양하면서 기관형성과 배형성 양상을 조사하였다. 배양조건은 온도 25±2°C, 16/8 (day/night)시간의 6,000 lux 광조건에서 배양하였다. 체세포배 발생과 기관분화의 형태 발달 양상을 조사하고, 신태가 분화하여 2 cm 정도 성장하면, 식물체를 분리하여 성장조절제를 첨가하지 않은 MS 배지에 옮겨 발근을 유도하였다. 1/2 MS배지에서 5 cm 크기로 신장된 식물체를 버미큐라이트가 담긴 배양 용기에 옮겨 순화시킨 후 상토와 모래를 1:1로 섞은 pot에 옮겨 온실에서 재배하였다.

결과 및 고찰

‘만백들깨’의 자엽절편 조직을 2 mg/L 2,4-D, 2 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L BA, 2 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L BA를 혼용 처리한 MS배지에서 4주간 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다.

절편체를 배지에 치상한 후, 암상태에서 6-7일 후부터 캘러스 형성이 시작되었다. 배양 2주 2 mg/L 2,4-D에 BA가 MS 배지에서 부분적으로 매끈한 점액성의 캘러스가 형성되기 시작하였다. 2 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L 첨가배지에서는 연두색의 부드러운 캘러스가 92% 형성되었고, 2 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L 첨가배지에서는 연두색의 단단하고 밀집형의 매끈한 캘러스가 96%로 형성되었다. 대조적으로 2,4-D 단독으로 첨가된 배지에서는 흰색의 다소 단단한 캘러스와 노란색의 무은 캘러스가 유도 되었다. 캘러스가 형성되더라도 식물체가 분화되지 않은 것은 대부분 무르고 노란색이었다 (data not show). Chaudhury와 Que (2000)는 딱딱하고 흰 캘러스 조직에서 식물체분화율이 높고, Lee 등 (1994)은 들깨의 약배양에서 고농도의 cytokinin 호르몬에서 흰색의 딱딱한 캘러스가 발생되었고, 식물체 분화가 일어난다고 하였다. 본 실험에서도 캘러스 형성율은 2,4-D 단독처리보다 BA가 첨가된 배지에서 캘러스 형성율이 효과적이었으며, Suh와 Park (1986)도 2,4-D, NAA와 같은 오옥신류의 단독처리보다 BA와 같은 cytokinin 류와의 혼용처리가 캘러스 유도에 효과적이라고 보고하였다.

식물체 분화에 적합한 배지의 성장조절제 조성을 조사하기 위하여 ‘만백들깨’의 자엽 절편체에서 얻어진 캘러스를 NAA, BA 등이 첨가된 MS 배지에서 5주간 배양한 바 (Figure 1, Table 2), 2.0 mg/L BA와 0.1 mg/L NAA가 첨가된 배지에서 신태유기율이 24.7%로 가장 높게 나타났다. 한편, 1.0 mg/L BA와 0.5 mg/L NAA가 첨가된 배지에서의 신태유기율은 3.9%로 가장 낮게 나타나 NAA와 BA의 상대비율이 높을 때 신태유기율이 높은 경향이였다.

Lee 등 (2003)은 들깨에서 1.0 mg/L BA와 0.1 mg/L NAA 혼용처리에서 식물체 재분화율이 21.7%로 나타났다고 하였으며, Eun 등 (2000)은 시크라멘을 이용한 NAA와 BA을 혼용

Table 1. Morphological types of calli and callus formation induced from cotyledon of *Perilla frutescens* after 4 weeks of culture on MS medium containing 2,4-D and BA

Medium	No. of inoculated explants	Calli induction (%)	Morphological types of calli
A ^a	280	85.0±4.6	white-hard, yellowish-friable
B	290	92.0±5.6	soft-watery, green
C	290	94.3±5.5	compact-watery, green

^aA: MS+2 mg/L 2,4-D+30 g/L sucrose+5 g/L gelrite, B: MS+2 mg/L 2,4-D+0.5 mg/L BA+30 g/L sucrose+5 g/L gelrite, C: MS+2 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L BA+30 g/L sucrose+5 g/L gelrite

첨가된 MS배지에 배양하였을 때 auxin류와 cytokinin류의 단일 처리에서 보인 반응에 비하면 효과적으로 신초 분화가 이루어져 성장조절제의 처리에 따라 반응에 많은 차이가 있다고 하였다.

