

바위솔의 줄기組織으로부터 植物體 再分化

최상욱² · 남상해² · 양기종² · 조무제^{1,3} · 양민석^{1,2}

¹경상대학교 식물분자생물학 및 유전자조작연구소(SRC), ²경상대학교 농과대학 농화학과,

³경상대학교 자연과학대학 생화학과

Plant Regeneration from the Stem Tissue of *Orostachys japonicus* A. Berger

Sang Uk CHOI², Sang Hae NAM², Gi Jong YANG², Moo Je Cho^{1,3}, and Min Suk YANG^{1,2}

¹Plant Molecular Biology & Biotechnology Research Center (PMBBRC);

²Department of Agricultural Chemistry; and ³Department of Biochemistry,

Gyeongsang National Univ., Chinju, 660-701. *Corresponding author.

Plant regeneration from the stem tissue of *Orostachys japonicus* A. Berger was investigated. The calli derived from shoot apex when cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 4 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2 mg/L benzyl aminopurine (BAP). The calli were developed into shoot to MS medium with 0.5 mg/L NAA and 2 mg/L BAP and into root with 1 mg/L 2,4-D and 1 to 3 mg/L kinetin. The reddish pigment which might be essential for the root regeneration was observed in the tip of regenerated root.

Key words: reddish pigment, root regeneration

사람들은 건강유지를 위해 갖가지 수단과 방법을 쓰고 있지만 무엇보다도 지구상에 자생하고 있는 綠色植物이 함유하고 있는 生藥이야말로 인체에 큰 도움을 주는 원료로 사용될 수 있다. 사람들의 식생활이 동물성에서 식물성으로 바뀌어 감에 따라 자연식품을 채취하여 인간의 건강과 질병치료에 이용한다는 것은 매우 중요한 일이다. 藥用植物로부터 天然生理活性物質을 검색하려는 연구가 활발히 진행되고 있는 가운데 특히 노화방지물질과 抗癌物質에 대한 관심이 고조되어 이들 식물들을 이용한 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 야생 藥用植物들은 재배가 까다롭거나 생육에 많은 환경적 제약을 받기 때문에 조직배양에 의한 細胞의 大量增殖 또는 有效成分 生産(Heyenga et al., 1990)을 시도하고 있다. 이러한 조직배양은 자원식물의 개체보존, 우량품종개발, 무병주의 생산(Rech and Pires, 1986) 및 기내배양을 통한 대량증식(Tsay et al., 1989)을 가능하게 하고 있다.

돌나물과(Crassulaceae)에 속하는 바위솔(*Orostachys japonicus* A. Berger)은 집웅지기 또는 瓦松이라 불리기도 하는 다년생 草本植物로서 높이는 약 30cm에 달하며 잎은 살이 많고 피침형이며 끝이 뾰족하고 녹색이나 자색을 띠는 것도 있다. 꽃은 백색으로 9월에 피며 총상화서로 정생한다. 한방에서는 청열해독, 지혈, 이습, 소종 등에 사용되며, 민간요법으로 대장암 등의 치료에 이용되어 왔다. 따라서 본 연구에서는 바위솔의 二次代謝產物을 생산하기 위하여 조직 부위별로 培養을 시도하여 완전한 식물체를 얻었으므로 그 결과를 보고한다.

材料 및 方法

본 실험에 사용한 바위솔(*Orostachys japonicus* A. Berger)은 1991년 9월에 慶州市 일원의 古家의 기와지붕 위에 자생

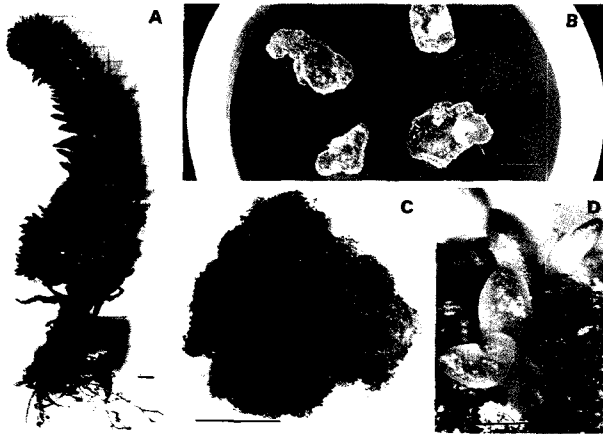


Figure 1. The callus formation from the stem of *O. japonicus* A. Berger. A. The whole plant of *O. japonicus* A. Berger. B, C. The callus induced on the MS medium supplemented with 2 mg/L BAP and 4 mg/L 2,4-D for 4 weeks after culture. D. The shoot regenerated from the stem callus for 10 weeks. Bars: 1 cm.

