

## 희귀수종인 주걱비름(*Sedum tosaense* Makino)의 잎절편으로부터 기내 식물체 재분화 및 광독립배양을 통한 토양순화

고명석 · 배기화 · 송관필 · 소인섭

### Plant regeneration and soil acclimatization through photoautotrophic culture from leaf explant of a rare species in *Sedum tosaense* Makino

Myoung-Suk Ko · Kee Hwa Bae · Gwanpil Song · In Sup So

Received: 13 June 2013 / Accepted: 20 June 2013  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** The aim of this study was to establish plant regeneration from leaf explants of *Sedum tosaense* Makino, which is globally rare and endangered species. The leaf explants of *S. tosaense* were cultured on the MS medium supplemented with different concentration of BA and NAA for callus induction. Callus induction was showed the highest (100%) on MS medium containing 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA and 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA. The highest number of shoots were regenerated when callus were cultured on MS medium containing 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA and 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA for 5 weeks. The axillary bud were cultured on the MS media supplemented with combination of BA and NAA for in vitro propagation. The highest number of adventitious shoot (7.9 per explants) formed at 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA and 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA. For rooting, MS medium supplemented with or without 2.0 g·L<sup>-1</sup> activated charcoal was tested. The optimal results were observed using

MS medium supplemented with 2.0 g·L<sup>-1</sup> activated charcoal, on which 85.7 (No. of root), 4.6 cm (length of root). 1,200 ppm CO<sub>2</sub> and 350 ppm CO<sub>2</sub> were supplied for make certain the effects of CO<sub>2</sub> on pre-acclimatization by photoautotrophic culture. 1,200 ppm CO<sub>2</sub> treatment was established higher than 350 ppm CO<sub>2</sub> treatment. Soil acclimatization of *in vitro* plantlets was the best in mixture soil consisted of peat moss and perlite with 100% survival rate and they showed the maximum growth.

**Keywords** callus induction, *in vitro*, photoautotrophic culture, soil acclimatization

### 서론

주걱비름(*Sedum tosaense* Makino)은 돌나물과(Crassulaceae) *Sedum*속에 속하는 식물로서, 숲 가장자리의 건조한 바위 틈에 자라는 다육질의 다년초이다. 가지는 옆으로 뻗으며 로제트 모양으로 월동하며, 봄에 꽃이 맺히는 줄기가 발생한다. 잎은 단엽으로 주걱형이다. 꽃은 3~5월에 피며 황색을 띠고, 종자는 갈색 타원형으로 소립이다. 주걱비름은 지금까지는 일본과 중국에만 분포하는 것으로 알려져 있는데, 특히 일본의 경우 주로 고지, 도쿠시마 지방의 석회암지대 바위 위에서 자라며, 개체수가 400개체 이하로서 희귀 및 멸종위기식물로 보호하고 있을 만큼 희소한 것으로 보고되고 있다(Anonymous 2000). 우리나라에는 2002년 제주도 북제주군 조천읍 산굼부리 분화구 내에서 처음 발견되었으며, 우리나라 이름은 잎이 주걱 모양이라는 점을 고려하여 ‘주걱비름’이라 명명하였다

In Sup So (✉)  
생명자원과학대학  
(Jeju National University, Jeju, 690-756Korea)  
e-mail: soinsup@jejunu.ac.kr

Myoung-Suk Ko  
(재)제주테크노파크 제주생물종다양성연구소  
(Jeju Biodiversity Research Institute, Jeju Technopark,  
Seogwipo, 699-943, Korea)

Kee Hwa Bae  
(재)홍천메디칼허브연구소  
(Hongcheon Institute of Medicinal Herb, 101 Yeonbong-ri,  
Hongcheon-eup, Hongcheon, Gangwon, 250-930, Korea)

Gwanpil Song  
(주)제주자연환경연구소  
(Jeju Environment Research Institute, Rm 603, BI Center, Jeju  
Tourism College, Jeju 690-791, Korea)

(Song et al. 2004).

돌나물과는 1년생 또는 다년생 초본이 대부분이고 다육성의 잎을 가지며, 세계적으로 25~33속에 900~1,300종이 분포하고, 우리나라에 자생하고 있는 돌나물과의 *Sedum* 속에는 돌나물(*Sedum sarmentosum*), 애기기린초(*Sedum middendorffianum*), 태백기린초(*Sedum latiovalifolium*), 꿩의비름(*Sedum drythrostichum*), 땅채송화(*Sedum oryzifolium*), 둥근잎꿩의비름(*Sedum rotundifolium*), 세잎돌나물(*Sedum sieboldii*) 등이 있다(Kwon and Jeong 1999).

최근 돌나물과 식물들의 기능성 성분에 대해 많은 연구가 수행되어 그 효능이 증명되고 있다. 홍경천(*Rhodiola sachalinensis*)은 항산화 효과(Park et al. 2005)와 멜라닌 합성 저해효과(Choi et al. 2004)가 있는 것으로 알려져 있으며, 암 예방 및 암세포 증식억제 효과가 있는 것으로 나타났다(Bae 2005). 기린초추출물은 우수한 항산화 효과를 지니는 것으로 보고되고 있고(Lee et al. 2011b), 돌나물은 HIV 및 간염 바이러스 억제효과(He et al. 1998; Woo et al. 1997), 항암작용(Kang et al. 2000; Park et al. 2002) 및 항고혈압 작용(Oh et al. 2004), 멜라닌 생성 저해효과(Sim et al. 2008), 뿐만 아니라 폐경기 여성이 폐경으로 인한 장애를 감소시키기 위하여 복용하는 에스트로젠을 대체할 수 있는 phyto-estrogen이라는 물질을 다량 함유하고 있는 것으로 알려졌다(Kim 2003).