절편부위별로 배양한 결과 대부분 신초 분화는 이루어졌으며 자엽과 하배측의 절편체에서 캘러스와 신초가 같이 분화되었는데 (Table 2) 자엽절편의 경우 캘러스가 약간 유도된 상태에서 신초 분화가 동시에 이루어졌고 신초 분화율이 하

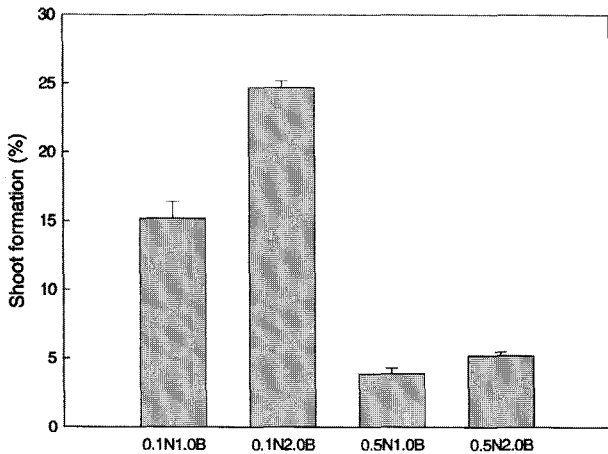


Figure 1. Effect of the different concentrations (mg/L) of NAA (N) and BA (B) on shoot formation from cotyledon tissue of *Perilla frutescens* cv. Manbaek after 5 weeks of culture.

배측 절편 (10.3%)보다 22.1%로 비교적 높은 경향으로 배양 10일 경부터 1개의 절편에서 다수의 신초 분화를 보여 자엽 절편배양에서 효과적으로 나타났다.

Kim 등 (2004)은 들깨의 절편체 부위에 따른 신초유도는 자엽의 경우 3.0 mg/L BA 처리에서 좋았다고 하여 본 실험의 결과와 유사한 경향이였다.

자엽과 하배측 절편은 절단면의 조직이 부패 상태에서 캘러스가 약간 유도되었으며, 대부분 배지와 접촉하고 있는 절단면에서 집중적으로 신초분화가 이루어지는 경향을 보였다. 이러한 현상은 절편의 절단시 발생하는 상처부위로 성장조절 물질이 이동하여 왕성한 기관형성을 유도한 결과이거나, 배지로부터 성장조절물질을 직접적으로 공급받을 수 있는 배지 접촉부위에서 더 높은 기관 형성능을 보인 결과로 사료된다.

배양효율이 높은 품종을 선발하기 위하여 ‘만백들깨’ 외 4 품종의 자엽과 하배측 절편을 이용하여 신초 유기율을 조사한 바, 신초 유도율의 범위는 3.0~27.3%로 품종 간 차이가 컸으며 공시된 4 품종 모두 배측보다 자엽에서 신초 유도율이 높게 나타나는 경향이었고, ‘만백들깨’의 자엽 유래 절편에서 신초 유도율이 27.3%로 가장 높았다 (Table 3). 조직배양 효율의 품종 간 차이는 Lee 등 (2004)도 88 계통의 들깨 신초 유도율을 비교한 바, 품종 간 차이가 인정되었다고 하였다.

식물조직 배양에서 재분화 효율은 배지조성, 배양환경 및

Table 2. Frequency of plant regeneration from the cultures of cotyledon and hypocotyl explants of perilla, c.v. 'Manbaek' on the MS medium containing with 0.1 mg/L NAA and 2.0 mg/L BA.