하고 있는 것을 서리가 내리기 전에 채취하여 동정한 후 잎, 줄기, 화주를 각각 분리하여 재료로 사용하였다(Fig. 1A).

조직배양을 위한 재료는 70%(v/v) 에칠알콜에 1분, 3%(v/v) 차아염소산소다에 3분간 침지하여 表面殺菌하였으며, 멸균 증류수로서 3~4회 표면에 묻은 약품을 세척하였다. MS培地를 기본으로 표1과 같이 성장조절제를 첨가한培地를 10ml씩 petridish에 분주하였다. 여기에 살균된 재료를 2×2 mm정도의 크기로 잘라 petridish당 4~5분씩 치상 하루 중 16시간의 일장과 26°C의 온도가 자동으로 조절되는 항온실에서 배양하여 캘러스를 유기시켰으며, 3주후 유기된 캘러스는 동일한培地조성으로 증식시켰다. 줄기와 뿌리형성을 위하여 증식된 캘러스를 표2와 같이 성장조절물질을 첨가한培地에 置床하여 캘러스유기와 동일한 조건에서 배양하였다. 모든 실험은 3회 반복실험하였으며, 형성된 캘러스와 유기된 줄기 및 뿌리의 수를 헤아려서 전체 치상수에 대한 백분율로 나타내었다.

結果 및 考察

캘러스 誘起

약용식물로부터 이차대사산물의 생산은 식물체의 조직을 이용한 배양체계가 우선적으로 확립되어야 한다. 따라서 민간한방에서 항암제로 이용되고 있는 바위솔을 개화 직전에 채취하여 여러가지 식물생장호르몬을 조합한培地를 사용

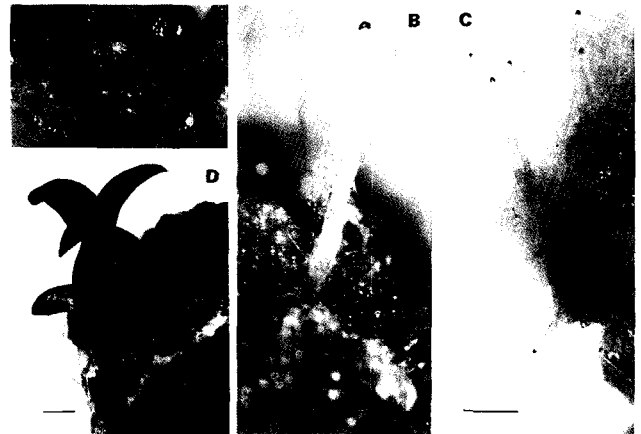


Figure 2. The plant regenerated from the stem of *O. japonicus* A. Berger. A. The reddish pigment formed around shoot regeneration for 10 weeks. B, C. The root regenerated from the stem callus for 10 weeks. D. The plant regeneration from the stem callus for 14 weeks. Bars: 5 mm.

하여 잎, 줄기 및 화주조직으로부터 캘러스 유기를 시도 하였으나, 잎 조직으로부터는 캘러스를 유기시키지 못하였다. MS培地를 기본으로하여 4 mg/L 2,4-D과 1~2 mg/L BAP를 조합처리하였을 때, 줄기조직으로부터는 66~83%, 화주조직으로부터는 55~70%의 캘러스가 형성되어 가장 효과적인 것으로 나타났다(Table 1). 바위솔 줄기로부터 캘러스 유기에 대한 kinetin의 효과는 1 mg/L kinetin을 첨가한培地에서는 캘러스가 전혀 형성되지 않았으나, 2 mg/L kinetin을 첨가하였을 때 20~30%정도의 캘러스 유기율을 나타내었다. 이 결과는 마타리과에 속하는 *Valeriana wallichii*의 엽맥조직의 캘러스형성 최적조건으로 0.25 mg/L kinetin과 3 mg/L IAA를 첨가했을 때(Mathur et al., 1991) 보다 높은 농도의 kinetin을 요구하는 것으로 나타났다.