식물의 조직배양은 우량종묘 및 유용물질 생산, 형질 전환을 통한 저항성 유전자 도입 등의 목적으로 널리 이용되고 있다(Choi et al. 2002; Seo et al. 2002). 또한, 희귀 및 멸종위기식물의 번식 수단으로 이용이 가능하며 국내에서도 조직배양의 방법을 통하여 희귀종에 대한 현지외 보존을 위한 결과가 발표된 바 있다(Moon et al. 1997; Moon et al. 1999; Yoon 1997). 식물조직배양의 효율은 식물 종에 따라 큰 차이를 보이며, 동일종에서도 품종 및 배양조직에 따라 성장조절물질의 요구도가 다르다. 이는 배양식물체내의 내생호르몬 양과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다(Lisowska and Wysokinske 2000; Koroch et al. 2002). 대상식물의 배양부위에 따라서 외부에서 공급하는 성장조절물질에 다양하게 반응하기 때문에 배지내의 적정 성장조절물질의 종류와 농도를 결정하는 일이 매우 중요하다. 엽육이 두꺼운 다육성 식물인 주걱비름도 배양조직에 따라 성장조절물질의 요구도 다른 것으로 보인다. 하지만 아직까지 주걱비름의 조직배양에 관한 연구가 없으며, 같은 돌나물과 *Sedum*속 식물에서 꿩의비름의 잎과 줄기 절편으로부터 식물체의 재분화에 관한 연구(Yoon 1997)와 돌나물 잎으로부터 식물체 재분화에 관한 연구(Ahn 2004), 둥근잎꿩의비름의 식물체 재분화 연구(Kwon and Yoon 2010) 외에는 거의 없는 실정이다.

한편, 식물체가 기내에서도 에너지 소스로 당의 첨가 없이 스스로 광합성에 의해 성장할 수 있게 하는 배양방

법을 광독립배양(photoautotrophic culture)이라 한다(Kozai 1991). 광독립배양의 장점은 강제 환기에 의한 낮은 상대 습도를 유지하고 배지 내 sucrose와 같은 당원을 첨가하지 않아도 오염율이 현저히 낮다는 점이다. 또한 이렇게 광독립배양 하에서 생산된 식물체는 이미 낮은 습도에서 스스로 광합성을 통하여 탄소원을 공급함으로써 토양식재시 별도로 순화단계가 필요가 없다는 장점이 있다(Kozai 1991; Ziv 1995; Lian et al. 2002; Zobayed et al. 2004). 그러나 이러한 장점에도 불구하고 아직까지 광독립배양에 대한 많은 연구가 수행되지 못한 실정이다.

따라서 본 연구는 세계적 희귀 및 멸종위기식물인 주걱비름의 유전자원을 확보하기 위해 제주도 서거문오름의 곳자왈 지역에서 자생하고 있는 주걱비름 종자 발아체의 잎절편을 식물조직배양기술을 이용하여 식물체재분화조건을 확립하고자 하였으며, 광독립배양을 통해 주걱비름 조직배양식물체의 적용성과 효율성을 확인하고자 하였다. 이러한 연구는 주걱비름과 같은 희귀 및 멸종위기식물의 유전자원을 확보할 수 있는 방안을 제시하고 앞으로 주걱비름이 보유한 다양한 기능성물질의 확보 및 효능연구에 중요한 원천소재를 제공할 것으로 기대한다.

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 배양조건

주걱비름(*Sedum tosaense* Makino)종자는 제주도 서거문오름에서 2010년 6월에 채집하였다. 채집한 종자는 자연 건조하여 정선 후 멸균된 증류수로 세척한 다음 70% ethanol에 1분간 표면, 살균하였다. 멸균된 증류수로 5회 수세한 후 1% NaOCl 용액에 침지하여 10분간 흔들여 주었다. 다시 멸균된 증류수로 5회 수세한 후 멸균된 filter-paper 위에 올려놓고 물기를 제거하여 기내 파종하였다. 발아하여 성장한 주걱비름 종자발아체의 잎을 식물체 재분화 실험에 사용하였다. 모든 배양은 온도  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 광주기 16/8시간, 광도  $46 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 배양실에서 배양하였다. 실험에 사용한 모든 배지와 기구는  $121^\circ\text{C}$ , 1.5기압으로 20분간 고온, 고압 멸균하였다.

### 주걱비름 잎절편으로부터 캘러스 및 신초유도

주걱비름의 종자발아체로부터 식물체 재분화를 위해 잎을  $0.5 \times 0.5 \text{ cm}$ 의 크기로 절단하였다. 0, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA (6-Benzylaminopurine, Duchefa, Netheland)와 0, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA (Naphthalene acetic acid, Duchefa, Netheland)를 단용 혹은 혼용 처리한 MS (Murashige and Skoog 1962)배지 (30  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  sucrose, 7  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  agar, pH 5.7)를 실

힘관(15 × 2 cm)에 10 mL씩 분주하였다. 121°C, 1.5기압으로 20분 간 배지를 고온·고압멸균 후 각각 실험관에 앞절편 1개씩 20반복처리로 치상하였다. 5주 후 형성된 캘러스의 수와 캘러스의 무게를 조사하였고, 4개월 후 캘러스에서 유도된 신초의 수와 무게, 유도된 신초를 핀셋으로 눌러 견고도를 조사하였다.

### 액아배양을 통한 대량증식 및 발근

캘러스에서 유도된 주걱비름의 줄기에서 액아를 포함하는 마디를 1 cm의 길이로 절단하여 1 L 배양병(17 cm,  $\phi$  10 cm)에 1.0, 2.0 mg·L<sup>-1</sup>의 BA와 1.0, 2.0 mg·L<sup>-1</sup>의 NAA가 각각 혼합 첨가되어 제조된 MS배지에 3개씩 5반복으로 치상하여 9주간 배양 후 신초의 수와 무게, 배양상태의 견고도를 조사하였다. 기내발근을 위해 기내증식된 주걱비름의 줄기에서 마디를 1 cm의 길이로 절단하여 실험에 사용하였다. Activated charcoal (AC, Duchefa, Netheland)이 기내발근에 미치는 영향을 알아보기 위해 2 g·L<sup>-1</sup> AC를 함유한 MS (30 g·L<sup>-1</sup> sucrose, 7 g·L<sup>-1</sup> agar, pH 5.7)배지와 AC 무첨가 MS발근배지를 1L 배양병에 각각 200 mL씩 분주하고 121°C, 1.5기압으로 20분간 고온·고압 멸균하여 배지를 제조하였다. 각 처리구당 3개씩 5반복 치상하고 9주간 배양하여 뿌리를 유도한 후 뿌리의 수와 뿌리의 길이를 조사하였다.