Explants	No. of explants cultured ^a	Plant regeneration (%)	
		Normal	Abnormal
Cotyledon	140±2.0	31.0±3.0 (22.1±2.1)	82.0±1.7 (58.6±1.2)
Hypocotyl	107±1.7	11.0±2.6 (10.3±2.4)	32.0±1.7 (30.0±1.6)

^aMean±SD.

Table 3. Genotypic differences of shoot formation ability in cotyledon and hypocotyl culture of perilla

Cultivars	Tissues	No. of tissues cultured	Plant regeneration (%)
Manbaek	Cotyledon	296	27.3±0.6
	Hypocotyl	294	5.7±5.1
Namcheon	Cotyledon	290	10.7±3.8
	Hypocotyl	290	6.9±3.0
Ip	Cotyledon	290	9.3±3.8
	Hypocotyl	290	4.7±2.5
Manchu	Cotyledon	290	8.3±1.2
	Hypocotyl	285	3.0±1.0
Ilyeop	Cotyledon	285	8.3±1.2
	Hypocotyl	290	5.0±1.0

* Medium; MS + 2.0 mg/L BA + 0.1 mg/L NAA + 30 g/L sucrose + 5 g/L gelrite.

^aMean±SD.

Table 4. Pattern of shoot formation in cotyledon culture of perilla

No. of cultured tissues	Embryogenesis (%)		Organogenesis (%)	
	Normal	Abnormal	Normal	Abnormal
342	7.0±1.0 ^a (6.1±0.9)	57.7±4.5 (50.6±4.1)	26.0±2.0 (22.8±1.9)	29.0±1.0 (25.5±1.3)

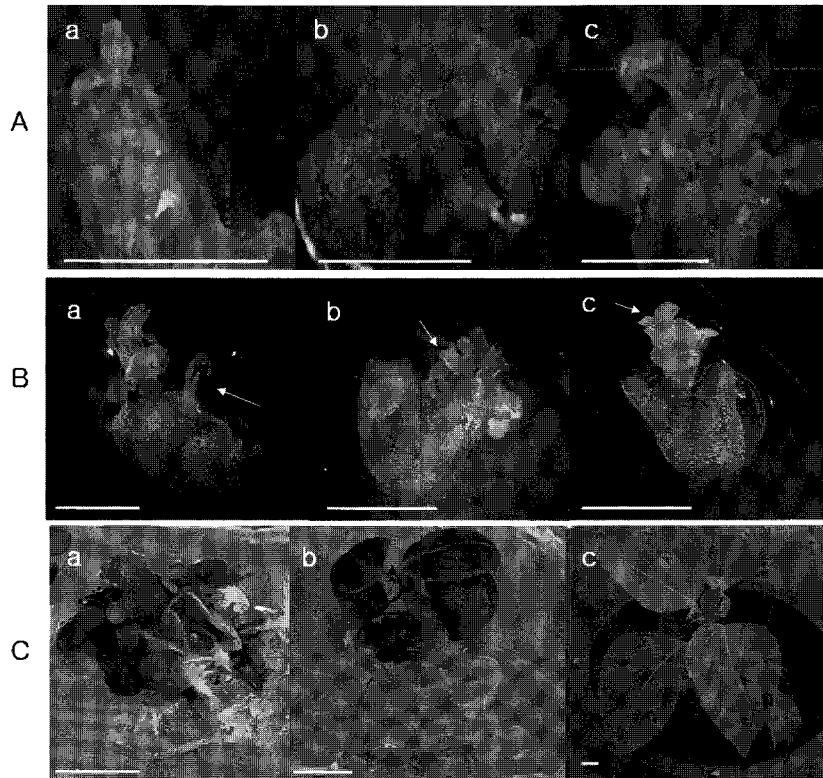
^aMean±SD.