바위솔과 유사한 다육식물인 *Mesembryanthemum*의 부위별 배양에서 재분화율은 배측(23-34%), 자엽(21-41%) 및 마디와 잎(0-11%)으로 나타난 결과와 비교해 보면 다육질 식물의 조직배양에는 줄기나 배측부위에서 캘러스형성이 잘 되는 것으로 생각된다. 이 때 형성된 캘러스의 외형적 특징은 화주로부터 유기된 캘러스보다 줄기로부터 유기된 캘러스가 훨씬 왕성한 성장을 보여 주었다(Fig. 1B, C). 따라서 이 조건으로 植物體 再分화를 위한 캘러스 계대배양을 계속하였다.

植物體 再分화

바위솔의 줄기조직으로부터 유기된 캘러스를 0.1~1 mg/L NAA와 2~5 mg/L BAP, 0.5~1 mg/L 2,4-D와 1~3

Table 1. Effects of the growth regulators on the callus formation from *O. japonicus* B. incubated for 4 weeks.

Growth regulator (mg/L)	Stem				Style			
	1	2	3	Mean±SD	1	2	3	Mean±SD
2,4-D(2)+NAA(2)+K(2) ^a	9/30	10/30	11/30 ^b	10.0±0.8 ^c	6/30	4/30	8/30	6.0±1.6
2,4-D(4)+BAP(1)	20/30	21/30	19/30	20.0±0.8	16/29	19/30	14/30	16.3±2.1
2,4-D(4)+BAP(2)	25/30	22/28	24/27	23.7±1.2	19/30	21/30	22/29	20.7±1.2
2,4-D(4)+PC(1)	6/28	5/26	6/25	5.7±0.5	5/29	6/28	4/30	5.0±0.8
2,4-D(4)+PC(2)	6/26	6/27	6/28	6.0±0.0	6/29	5/28	4/26	5.0±0.8
2,4-D(1)+PC(2)	0/30	0/30	0/29	0.0±0.0	0/30	0/29	0/29	0.0±0.0
2,4-D(2)+PC(2)	1/30	0/30	2/30	1.0±0.8	0/30	0/30	0/30	0.0±0.0
2,4-D(5)+PC(2)	12/29	9/29	11/30	10.7±1.2	7/28	6/27	6/30	6.3±0.5
2,4-D(3)+BAP(2)	9/29	12/29	11/30	10.7±0.8	5/29	6/29	7/30	6.0±0.8
2,4-D(2)+BAP(2)	7/30	9/30	8/30	9.0±0.8	7/29	4/25	6/30	5.7±1.2
2,4-D(2)+IAA(2)+K(2)	6/29	4/26	5/27	5.0±0.8	4/28	6/29	5/28	5.0±0.8

^a The number in the parenthesis behind growth regulator indicate the concentration of the growth regulator to MS basal medium.

^b These data indicate the regenerated number per an inoculated-individual number. ^c Standard deviations (±) with three replicates.

Table 2. Effects of the growth regulators on the shoot and root regeneration of *O. japonicus* B. callus incubated for 6 weeks.

