

참나물 (*Pimpinella brachycarpa*)의 體細胞胚 發生에 의한 植物體 大量增殖

文興奎* · 尹陽 · 李錫求
林木育種研究所 生物工學研究室

Rapid Micropropagation of *Pimpinella brachycarpa* via Somatic Embryogenesis

Heung Kyu MOON*, Yang YOUN, and Suk Koo LEE
Forest Biotechnology Lab., Forest Genetics Research Institute
Suwon P.O. Box 24, Kyongido 441-350. *Corresponding author.

Attempts were made to regenerate plants from petiole explants of *Pimpinella brachycarpa* via repetitive somatic embryogenesis. Effective induction of somatic embryogenesis was achieved on both MS and modified B₅ (mB₅) media containing BA + 2,4-D or BA + 2,4-D + NAA under light condition (16-h photoperiod/day) cultures. The explants exposed to the light produced numerous somatic embryos while those kept under the dark did not form any on the same medium. Somatic embryos at different developmental stages were observed to arise within a individual explants. Plantlets could be regenerated on mB₅ basal medium or mB₅ containing 0.1 mg/L NAA. Secondary adventive embryos were formed on the surface of the somatic embryos. Therefore, repetitive somatic embryogenesis could be achieved by secondary embryogenesis. Although the treatment of 2,4-D or NAA alone was effective in callus formation and growth, but not in induction of somatic embryogenesis. Some explants, cultured on NAA-containing media in darkness, produced only adventive roots. The embryogenic potential was maintained for two years when subcultured to BA and 2,4-D containing media with 5 weeks interval. Regenerated plantlets were maintained on mB₅ or MS basal media for 4 to 6 more weeks and transferred to soil of an artificial mixture for acclimation. Most plantlets (more than 97%) survived, and grew without any deformity.

Key words: callus culture, plant regeneration, somatic embryo

참나물은 산형과에 속하는 식물로서 다년생 숙근초이고, 전국 산야의 음지에 주로 분포한다. 꽃은 6-8월에 개화하고 백색이며 초장은 50-80 cm에 달하며 열매는 10월에 성숙한다. 이 식물은 추위와 건조에 견디는 힘이 크며, 단일성 식물이고, 줄기전체에 털이 없고 잎에 향기가 나는 특징이 있다(Lee, 1989). 어린 줄기와 잎은 나물, 생식, 김치 등 식품으로 이용되고, 지혈, 해열, 증풍 등 약용에도 효과가 크다. 약효를 내는 주성분은 anethole, isopimpinellin이라는 물질이다.

최근 급속한 경제발전으로 산업화가 가속화 됨에 따라

산업재해 등 공해문제가 심각해지고 있으며, 이와 더불어 아황산 가스, 산성우 등의 오염물질의 증대, 화학비료와 농약의 과다 사용 등으로 인해 무공해 자연 식품에 대한 사회적 요구도가 크게 점증되고 있다. 참나물은 전통적으로 우리 국민이 애호해온 미식식물로서 예전에는 소 등의 가축의 사료로서도 이용 될 수 있었으나, 오늘날에는 이 식물의 생태계가 거의 파괴되어 이제는 심산에서나 찾아 볼 수 있는 정도가 되었다. 또한 아직까지 번식기법이 확립되지 않아서 이 식물의 유전자원 보존이라는 측면에서도 적절한 번식기법의 개발이 매우 시급한 실정에 있다.

외국에서는 우리나라의 참나물과 유사한 산형과의 anise 라는 식물을 재료로 조직배양에 의한 번식 및 유용물질의 생산연구를 계속해오고 있으며(Ernst and Oesterhelt, 1985; Huber et al., 1978; Kudielka et al., 1983; Kudielka and Theimer, 1983; Lutzenberger and Theimer, 1983), 수편의 연구결과가 발표된 바 있으나 아직까지 국내에서 참나물에 관한 기내배양 연구는 보고된 바 없다. 본 연구에서 체세포 배 발생에 의한 기내 대량증식법이 개발 되었기에 보고한다.