Figure 2. Plant regeneration from the cultures of cotyledon explants of perilla (*Perilla frutescens* L.). A: Shoot formation from cotyledon explants cultured on MS medium supplemented with 2.0 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA. a; Leaf primordia formed from cotyledon (3~5 mm in length) tissues after 7 days. b and c; Young leaves after 2~3 weeks of culture. B: Different response of perilla cotyledon explants to cultured on medium for shoot formation. Direct shooting (a), somatic embryo (b) and cotyledonary embryo (c) formed from cotyledon cultured on MS medium with 2.0 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA. C: *In vitro* plant regeneration from cotyledon tissues of perilla. Abnormal multiple shoots (a) & Normal (b) young shoots, c; *In vitro* plant growing in soil after acclimatization. Bars represent 10 mm.

배양에 이용된 모품종의 유전형에 따라 다른 것으로 알려져 있는데 (Moon et al. 2000, Han et al. 1999), 들깨의 자엽 및 배축조직을 배양한 본 연구에서도 신초유기율은 배지조성 (Figure 1), 품종간 (Table 3) 및 식물조직 부위 (Table 2, Figure 2)에 따라 다르게 나타났다.

자엽에서 신초가 분화되는 과정을 보면 배지에 이식 후 3~4일까지는 신초의 형성이 없이 절편체가 비대 되었고, 배양 7일 후 신초 분화가 최초로 관찰 되었으며 (Figure 2-A: a), 배양 15일 후에는 엽원기로부터 어린잎이 전개 (Figure 2-A: b, c)된 다음 배양 5주 후에는 정상적인 식물체로 분화하였다. 배양된 자엽으로부터 신초가 직접 분화 (Figure 2-B: a) 되기도 하고 체세포배 (Figure 2-B: b)로부터 자엽 출현기의 배 (Figure 2-B: c)를 거쳐 식물체가 분화되기도 하였다. 배양기

간이 경과할수록 절편체에서 다수의 신초가 분화되는 것이 관찰되었다.

자엽절편체의 위치별 신초유도 반응에서 체세포배나 기관 분화가 가능하였다. 직접 신초가 분화하는 기관분화 과정에 의한 신초형성률은 22.8%로 높은 데 비해, 일부 자엽 절편체에서는 배발생 과정을 통해 신초의 발달이 이루어졌으며 신초 형성률은 6.1%로 낮았다 (Table 4). 이 결과는 들깨의 조직 배양에서 식물체 재분화는 대부분 배형성 과정을 거친다고 한 Jung 등 (1999)의 결과와는 상이 하였는데, 이는 배양에 이용된 모식물의 유전형이나 배양조건, 생장조절제의 조성 등의 차이에서 기인된 것으로 추정된다.

배양된 자엽 절편체가 팽대되면서 형성된 조직으로부터 유기된 신초는 정상적인 개체 (Figure 2-C: b, c)로 성장하였으

나, 자엽으로부터 bush type의 신초를 형성한 경우 (Figure 2-C: a)에는 정상적인 잎이 전개되지 않아 완전한 식물체로 발달하지 못했다. 본 실험의 결과는 Lee 등 (2004)이 들깨의 잎을 저농도의 cytokinin 0.1 mg/L BAP와 0.1 mg/L TDZ를 첨가한 MS배지에서 배발생이나 신초형성이 양호하였다고 한 결과와 유사하였다.

이상의 연구결과에서 신초 재분화 능력은 배양에 이용된 들깨의 유전형이나 조직부위에 따라 상이한 것으로 나타났으며, 신초재분화가 가장 양호한 품종은 ‘만백들깨’였으며 조직부위는 배축보다 자엽 조직에서 신초 분화능력이 높은 경향이 있었다. 그리고 0.1 mg/L의 NAA와 2.0 mg/L의 BA를 혼용 처리했을 때 신초형성률이 가장 높게 나타났다.