Growth regulator (mg/L)	Shoot				Root			
	1	2	3	Mean±SD	1	2	3	Mean±SD
NAA(0.1)+BAP(2) ^a	12/41 ^b	9/34	12/38	11.0±1.4 ^c	- ^d	-	-	
NAA(0.1)+BAP(3)	15/39	16/44	12/35	14.3±1.7	-	-	-	
NAA(0.1)+BAP(4)	10/45	10/42	11/40	10.3±0.5	-	-	-	
NAA(0.1)+BAP(5)	1/39	0/39	2/39	1.0±0.8	-	-	-	
NAA(0.5)+BAP(2)	17/39	17/39	20/40	18.0±1.4	-	-	-	
NAA(0.5)+BAP(3)	11/38	11/42	12/38	11.3±0.5	-	-	-	
NAA(0.5)+BAP(4)	6/40	9/45	10/40	8.3±1.7	-	-	-	
NAA(0.5)+BAP(5)	6/45	7/40	4/45	5.7±1.2	-	-	-	
NAA(1)+BAP(2)	9/41	6/40	8/44	7.7±1.2	-	-	-	
NAA(1)+BAP(3)	4/42	5/41	6/41	5.0±0.8	-	-	-	
NAA(1)+BAP(4)	3/37	5/41	4/40	4.0±0.8	-	-	-	
NAA(1)+BAP(5)	3/38	5/38	7/38	5.0±1.6	-	-	-	
2,4-D(1)+K(1)	1/28	1/25	2/30	1.3±0.5	1/28	2/30	1/30	1.3±0.5
2,4-D(1)+K(2)	1/28	1/30	2/30	1.3±0.5	1/28	2/30	1/30	1.3±0.5
2,4-D(1)+K(3)	1/28	1/30	2/30	1.3±0.5	1/28	2/30	1/30	1.3±0.5
2,4-D(0.5)+K(3)	5/27	6/26	7/26	6.0±0.8	-	-	-	

^a The number in the parenthesis behind growth regulator indicate the concentration of the growth regulator to MS basal medium.

^b These data indicate standard deviations when the experiments carried out three replications.

^c Standard deviations(±) three replicates. ^d No regeneration.

mg/L kinetin을 조합하여 첨가한 배지에 치상하여 식물체 재분화를 시도하였다(Table 2). 유기된 캘러스를 배지에 치상하여 캘러스유기시와 동일한 조건으로 약 6 주간 배양하였다. 줄기는 모든 배지에서 형성되었는데(Table 2, Fig.

1D), 특히 0.5 mg/L NAA와 2~3 mg/L BAP를 첨가한 배지에서 28~45%의 줄기 분화율을 나타내었으며, 뿌리는 1 mg/L 2,4-D와 1~3 mg/L kinetin을 첨가한 배지에서만 5%의 분화율을 나타내어 2,4-D가 첨가되지 않은 배지에서는

뿌리가 형성되지 않았다. 이것은 Suh와 Park(1988)이 마늘의 화기조직배양에서 2,4-D를 첨가하지 않은 배지에서 뿌리가 발생하지 않은 것과 유사한 결과였다. 뿌리의 형성을 높이기 위하여 2,4-D의 적정농도에 대한 연구가 계속되어야 할 것이다.

특히 줄기가 생성되는 캘러스 중에는 특정부위가 붉은 색으로 침적되는 현상이 나타나고 있었으며, 이 부근에서만 뿌리가 형성되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2A). 그래서 뿌리를 자세히 관찰한 결과 뿌리 끝부위가 붉은 색을 띠고 있는 것을 알았다(Fig. 2B와 C). 이것은 바위솔에서 고유의 물질이 생성되고 있는 것으로 여겨진다. 그림 2D에서 보는 바와 같이 줄기와 뿌리가 형성된 캘러스를 신선한 배지에 옮겨 약 4주간 배양하였을 때 완전한 식물체로 분화시킬 수 있었다. 덧붙여서 바위솔의 성분과 관한 연구로는 최근에 Park등(1991b)이 외송의 알코올 추출물에서 7종의 triterpenoid로서 glutinone, friedelin, β -amyrin, glutinol, *epi*-friedelanol, 5-isopropyl-10(2-methoxycarbonylethyl)-des-A-olean-12-en과 5-isopropyl-10(2-methoxy-carbonylethyl)-des-A-olean-14-en, sterol로서 campesterol과 sitosterol 및 10종의 fatty acid ester를 분석하였으며, 9종의 flavonoid를 보고하였다. Alkaloid에 관한 연구로는 저자 등이 배양중에 성분의 변화를 보고하였을 뿐이다(Yang and Choi, 1992). 또한 민간요법에서 이용되고 있는 항암성에 관한 연구로는 MeOH 추출물이 aflatoxin에 의한 돌연변이 유발성을 크게 감소시킨다(Park et al., 1991a)는 보고외에는 거의 없는 실정이다. 따라서 앞으로 본 연구의 결과가 바위솔의 조직배양에 의한 이차산물 생산연구에 활용되어져야 할 것으로 생각된다.