재료 및 방법

강원도 평창에서 식물체를 채취하여 온실에서 육성하였다. 신초의 액아를 재료로 MS+BA 0.2 mg/L 배지에 아배양을 실시하여 무균의 식물체를 유도하였다. 이 식물체를 성장조절물질이 첨가되지 않은 MS 기본배지에서 1년 이상 계대배양한 다음 엽병을 절편으로 본 실험에 사용하였다. 절편은 예리한 해부용 칼로 3-5 mm의 크기로 횡단하여 절단면이 배지에 접촉되도록 치상하였다. 배지는 MS (Murashige and Skoog, 1962)와 다소 변형된 B5 (mB5) 배지를 기본으로 하였다(Gamborg et al. 1968). mB5배지는 기본 배지에 KCl을 150 mg/L 첨가하고, NaH₂PO₄는 300 mg/L, thiamine · HCl은 2.0 mg/L로 조정하여 사용하였다. 함유된 식물성장 조절물질의 조합 및 농도는 Table 1과 같다.

고체배지(0.2% Gelite) petri dish (8×15 mm)당 5개의 절편을 치상하였으며 처리당 4반복 (5×4)으로 하였다. 초대

배양은 약 3,000 Lux의 냉백색 형광등하에서 1일 16시간 조명하거나 암상태로 배양하였다. 온도는 25±2°C로 유지하였다. 4주 후에 기본배지나 NAA가 저농도로 첨가된 배지 (Table 1)에 계대배양하여 16시간 일장하에서 배양하면서 배발달 여부를 관찰하였다. 체세포배로부터 재생된 식물체는 mB5 및 MS 기본배지에서 배양하였다.

결과 및 고찰

초대배양으로 4주간 배양하고, 2차 배지로 계대배양하여 6주간 배양한 결과는 Table 2와 같다. 절편은 배양 1주 이내에 부풀어 오르고 절단면에서 캘러스가 형성되기 시작하였다. 캘러스의 형성은 0.5 mg/L 2,4-D를 단독 첨가한 조건에서 양호하였으며, 생장은 암배양의 조건에서 더 양호하였다. 2,4-D가 단독으로 첨가된 배지의 캘러스는 수분을 많이 함유하고 부서지기 쉬운 상태로 성장하였다. 반면 2,4-D와 다른 성장조절 물질이 조합 첨가된 조건의 캘러스는 조성이 단단하고 색깔은 연한 회색과 백색을 띠는 것이 많았다. 2차 배지로 계대배양하여 3주 경과 후부터 초기의 체세포 배가 관찰되었다(Figure 1A). 체세포배가 관찰된 배발생의 캘러스는 노란색과 투명한 백색을 띠어 육안으로도 비배발생의 캘러스와 구별할 수 있었다. 2차 배지에서 6주 이상 배양하면 어느 배지에서나 초기의 체세포배가 관찰되었지만 초대배양시 암배양 한것은 명배양 한것보다 매우 저조한 체세포배 형성률을 나타냈다(Table 2).

체세포배의 발달단계는 배지에 따라 다양하였고, 절편에 따른 차이 또한 매우 크게 나타났으며, 동일한 절편에서도 초기의 구형에서 배축이 신장된 자엽단계까지 다양하게 관찰되었다(Figure 1B). 배양기간이 지속되면 체세포배는 발아되어 정상 식물체로 재생되었다. 재생되는 식물체는 주로 배지와 직접 접촉이 안된 곳에서 이루어 졌고, 배지와 접촉된 곳에서 배발생한 캘러스는 계속 캘러스화 하거나 비정상형의 식물체로 발달되는 것이 많았다. 식물체의 재생은 초대배양시 암배양 된 것에서 다소 양호하였으나, 재생빈도 및 식물체수는 명배양 된 것에서 더 높았다(Table 2).