### 광독립배양에 의한 순화전처리 및 토양순화

광독립배양(photoautotrophic culture)에 의한 순화전처리를 위해 기내에서 배양 중인 주걱비름 유식물체를 꺼내 증류수로 세척하여 뿌리에 묻은 배지를 제거하였다. 사각 plastic 배양병(SPL, Korea)에 질석 25 g과 sucrose를 첨가하지 않은 MS액체배지 80 mL을 첨가하여 배지를 제조하였다. 광독립배양 시 이산화탄소가 미치는 영향을 알아보기 위해 한 처리구는 이산화탄소농도가 1,200 ± 100 ppm인 광독립배양실(온도 25 ± 1°C, 광주기 16/8, 광도 1,600 Lux)에서 배양하였고, 또 다른 처리구는 이산화탄소농도가 350 ± 100 ppm인 일반배양실(온도 25 ± 1°C, 광주기 16/8시간, 광도 1,600 Lux)에서 배양하였다. 처리구당 2개체씩 16반복하여 이식하였다. 두 처리구 모두 배양병의 뚜껑을 닫지 않고 배양되었으며, 2주 간격으로 sucrose가 첨가되지 않은 MS액체배지를 보충하였다. 8주 후 성장한 주걱비름의 무게, 잎의 수와 두께, 뿌리의 수와 길이, 줄기의 길이, 엽록소함량을 조사하였다. 엽록소함량의 측정에는 식물체 2 g을 잘게 절단하여 80% acetone용액에 침지하였다. 4°C 암조건에서 48시간 추출하고 chlorophyll a, b의 함량은 분광광도계(MQX 200R, Biotek, America)를 이용하여 흡광도 663 nm, 645 nm에서 측정하였다(Lichtenthaler

1987). 기내배양묘의 토양순화를 위하여 기내에서 성장한 유식물체 중 초장이 1~2 cm, 근장 0.5~1 cm 내외로 유식물체를 선발하였다. 기외로 꺼내어 증류수로 뿌리에 묻은 배지를 깨끗이 세척한 후 사용하였다. 토양은 peat moss와 perlite를 1:1 (v/v)로 배합한 혼합 배양토, vermiculite와 perlite를 1:1 (v/v)로 배합한 혼합 배양토, perlite 단용 배양토로 조성하였다. 각 처리구당 20개체를 이식하였으며, 주 1회 관수하였다. 토양순화를 시작한지 12주 후 줄기와 뿌리의 길이, 토양활착률 및 생존율을 조사하였다. 유리온실 내 생육환경은 온도 25 ± 5°C, 차광 60%, 습도 50~60%로 조절하였다.

### 통계적인 분석

모든 데이터는 means ± standard deviation으로 표시하였다. 변인들의 집단 간 차이를 알아보기 위해서 ANOVA를 실시하였고, 유의성이 있는 경우 Duncan's multiple range test로 사후검증을 하였다. 통계적 유의성은 P < 0.05로 설정하여 분석하였다.

### 결과 및 고찰

#### 주걱비름 잎절편으로부터 callus 유도를 통한 식물체 재분화

주걱비름 잎절편으로부터 식물체 재분화를 위해 성장조절물질 BA와 NAA의 혼합배지를 제조하여 실험한 결과, 대조구로 사용된 성장조절물질을 무첨가한 배지에서는 배양 4주후에도 아무런 반응도 일어나지 않고 시간이 경과함에 따라 모두 고사하였다(Fig. 1A). 2.0 mg·L<sup>-1</sup>의 BA와 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA를 혼합처리한 배지에서는 배양 2주 후부터 잎절편이 비대하기 시작하였고, 배양 3주 후부터 잎절편에서 캘러스가 형성되기 시작하여 4주후에는 초록색의 캘러스가 형성됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). NAA 단독 첨가 배지에서는 성장조절물질에 반응을 보였으나, 캘러스는 형성되지 않고 뿌리만 형성되는 것을 관찰할 수 있었다. 이런 현상은 둥근잎평의비름(*S. rotundifolium*)을 육신류 단독처리 시 캘러스의 분화 없이 뿌리가 발생한 결과와 같다(Kwon and Yoon 2010). BA 단독 처리구에서는 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA 처리구를 제외하고 2.0, 5.0, 10.0 mg/L BA 처리구들의 캘러스형성 및 신초 성장상태는 불량하였다(Table 1). 반면, BA와 NAA를 혼합 첨가하여 캘러스를 유도한 결과, 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA와 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA를 혼합처리한 처리구가 가장 높은 캘러스 형성율(100%)을 보였고, 캘러스의 무게도 2.7 mg으로 가장 무거웠다(Table 1). 그리고 신초의 형성수도 가장 많았으며, 진한 녹색을 띠며 건실히 성장하였다(Table 1). 주걱비름의 잎절편에서

캘러스를 유도하였을 때 성장조절물질 BA, NAA를 단독으로 처리한 경우는 혼합처리구보다 캘러스 형성을 및 신초의 수, 신초의 성장상태가 현저히 낮은 결과를 보였다(Table 1). BA와 NAA를 혼합하여 처리한 경우 성장조절물질을 각각 1.0~2.0 mg·L<sup>-1</sup>농도로 혼합하여 처리하였을 때 다른 혼합처리구들보다 캘러스 형성을 및 신초의 수, 신초의 성장상태 모두 우수하게 나타났다(Table 1). 주걱비름과 같은 *Sedum*속인 둥근잎평의비름은 1.0~2.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA와 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA를 혼합하여 처리하였을 때 캘러스의 형성이 가장 높았다고 보고하였다(Kwon and Yoon 2010). 이는 주걱비름과 유사한 경향이다. 그러나 같은 *Sedum*속의 돌나물의 경우는 BA와 NAA를 혼합처리 하였을 때 캘러스 형성을 낮게 나타나 주걱비름의 결과와 상이한 차이를 보였다(Ahn and Lee 2004). 이와 같이 배지에 첨가