摘 要

한방에서 항암제로 사용되고 있는 약용식물들로부터 이차대사산물을 생산하기 위한 시도로써 바위솔의 조직배양을 시도하였다. 바위솔의 부위별 조직, 즉 잎, 줄기 및 화주 조직을 이용하여 캘러스 유기를 시도하였다. 줄기조직과 화주조직에서는 캘러스가 유기되었으나 잎 조직으로부터는 캘러스가 유기되지 않았다. 따라서 캘러스 유기가 가장 왕성하게 일어나는 줄기조직으로부터 유기된 캘러스를 이용하여 식물체 재분화를 시도하였다. 캘러스 유기에는 MS배지에 4 mg/L 2,4-D와 2 mg/L BAP를 첨가하였을 때 가장 효과적이었으며, 잎 조직으로부터는 캘러스형성이 되지 않았다. 식물체 재분화에 있어서 줄기분화는 NAA 0.5 mg/L와 BAP 2 mg/L를 첨가한 배지에서 가장 높은 분화율을 나타내었으며, 뿌리형성은 2,4-D 1 mg/L와 kinetin 1~3 mg/L를 첨가한 배지에서만 5%의 분화율을 나타내었다. 뿌리형성에 대한 2,4-D의 적정 농도에 대한 연구 및 뿌리 발

생시 생성되는 赤色物質의 규명에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다. 완전한 식물체로 재분화가 일어나는 데는 약 14주의 기간이 소요되었다.

射 謝

본 연구는 1991년도 한국과학재단지원 식물분자생물학 및 유전자조작연구소(PMBBRC) 연구조성비의 지원에 의해 수행되었음.

引用 文 獻

- Heyenga AG, Lucas JA, and Dewick PM (1990) Production of tumor-inhibitory lignans in callus cultures of *Podophyllum hexandrum*. Plant Cell Rep 9: 382-385
- Mathur J and Ahuja PS (1991) Plant regeneration from callus cultures of *Valeriana wallichii* DC. Plant Cell Rep 9: 523-526
- Meiners MS, Thomas JC, Bohnert HJ, and Cushman JC (1991) Regeneration of multiple shoots and plants from *Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Cell Rep 9: 563-566
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-479.
- Park HJ, Moon SH, Park KY, Choi JS, Chung HY, Young HS, Suh SS (1991a) Antimutagenic effect of *Orostachys japonicus* A. Berger. J Pharmaceutical Society of Korea 35: 253-257
- Park HJ, Young HS, Kim JO, Rhee SH, and Choi JS (1991b) A study on the chemical constituents of *Orostachys japonicus* A. Berger. Kor J Pharmacogn. 22: 78-84
- Ratushnyak YI, Rudas VA, and Piven NM (1990) Regeneration of *Lycium barbarum* L. plants from leaf tissue, callus culture and callus protoplasts. Plant Cell Rep 9: 84-87
- Rech EL, Pires MJ (1986) Tissue culture propagation of *Mentha* spp. by the use of axillary buds. Plant Cell Rep 5: 17-18
- Yang MS, Choi SU (1992) Some biochemical component changes during the culture of *Orostachys japonicus* A. Berger. Korean J Plant Tissue Culture 9: 209-212
- Suh SK, Park HG (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration from flower organ culture of garlic (*Allium sativum* L.). Korean J Plant Tissue Culture 15: 121-132
- Tsay HS, Gau TG, Chen CC (1989) Rapid clonal propagation of *Pinellia ternata* by tissue culture. Plant Cell Rep 8: 450-454
- Yam TW, Hsu GI, and Arditti J (1990) Plant regeneration in vitro of South Pacific taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta* cv Akalomamale, Araceae). Plant Cell Rep 9: 229-232

(1993년 1월 20일 접수)