빛의 유무는 성장조절 물질의 반응에 크게 영향을 미쳤는데, 명배양 하에서 초대배양시 0.5 mg/L 2,4-D가 첨가된 MS 및 mB5 배지에서 100%의 체세포배 형성률을 보인 반면, 암배양 조건에서는 전혀 형성되지 않았다. 이러한 결과는 광조건에 따른 식물성장 조절물질의 반응이 매우 다르다는 것을 시사하는 것이다. Hakman과 Arnold(1985)는 Norway spruce의 배양에서 체세포배로부터의 식물체의 재생은 암배양의 조건에서만 이루어 졌고, von Arnold와 Eriksson(1979)는 이 수종의 기내배양에서 부정아로부터의 식물체의 재생에는 광조건으로 배양하는 것이 필수적이라

Table 1. The media used to induce somatic embryogenesis in *Pimpinella brachycarpa*.^a

Primary culture		Subculture	
Medium	Phytohormones (mg/L)	Medium	Phytohormones (mg/L)
MS	1. 0.1 BAP+0.5 2,4-D		
	2. 0.1 BAP+0.5 2,4-D+0.5 NAA		
	3. 0.5 2,4-D	1. MS	+ 0.0 NAA
	4. 0.5 NAA	2. MS	+ 0.1 NAA
mB5	5. 0.1 BAP+0.5 2,4-D	3. mB5	+ 0.0 NAA
	6. 0.1 BAP+0.5 2,4-D+0.5 NAA	4. mB5	+ 0.1 NAA
	7. 0.5 2,4-D		
	8. 0.5 NAA		

^aPetiole explants were cultured on primary culture media for 4 weeks, and then subcultured.

Table 2. Effect of different media on somatic embryogenesis from petiole explants of *Pimpinella brachycarpa*.^a

Media and phytohormones ^b		% embryoid formation		No. of embryoids per explant		Developmental stage ^c	
1st medium	Subculture medium	Light ^d (dark)		Light ^d (dark)		Light ^d (dark)	
1	1	50	(25)	1-5	(0-1)	G, H	(G)
2	1	25	(0)	0-1	(0)	G	(-)
3	1	100	(0)	10-30	(0)	G	(-)
4	1	0	(0)	-	(0)	-	(-)
5	1	25	(30)	0-5	(0-3)	G, T, PR	(G, T, PR)
6	1	0	(40)	-	(0-3)	-	(G, T, PR)
7	1	100	(0)	10-30	(0)	G	(-)
8	1	0	(10)	-	(0-1)	-	(G)

1	2	0	(80)	-	(0-4)	-	(G)
2	2	35	(80)	0-2	(0-10)	G, T	(G, T, PR)
3	2	100	(0)	10-30	(0)	G	(-)
4	2	25	(40)	0-5	(0-10)	G	(G, H, T)
5	2	75	(40)	0-3	(0-2)	G, T	(T, PR)
6	2	50	(10)	0-2	(0-2)	G	(G)
7	2	100	(0)	10-35	(0)	G	(-)
8	2	0	(10)	-	(0-1)	-	(G)

1	3	80	(0)	10-35	(0)	G, T, PR	(-)
2	3	25	(80)	0-7	(0-12)	G, T	(G, T, PR)
3	3	100	(0)	10-30	(0)	G	(-)
4	3	25	(0)	0-6	(0)	G	(-)
5	3	50	(40)	5-10	(0-2)	G, H, T	(G, T)
6	3	50	(30)	2-8	(0-2)	-	(G, T)
7	3	100	(0)	10-35	(0)	G, H, T	(-)
8	3	0	(0)	-	(0)	-	(-)

1	4	100	(20)	10-30	(0-2)	G, T, PR	(G, T)
2	4	75	(40)	1-5	(0-3)	G	(G, T)
3	4	100	(0)	10-30	(0)	G	(-)
4	4	25	(0)	0-2	(0)	G, T, C	(-)
5	4	100	(30)	3-8	(0-2)	G, T, C	(G, T, PR)
6	4	100	(40)	2-5	(0-2)	G	(G)
7	4	100	(0)	10-30	(0)	G	(-)
8	4	0	(10)	-	(0-2)	-	(G, T)

^aTwenty explants per medium were cultured. ^bMedia and phytohormones designated as in Table 1. ^cG: globular, H: heart, T: torpedo, C: cotyledonary stage, and PR: plant regeneration. ^dLight: The explants were exposed to 16h/d photoperiod with 3,000 lux. Dark: The explants were kept without any light.