본 연구에서 얻어진 이러한 결과들은 들깨의 조직배양 효율향상에 직접 이용될 수 있을 뿐만 아니라 조직배양 기법을 이용한 들깨의 형질전환 효율 향상에도 매우 유익하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

들깨의 조직배양에서 배지의 성장조절제 조성은 0.1 mg/L의 NAA와 2.0 mg/L의 BA가 혼용된 배지에서 신초형성률이 24.7%로 가장 높게 나타났다. 신초형성에 적합한 배양부위는 자엽이었으며 품종별 신초형성율은 3.0~27.3%로 품종간 차이가 컸고, ‘만백들깨’의 자엽 배양에서 27.3%의 가장 높은 재분화율을 나타내었다. 조직부위별로는 공시된 모든 품종에서 배축보다는 자엽 조직에서 신초형성율이 높았으며, 신초의 분화형태는 배형성 (6.1%) 보다 기관형성 (22.8%)을 경유하는 것이 많았다.

인용문헌

Chaudhury A, Qu R (2000) Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: Effect of 6-benzyladenin in callus induction medium. *Plant Cell Tiss Org Cult* 60: 113-120
 Eun JS, Kim YS, Han SK (2000) Plantlet Regeneration by tissue cultures of *Cyclaman persicum* Mill. *Kor J Plant Tiss Cult* 27: 479-484

Ha KS, Han TJ (2002) Adventitious root formation from cotyledon in soybean (*Glycine max* L.) cultivars. *Kor J Plant Biotech* 29: 25-31
 Han TJ, Kim IH, Kim SL, Kim JC, Lim CJ, Jin CD (1999) Organ formation-the formation of adventitious roots, trichomes and calli from leaf segments of *Arabidopsis thaliana* by naphthaleneacetic acid concentrations and their determination times. *Kor J Plant Tiss Cult* 26: 211-217
 Ito M., Kato H, OKa Y, Honda G (1996) A taxonomic study of Japanese wild perilla (*Labiatae*). *J Phytogeogr & Taxon* 44: 43-52
 Jung SH, Yang SK, Kim HK, Chung DS, Cho YS, Kim DH (1999) Changes of RNA and protein during callus induction and plant regeneration from *Perilla frutescens*. *Kor J Life Sci* 9: 29-34
 Kim DC, Chung HJ, Min BH, Yang DC (2002) Plant regeneration from explants types and cultivars of Boxthorn (*Lycium chinese* Mill). *Kor J Plant Biotech* 29: 15-18
 Kim KH, Lee YH, Kim DH, Park YH, Lee JY, Hwang YS, Kim YH (2004) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. *Plant Cell Rep* 25: 361-365
 Lee CO, Li CH, Lim JD, Yu CY (2004) Regeneration ability in germplasms of *Perilla frutescens*. *Kor J Medicinal Crop Sci* 12: 500-507
 Lee BK, Yu SH, Kim YH, Hur HS, Lee SC and Lee JY (2003) Efficient *in vitro* shoot regeneration of perilla (*Perilla frutescens*) from cotyledon, hypocoty and leaf explants. *Kor J Breed* 35: 237-240
 Lee HS, Lee JI, Ryu SN, Hur HS (1994) Effect of low temperature and plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in anther culture of perilla. *Kor J Breed* 26: 345-352
 Moon JG, Choo BK, Doo HS, Kwon TH, Yanh MS, Ryu JH (2000) Effect of growth regulators on plant regeneration from the cotyledon explant in Oriental Melon (*Cucumis melo* L.). *Kor J Plant Tiss Cult* 27: 1-6
 Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497
 Nitta M, Lee JK, Ohnishi O (2003) Asian Perilla crops and their weedy forms: Their cultivation, utilization and genetic relationships. *Economic Bot* 57: 245-253
 Ohara K., Tommi U, Sato EF, Yazaki K (2003) Limonene production in tobacco with *Perilla* limonene synthase cDNA. *J Exp Bot* 54: 2635-2642
 Suh SK, Park HG (1986) Studies on the anther culture of garlic (*Allium sativum* L.) callus formation and plant regeneration. *j Kor Soc Hort Sci* 27: 89-95

(접수일자 2006년 12월 5일, 수리일자 2007년 1월 19일)