하는 성장조절물질의 종류와 농도에 따라 캘러스 형성 양상이 다르고(Ryu et al. 1992), 캘러스 형성 및 성장에는 세포의 성장과 분열을 촉진하는 옥신류의 첨가가 필수적이며, 사이토키닌을 함께 첨가하였을 때 상승적 촉진작용을 한다(Skoog et al. 1965). 또한 BA와 NAA의 농도가 높아질수록 캘러스 형성과 캘러스의 무게, 신초의 수 및 성장상태가 농도에 반비례하여 낮아지는 경향을 보였다(Table 1). 이는 성장조절물질을 고농도로 처리할 경우 식물체의 재분화를 억제한다는 연구 보고와 일치하였다(Moon et al. 1999; Moon et al. 2002). 따라서 같은 과, 속에 속해있는 식물이더라도 각각 배양에 적합한 성장조절물질의 종류와 농도 및 조합비율이 다른 많은 연구결과에서 검증되고 있으며, 같은 식물종이라 할지라도 배양 대상조직이나 연령에 따라서도 차이를 가지기 때문에 정

**Table 1** Effects of BA and NAA on callus induction from leaf explants and shoot formation from callus of *S. tosaense* in MS medium supplemented with 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose and 7.0 g·L<sup>-1</sup> agar after 5 weeks of culture

PGR (mg·L <sup>-1</sup> )		Frequencies of callus		Frequencies of shoot formation		
BA	NAA	Induction of callus (%)	Callus weight (mg)	Number of shoots	Weight of shoots (mg)	Compactness of shoots
0.0	0.0	0	- <sup>z)</sup>	- <sup>z)</sup>	-	-
	1.0	0	-	-	-	-
	2.0	0	-	-	-	-
	5.0	0	-	-	-	-
	10.0	0	-	-	-	-
1.0	0.0	50	2.0 gh <sup>y)</sup>	10 j <sup>y)</sup>	75 f	+ <sup>x)</sup>
	1.0	90	2.5 b	26 c	786 c	+++
	2.0	90	2.4 c	22 de	698 d	+++
	5.0	80	2.3 d	21 de	68 g	++
	10.0	55	2.0 g	11 i	10 m	+
2.0	0.0	10	1.2 jk	4 mn	4 p	+
	1.0	100	2.7 a	36 a	824 a	+++
	2.0	95	2.5 b	31 b	801 b	+++
	5.0	85	2.4 c	21 de	118 e	++
	10.0	60	2.1 ef	15 fg	18 k	++
5.0	0.0	5	1.0 k	3 o	3 q	+
	1.0	80	2.2 de	17 f	37 h	++
	2.0	75	2.2 de	15 fg	34 i	++
	5.0	70	2.1 e	15 fg	26 j	++
	10.0	55	2.1 ef	12 h	13 l	+
10.0	0.0	5	0.9 l	1 p	3 q	+
	1.0	15	1.2 ij	3 mn	3 q	+
	2.0	50	1.9 h	8 k	5 n	+
	5.0	35	1.9 h	6 l	4 no	+
	10.0	30	1.2 i	4 m	2 r	+

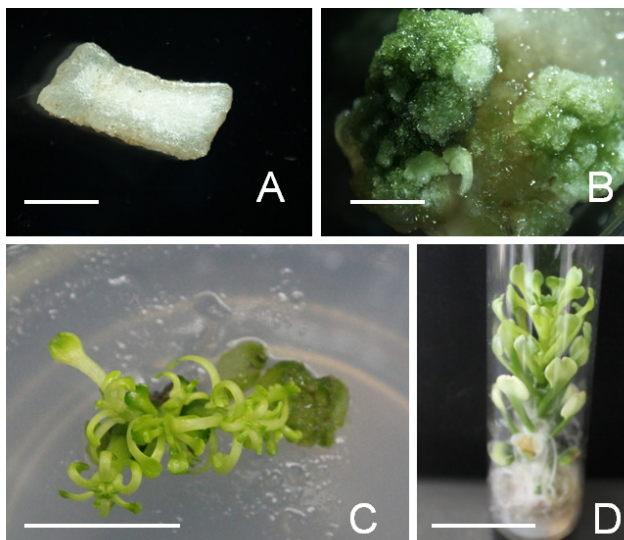
<sup>z)</sup>==not detected, <sup>y)</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P < 0.05.

확한 성장조절물질의 농도를 제시할 수는 없지만 몇 종의 성장조절물질 조합을 제시할 수 있었다.

액아배양을 통한 대량증식 및 발근

주걱비름의 캘러스를 이용한 다신표 유도를 위해 BA와 NAA를 농도별로 처리하여, 배양 9주 후 신표유도 개수와 무게를 측정한 결과, 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA와 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA를 혼합한 처리구에서 신표수와 신표무게는 각각 7.9개, 66.9 mg으로 가장 높았으며(Fig. 1C), 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA와 2.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA를 혼합한 처리구가 신표수 1.3개, 신표무게 10.0 mg으로 가장 낮았다(Table 2). 분화된 신표의 영양상태 역시