하여 적절한 배양조건 하에서도 광조건에 따라 식물체의 재생경로가 매우 다름을 관찰하였다. 또한 black spruce (Tremblay and Tremblay, 1991)의 배양에서도 광조건에 따라 체세포배의 발아 및 성숙이 다르며, *Pinus taeda*(Gupta and Durzan, 1987)의 배양에서는 체세포배의 발아 및 생장은 연속광의 조건에서 가능하다고 하여 광조건에 따른 서로 다른 결과를 나타냄을 시사하였다. 이러한 결과들은 광조건에 따라 적절한 성장조절물질의 선택이 필요함을 시사

하는 결과이다.

한편 0.5 mg/L NAA를 단독으로 첨가하여 암배양 하였을 때 2차 배지에서 배양기간이 경과함에 따라 절편의 표면으로부터 부정근이 발생되었다. 부정근의 발생은 배양 6주 후 MS와 mBs 배지에서 각각 31%와 49%이었다.

2차 배지로 계대배양하여 14주간 연속 배양한 후에는 어느 배지 조건에서나 체세포배의 형성이 가능하였다. 체세포배는 표면이 캘러스화 되면서 배발생되거나, 체세포배의 표

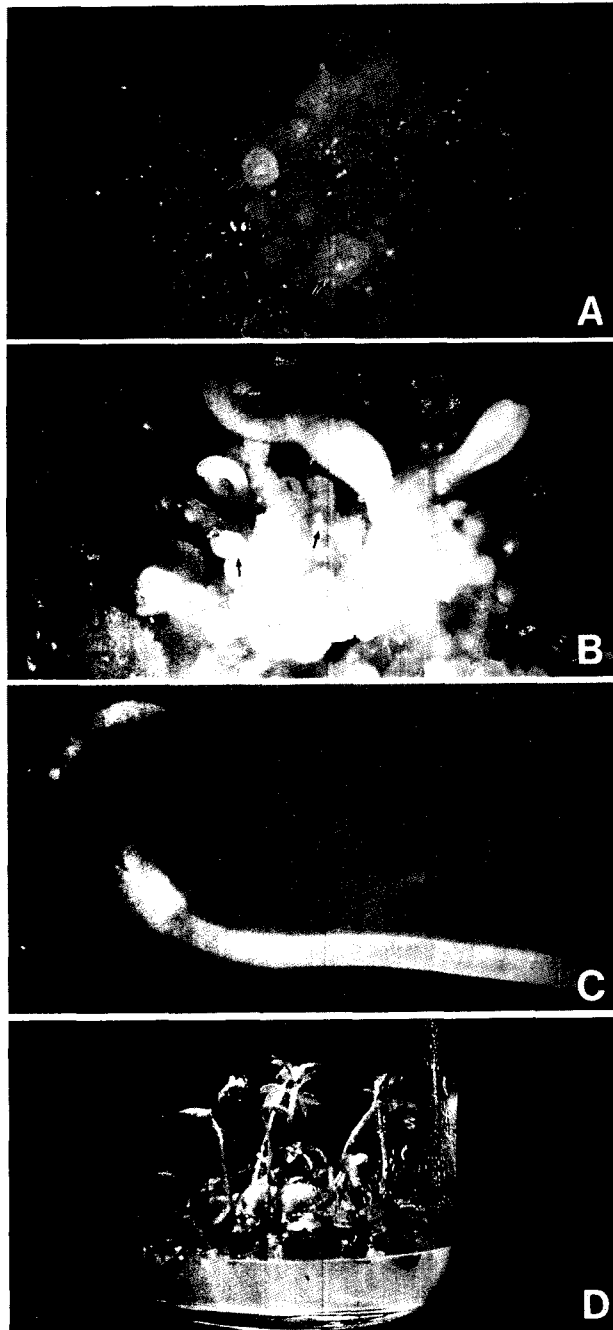


Figure 1. Somatic embryogenesis and plant regenerations from petiole explants of *Pimpinella brachycarpa*.