2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA와 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA를 혼합한 처리구가 가장 좋았으며, 1.0 mg·L<sup>-1</sup> BA와 2.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA를 혼합한 처리구가 가장 저조했다(Table 2). 주걱비름의 기내발근을 위해 유도된 신표를 유리시험관에서 신표발달을 4주간 수행하여 발근을 위한 실험재료로 사용하였다(Fig. 1D). 기내발근은 activated charcoal (AC) 무첨가 MS배지와 2 g·L<sup>-1</sup> AC를 첨가한 MS배지에서 수행이 되었으며 nodal culture을 통해 배양 9주 후 발근된 뿌리의 수와 뿌리의 길이를 관찰한 결과, AC를 함유하지 않은 MS배지는 뿌리 수 37.7개, 뿌리길이 2.5 cm로 조사되었고, 2 g·L<sup>-1</sup> AC를 함유한 MS배지는 뿌리 수 85.7개, 뿌리길이 4.6 cm로 조사되었다(Table 3). AC를 함유하는 배지에서 발근된 뿌리는 유백색으로 배양 4주후 배양병을 가득 채울 정도로 자라는 것을 확인하였고(Fig. 2A), AC무첨가 배지는 발근이 잘 이루어지지 않는 것으로 확인하였다(Fig. 2B). Lee (2011a) 등은 AC를 첨가함으로써 기내에서 솔나리의 뿌리 발달이 무첨가한 경우보다 더 우수하였다는 보고가 있으며, Yoon (2010)등의 연구에서도 AC 첨가가 덴드로비움 유식



**Fig. 1** Callus induction from leaf explants and shoot regeneration of *S. tosaense* derived callus. A: control (1/2MS medium 30 g/L sucrose without plant growth regulators), B: Callus formation cultured on MS medium containing 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA and 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA after 4 weeks of culture, C: Shoot induction of MS medium containing 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA and 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA after 6 weeks of sub-culture, D: Shoot elongation on MS medium without PGR's after 4 weeks of sub-culture. Scale bar (A and B: 50 mm, C and D: 2 cm)

**Table 2** Effect of BA and NAA on shoot multiplication from callus of *S. tosaense* on MS medium supplemented with 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose and 7.0 g·L<sup>-1</sup> agar after 9 weeks of culture

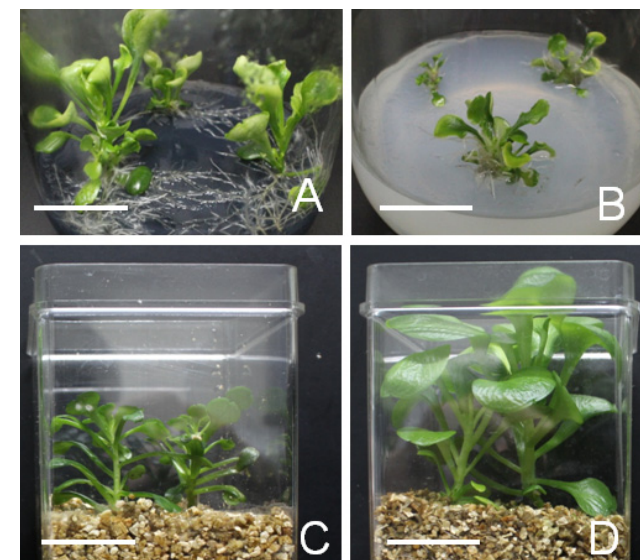
Treatment (mg·L <sup>-1</sup> )		No. of shoot	Weight of shoot (mg)	Compactness of shoot
BA	NAA			
1.0	1.0	2.0 c <sup>2)</sup>	22.8 c	++ <sup>y)</sup>
	2.0	1.3 d	10.0 d	+
2.0	1.0	7.9 a	66.9 a	+++
	2.0	4.3 b	33.9 b	++

<sup>2)</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P < 0.05, <sup>y)</sup>+=poor, +=moderate, +++=good

**Table 3** Effect of activated charcoal on root induction from axillary bud of *S. tosaense* on MS medium supplemented with 30 g·L<sup>-1</sup> sucrose and 7.0 g·L<sup>-1</sup> agar after 9 weeks of culture

Activated charcoal (g·L <sup>-1</sup> )	No. of roots	Length of roots (cm)
0	37.7 b <sup>2)</sup>	2.5 b
2	85.7 a	4.6 a

<sup>2)</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P < 0.05.



**Fig. 2** *In vitro* rooting and photoautotrophic culture of *S. tosaense* A: MS medium with 2.0 g/L AC, B: MS medium without AC, C: Treated 350 ppm carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) of plantlet after 8 weeks of culture, D: Treated 1,200 ppm CO<sub>2</sub> of plantlet after 8 weeks of culture. Scale bar: 3 cm

물체의 기내발근에 효과가 있다고 보고하고 있다. AC의 첨가는 에틸렌을 흡착하여 식물체를 이식할 때 생긴 상처의 치유를 촉진시켜준다(Karasawa 1966). 또한 AC는 고온-고압멸균 시 배지의 pH가 낮아지는 것을 방지하여 세포의 성장과 발달에 영향을 주어 뿌리 유도를 촉진한다는 연구결과도 보고된 바 있다(Eymar et al. 2000; Pan and van Staden 1998; Dumas and Monteuuis 1995). 이상의 결과와 참고문헌들로 미루어 보아 기내발근 시 AC 첨가가 기내발근을 촉진시키는 것으로 사료된다.

#### 광독립배양을 통한 순화전처리

광독립배양에 의한 순화전처리 시 이산화탄소가 미치는 영향을 알아보기 위해 이산화탄소농도를 1,200 ppm과 350 ppm으로 다르게 하였다. 8주간 배양 후 주걱비름의 엽수, 엽폭, 엽두께, 줄기길이, 뿌리길이, 생중량, 엽록소 함량을 측정하였다. 엽수와 엽폭, 엽두께는 이산화탄소 농도 1,200 ppm에서 배양한 식물체(Fig. 2D)가 엽수 18.92개, 엽폭 2.94 cm, 엽두께 0.97 cm로 350 ppm에서 배양한 식물체(Fig. 2C)보다 우수하였다. 줄기와 뿌리의 길이도 7.09 cm, 7.99 cm로 1,200 ppm에서 배양한 식물체가 생장이 우수하였다. 생중량에서는 1,200 ppm에서 배양한 식물체의 무게가 2.76 g으로 350 ppm에서 배양한 식물체의 무게 0.74 g와 뚜렷한 차이를 보였다(Table 4). 광독립배양 시 생리적 성장지표라 할 수 있는 엽록소 함량을 측정한 결과, 이