A-Initial stage of embryoid formation ($\times 40$). Arrows indicate globular-stage embryoids. B-Somatic embryo cluster showing embryos at various developmental stages ($\times 25$). Arrows indicate secondary adventive somatic embryos. C-Germinated somatic embryo with well developed cotyledons and hypocotyl ($\times 12$). D-Plantlets regenerated from somatic embryos ($\times 1$).

면으로 부터 계속된 2차 체세포배의 형성이 이루어져 기본 배지로의 계대배양만으로 식물체의 증식이 가능하였다. 그러나 체세포배는 상배축이 발달하지 못하거나 배축이 신장되지 못하여 식물체로 재생되지 못하는 것도 다수 관찰되었다. 그리고 초대배양에서 2,4-D 및 NAA가 각각 단독으로 첨가된 경우에는 초기의 체세포배는 관찰되나 그 이상은 발달하지 못하고 대부분 고사 되어 식물체의 재생에 비효과적이었다. 특히 2,4-D를 단독으로 첨가한 경우에는 캘러스의 형성 및 성장에 매우 용이하였으나 초기의 체세포배만 형성되어 식물체의 재생에는 비효과적이었다. Huber 등 (1978)은 *Pimpinella anisum*을 재료로한 체세포배 유도에서 2,4-D의 단독 첨가시에는 체세포배가 형성되지 않았고, 계속 세포분열만 이루어짐을 관찰하였는데 이는 본 실험의 결과와도 유사한 내용이다. 체세포배의 형성으로 식물체 재생에 가장 적합한 조건은 초대배양시 BA와 2,4-D, 또는 BA, 2,4-D 및 NAA를 혼용하여 명배양한 조건이었다. 2차 배지에서의 식물체 재생은 mBs 기본배지에 0.1 mg/L NAA가 첨가된 조건에서 정상 식물체로의 재생에 양호하였다.

산형과의 식물들은 대체로 기내반응이 양호한 것으로 알려져 있는데(Harn and Lee, 1985), 참나물 역시 산형과의 식물로서 체세포배의 발생이 매우 양호하여 엽병을 절편으로 체세포배 발생을 통한 식물체의 대량증식이 가능함을 보였다. 이 식물은 엽조직, 뿌리 및 절간을 절편으로하여 체세포배의 유도가 가능하였는데 (자료미 발표), 식물체의 재생은 엽병조직이 가장 양호하였다. 체세포배 발생이 가능한 캘러스를 유지하기 위해서는 배발생한 캘러스의 선발 및 증식이 중요한 내용이었는데, 배발생된 캘러스는 명배양의 조건에서 노란색과 투명한 백색을 보이며, 조직이 치밀하고 단단 하였다.

일반적으로 체세포배의 발생에서 문제시 되는 내용은 체세포배를 정상적으로 받아시켜 식물체로 재생하는 과정이다. 체세포배의 발아 방법에는 air-drying처리(Gingas and Lineberger, 1989), ABA의 처리(Ammirato, 1988), GA₃의 처리(Gmitter and Moore, 1986), sobitol 등을 이용한 삼투조절(Chalupa, 1990), 활성탄의 처리(Becwar et al., 1987), 저온처리(Bueno et al., 1992) 등이 보고 되고 있으나, 참나물의 체세포배로부터 발아 및 식물체의 재생에는 이러한 처리 방법이 특별히 요구되지 않았다. 그러나 2차 배지에서 배양기간이 경과 됨에 따라 서로 다른 발달단계의 체세포배의 발생이 계속 이루어져서, 균일한 식물체를 대량으로 확보하기 위해서는 ABA 등의 처리가 요구 되었다. 배발생의 능력을 지닌 캘러스는 agar 배지에서 2년 이상 계대배양 될 수 있었는데, 보다 효율적인 증식을 위해서는 이러한 캘러스를 재료로 현탁배양을 실시함이 좋을 것으로 사료 된다.