산화탄소 농도 1,200 ppm에서 배양한 식물체가 1.46 mg/g로 350 ppm에서 배양한 식물체보다 엽록소 함량이 높은 것으로 나타났다(Table 5). 음나무(*Kalopanax septemlobus*) 광독립배양에서도 이산화탄소를 공급해줄 경우가 생장이 우수하다는 연구결과가 보고되었으며(Park et al. 2011), 카네이션(*Dianthus caryophyllus*)과 스타티스(*Limonum* spp.) 광독립배양 시 이산화탄소 농도가 높을수록 식물체의 생장이 좋았으며, 1,000 ppm에서 배양된 식물체가 엽록소 함량이 가장 높은 것으로 보고된 바가 있다(Jeong et al. 1996). 광독립배양이 거베라(*Gerbera jamesonii*) 생육에 미치는 영향에 대한 연구에서는 이산화탄소 1,000 ppm 처리구가 다른 처리구들에 비해 엽수, 엽장, 근장, 생체중, 엽록소 함량 등이 우수하다고 보고하고 있다(Shon et al. 1997). 이는 광독립배양 시 고농도의 이산화탄소 공급이 식물체가 스스로 광합성을 더욱 원활하게 할 수 있도록 하여 성장을 촉진시키는 것으로 사료된다.

#### 토양순화

기내에서 성장한 주걱비름의 토양순화 시 적정 토양의 종류를 알아보려고 실험을 수행하였고, 피트모스(peat moss)와 펄라이트(perlite)를 1:1 (v/v)로 혼합한 배양토(PPS) 및 버미큘라이트(vermiculite)와 펄라이트를 1:1 (v/v)로 혼합한 배양토(VPS), 펄라이트 단용 배양토(PS)에 20개체씩 유묘를 이식하고 12주 후 생존율과 줄기의 길이, 뿌리의 길이,

**Table 4** Effect of carbon dioxide concentrations on photoautotrophic culture from plantlets of *S. tosaense* after 8 weeks of culture

CO <sub>2</sub> (ppm)	No. of leaf	Leaf width (cm)	Leaf thickness (mm)	Length of shoot (cm)	Length of root (cm)	Plant weight (g)
350	14.92 b <sup>2)</sup>	1.21 b	0.83 b	3.57 b	4.85 b	0.74 b
1200	18.92 a	2.94 a	0.97 a	7.09 a	7.99 a	2.76 a

<sup>2)</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P < 0.05.

**Table 5** Effect of carbon dioxide concentrations on chlorophyll contents in *S. tosaense*

CO <sub>2</sub> (ppm)	Chlorophyll contents (mg/g)		
	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll
350	0.91 b <sup>2)</sup>	0.38 b	1.30 b
1200	1.04 a	0.42 a	1.46 a

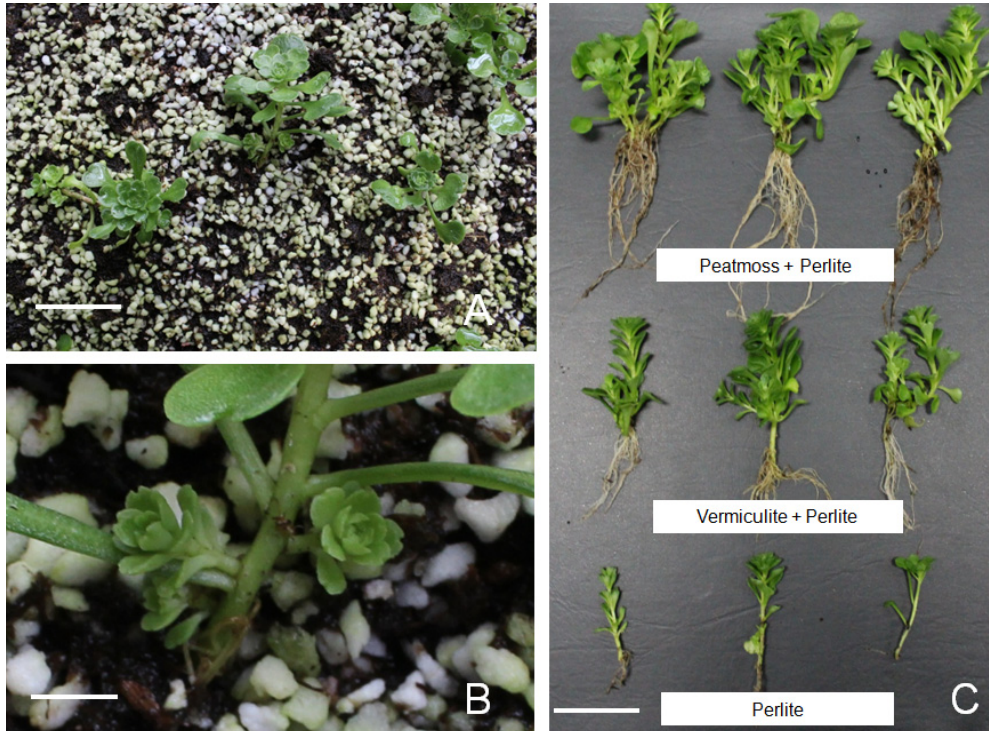
<sup>2)</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P < 0.05.

**Table 6** Effect of several soil on the survival rate and growth from *in vitro* plantlets of *S. tosaense* to soil pot after 12 weeks

Soil construct	Survival rate (%)	Length of shoot (cm)	Length of root (cm)	Plant weight (g)
Peat moss + Perlite (1:1)	100	5.80 a <sup>2)</sup>	11.57 a	3.87 a
Vermiculite + Perlite (1:1)	85	4.15 b	6.52 b	1.96 b
Perlite	65	2.36 c	1.13 c	0.38 c

<sup>2)</sup>Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P < 0.05.





**Fig. 3** Acclimatized plantlets in the pot in *S. tosaense*. A: Acclimatized plantlets in soil after 12 weeks of transplanting, B: Axillary bud shown in transplantation after 12 weeks, C: Growth of root after harvest. Scale bar (A and B: 3 cm, C: 0.5 cm)

생체중을 측정한 결과는 Table 6과 Fig. 3A와 같다. PPS에서는 생존율이 100%로서 이식한 주걱비름 유식물체 20 개체가 모두 토양에 적응하였으며, VPS에서는 85%로 비교적 높은 생존율을 보였다. 그러나 PS는 생존율이 65%로 다른 배양토에 비해 낮은 생존율을 보였는데, 이는 다른 혼합배양토(PPS, VPS)보다 PS가 배수가 잘되어 식물체가 필요한 수분을 충분히 저장할 수 없기 때문인 것으로 사료된다. 난과의 솔나리 토양순화의 경우도 PS의 생존율이 51.9%로 80%이상의 다른 배양토들보다 순화율이 가장 낮았다는 연구보고가 있다(Kim et al. 2001). 줄기와 뿌리의 길이, 생체중도 생존율 결과와 같이 PPS가 가장 높은 결과로 나타났고 이식 후 유묘의 성장도 가장 좋았으며(Fig. 3C), 배양 10주 후부터 새로운 신초가 발생됨을 관찰하였다(Fig. 3B). 반면 PS의 경우 순화 후 고사하지 않고 생존하더라도 줄기 및 뿌리의 길이, 생체중이 가장 저조하였는데(Fig. 3C), 이 역시 관수를 하더라도 배수가 잘되어 기내에서 기외로 이식한 유묘가 환경에 적응하여 성장하는데 다른 배양토보다 오랜 시간이 필요한 것으로 사료된다. 같은 돌나물과의 홍경천의 경우 peat moss와 perlite 혼합 배양토와 perlite 단용 배양토 간의 이식 후 유묘의 생장이 큰 차이가 없었다고 보고하였다(Bae et al. 2012). 이는 주걱비름과 반대되는 결과로 같은 과의 식물이라도 종에 따라 순화 조건이 다를 수 있다는 것을 보여주는 것이다.

**적 요**

본 연구의 목적은 세계적 희귀 및 멸종위기식물인 주걱비름(*Sedum tosaense* Makino)의 잎절편으로부터 식물체 재분화 조건의 탐색과 광독립배양을 통한 원활한 토양순화 체계를 확립하고자 하였다. 성장조절제인 BA와 NAA를 조합한 MS배지에 주걱비름 기내발아 식물체의 잎절편을 배양하였다. 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA와 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA를 혼합하여 처리한 배지가 캘러스 형성율이 100%로 가장 높았으며, 캘러스의 무게도 가장 무거웠다. 또한, 캘러스에서 분화된 신초의 수, 신초의 무게, 배양상태의 견고도에서도 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA와 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA를 혼합하여 처리한 배지가 가장 우수하였다. 주걱비름의 대량증식을 위해 BA와 NAA를 혼합조합한 MS배지에 액아를 포함하는 마디를 배양하였다. 그 결과, 2.0 mg·L<sup>-1</sup> BA와 1.0 mg·L<sup>-1</sup> NAA 혼합한 배지가 신초의 수 7.9개, 신초무게 66.9 mg으로 신초분화에 가장 효과적이었다. 기내발근을 위해 MS배지에 AC 무첨가배지와 2.0 g·L<sup>-1</sup> AC 첨가배지에 배양하였다. 그 결과, 뿌리의 수 85.7개, 뿌리의 길이 4.6cm로 2.0 g·L<sup>-1</sup> AC을 첨가한 배지가 더 효과적이었다. 광독립배양에 의한 순화전처리 시 이산화탄소의 영향을 알아보기 위해 1,200 ppm과 350ppm으로 공급하였다. 그 결과, 1,200 ppm의 CO<sub>2</sub>를 공급해준 처리구가 잎수, 잎폭, 잎두께, 줄기의 길이, 뿌리의 길이, 식물체무게와 엽록소함량이 350 ppm의 CO<sub>2</sub>

를 공급해준 처리구보다 높게 나타났다. 기내에서 재분화된 유식물체의 토양순화는 peat moss와 perlite 혼합배양토에서 생존율이 100%로 가장 높았으며, 가장 양호한 생장을 보였다.

## 사 사

본 연구는 환경부 차세대환경기술개발사업(project no. 052-091-075)의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

- Ahn JH, Lee SY (2004) Effects of growth regulators on callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Sedum sarmentosum*. J Plant Biotechnol 31:25-29
- Anonymus, B (2000) Threatened wildlife of Japan-Red data book (2nd ed.). Japan Wildlife research center, environment agency of Japan, Tokyo
- Bae KH, Ko MS, Kim NY, Song JM, Song GP (2012) *In vitro* propagation and multiple shoot induction of *Rhodiola rosea* L. by axillary bud culture. J Plant Biotechnol 39:114-120
- Bae SJ (2005) Anticarcinogenic and antioxidant effects of *Rhodiola sachalinensis*. Kor Food Sci Nutr 34:1302-1307
- 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 YC, Ahn SY, Lee SG, Han JS, Kim EC, Lee HB, Shin JH, Kim EK, Row KH (2004) Separation and performance test of whitening agent in *Rhodiola sachalinensis*. Kor J Biotechnol Bioeng 19:169-173
- Dumas E, Monteuius O (1995) *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants influence of activated charcoal. Plant Cell, Tissue and Org Cult 40:231-235
- Eymar E, Alegre J, Toribio M, Lopez-vela D (2000) Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63:57-65
- He AM, Wang MS, Hao HY, Zang DC, Lee KH (1998) Hepatoprotective triterpenes from *Sedum sarmentosum*. Phytochemistry 49:2607-2610
- Jeong BR, Lee EJ, Chin HK (1996) Photoautotrophic growth of *Dianthus caryophyllus* and *Limonium* spp. *in vitro* as affected by CO<sub>2</sub> concentration and air exchange rate. J Kor Soc Hort Sci 14:414-415
- Kang TH, Pae HO, Yoo JC, Kim NY, Kim YC, Ko GI, Chung HT (2000) Antiproliferative effects of alkaloids effects from *Sedum sarmentosum* on murine and human hepatoma cell line. J Ethnopharmacol 70:177-182
- Karasawa K (1966) On the media with banana and honey added for seed germination and subsequent growth of orchid. The Orchid Review 32:313-318
- Kim CY, Lee MY, Park IS (2006) Antioxidant activities of fractions from *Sedum sarmentosum*. J Food Sci Nutr 11:6-9
- Kim HK, Lim JD, Hyun TK, Lee HY, Lee JH, Yu CY (2001) *In vitro* culture and acclimatization of regenerated plants of *Lilium cernum* Komarow. Kor J Medicinal Crop Sci 9:310-317
- Kim MY (2003) The effects of *Sedum sarmentosum* Bunge on collagen content of connective tissues in ovariectomized rats. Kor Food Sci Nutr 32:1114-1119
- Koroch A, Juliani HR, Kapteyn J, Simon JE (2002) *In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants. Plant Cell, Tissue and Org Cult 69:79-83
- Kwon HK, Yoon ES (2010) Effect of plant growth regulators on plant regeneration from the *Sedum rotundifolium* D. Lee. J Plant Biotechnol 37:84-88
- Kwon ST, Jeong JH (1999) Genetic relationship among *Sedum* species based on morphological characteristics and RAPD analysis. Kor J Hort Technol 17:490-494
- Kozai T (1991) Photoautotrophic micropropagation. *in vitro* cellular and developmental. Biology-Plant 27:47-51
- Lee SH, Lee SG, Kang HD (2011a) Conservation of an endangered species of *Lilium cernum* Komarow. through *in vitro* mass-propagation. Kor J Medicina Crop Sci 19:9-15
- Lee YM, Bae HB, Jung HY, Kim JH, Park DS (2011b) Antioxidant activity in water and methanol extract from Korean edible wild plants. J Food Sci Nutr 40:29-36
- Lian ML, Murthy HN, Paek KY (2002) Culture method and photosynthetic photo flux affect photosynthesis, growth and survival of *Limonium* 'Misty Blue' *in vitro*. J Kor Soc Hort Sci 95:239-249
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Meth Enzymol 148:350-382.
- Lisowska K, Wysokinska H (2000) *In vitro* propagation of *Catalpa ovata* G. Don. Plant Cell, Tissue and Org Cult 60:171-176
- Moon HK, Suk GY, Kim SC (1997) Micropropagation of a rare species, *Forsythia saxatilis* N. through tissue culture. J Kor For Soc 86:430-434
- Moon HK, Suk GY, Kwon YJ, Son SH (1999) Micropropagation of a rare species, *Abeliophyllum disticchum* Nakai. via axillary bud culture. Kor J Plant Tiss Cult 26:133-136
- Moon HK, Noh EW, Ha YM, Shim KK (2002) Micropropagation of juvenile and mature tree of *Corylopsis coreana* by axillary bud culture. Kor J Plant Tiss Cult 29:117-121
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-479
- Oh H, Kang DG, Kwon JW, Kwon TO, Lee SY, Lee DB, Lee HS (2004) Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum*. Biol Pharm Bull 27:2035-2037
- Pan MJ, van Staden J (1998) The use of charcoal in *in vitro* culture-a review. Plant Growth Regulator 26:155-163
- Park KU, Yoon JH, Kim JY, Jeong CHg, Park CK, Song WS, Seo KI (2005) Biological activity of the fractions extracted from *Rhodiola dumulosa*. J Kor Food Preserv 12:496-500



- Park SY, Moon HK, Kim YW (2011) The photoautotrophic culture system promotes photosynthesis and growth of somatic embryo-derived plantlets of *Kalopanax septemlobus*. J Kor For Soc 100:212-217
- Park YJ, Kim MH, Bae SJ (2002) Enhancement of anticarcinogenic effect by combination of *Sedum sarmentosum* Bunge with *Platycodon grandiflorum* A. extracts. Kor Soc Food Sci Nutr 31:136-142
- Ryu JH, Doo HS, Kwon TH (1992) Induction of haploid plants by anther culture in sesame (*Sesamum indicum* L.). Kor J Plant Tiss Cult 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 acetyltransferase) gene relative to chilling tolerance. Kor J Plant Biotech 29:85-92
- Shon YG, Kim SR, Park JC (1997) Photoautotrophic growth of *Gerbera jamesonii* *in vitro* as affected by PPF, CO<sub>2</sub> and sucrose concentration. Kor J Hort Sci 15:640-642
- Sim KS, Kim JH, Lee BC, Lee DH, Lee GS, Pyo HB (2008) Inhibitory effects on melanin production in B16 melanoma cells of *Sedum sarmentosum*. Yakhak Hoeji 52:165-171
- Song GP, Song KH, Song HJ, Kim CS, Kim MH (2004) An unrecorded species in Korean flora: *Sedum tosaense* Makino (Crassulaceae). Kor J Pl Taxon 34:365-370
- Skoog F, Strong FM, Miller CO (1965) Cytokinins. Science 148:532-533
- Woo ER, Yoon SH, Kwak JH, Kim HJ, Park H (1997) Inhibition of gp 120-CD4 interaction by various plant extracts. Phyto-medicine 4:53-58
- 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
- Yoon JY, Nam YK, Lee JS, Kim HJ (2010) Effects of media and temperatures on micro stem cutting of *Dendrobium nobile* 'Hamana lake dream' X 'No. 55' *in vitro*. Journal of Agriculture & Life Science 44:23-30
- Ziv M (1995) *In vitro* acclimatization. In: J. Aitken-Christie, T. Kozai, M. Lila Smith (eds.), Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, P 493-516, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Zobayed SMA, Afreen F, Xiao Y, Kozai T (2004) Recent advancement in research on photoautotrophic micropropagation using large culture vessels with forced ventilation. In Vitro Cell Dev Biol Plant 40:450-458