체세포배로부터 재생된 식물체는 mBs 및 MS 기본배지에서 4-6주간 생육시킨 다음 인공배양토 (peatmoss+perlite,

1:1 v/v)에 이식하여 온실에서 환경순화 하였다. 식물체는 97%이상 활착되어 정상식물체로 자랐으며 2개월 후의 초장은 15-25 cm 이었다. 식물체는 인공배양토에서 6개월 이상 정상적인 생육을 보이고 있다.

적 요

기내증식 중인 참나물(*Pimpinella brachycarpa*)의 엽병을 절편으로하여 체세포배형성을 통한 식물체의 대량증식을 유도하였다. 체세포배 발생은 MS 및 mBs 기본배지에 BA와 2,4-D, 혹은 BA, 2,4-D 및 NAA를 혼용하여 명배양 하였을 때 효과적이었으며, 농도는 BA 0.1 mg/L, 2,4-D 및 NAA는 0.5 mg/L 이었다. 광조건은 식물생장조절 물질의 반응에도 크게 영향을 미쳐, 명배양에서 효과적인 조건이 암배양에서는 전혀 다른 결과를 나타냈다. 즉 MS 및 mBs 배지에 0.5 mg/L 2,4-D를 각각 첨가하고 명배양한 조건에서는 100%의 체세포배 발생을 보인 반면, 암배양에서는 동일한 배지 조건에서 체세포배가 전혀 형성되지 않았다. 체세포배의 발육단계는 동일한 절편에서도 많은 차이를 보였으며, 배발생한 캘러스를 mBs 기본배지 및 0.1 mg/L NAA가 첨가된 배지로 계대배양 하였을 때 식물체의 재생에 주효하였다. 이미 형성된 체세포배는 배양기간이 길어지면 캘러스화 되면서 또다른 2차 체세포배가 형성되어 하나의 체세포배로부터 연속적인 식물체의 재생이 가능하였다. 2,4-D와 NAA의 단독첨가는 캘러스의 형성에는 양호하나 체세포배로부터 식물체의 재생에는 비효과적이었다. NAA를 단독첨가하여 암배양한 절편에서는 2차 계대배양시 절편 표면으로부터 부정근이 형성되었다. 배발생한 캘러스는 BA와 2,4-D가 첨가된 배지에서 약 5주간 간격의 계대배양으로 2년 이상 유지가 가능하였다. 체세포배를 통하여 재생된 식물체는 mBs 및 MS 기본배지에서 4-6주간 성장시킨 다음, 인공배양토에서 효과적으로 환경순화 되었다. 이 식물체는 엽병을 절편으로 체세포배 발생을 통한 기내 대량증식이 가능하다고 사료되었다.

사 사

본 논문은 1990년도 산림청의 '단기 임산 신소득원 개발에 관한 연구'의 연구 지원금의 일부로 수행 되었음. 본 논문의 작성에 도움과 제언을 주신 노은운 박사님께 감사드립니다.

인 용 문 헌

- Ammirato PV (1990) Role of ABA in the regulation of somatic embryogenesis. Hort Sci 23: 520
- Becwar MR, Verhagen SA, Wann SR (1987) The frequency of plant regeneration from norway spruce somatic embryos. (In) Proc 19th Southern Forest Tree Improvement Conference(SFTIC), Texas College Station, June 16-18, SFTIC Press pp 92-100
- Bueno MA, Astorgo R, Manzanera JA (1992) Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber*. Physiol Plant 85: 30-34
- Chalupa V (1990) Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur*) and linden (*Tilia cordata*). Plant Cell Rep 9: 398-401
- Ernst D, Oesterheld D (1985) Changes of cytokinin nucleotides in an anise cell culture (*Pimpinella anisum* L.) during growth and embryogenesis. Plant Cell Rep 4: 140-143
- Gamborg OL, Miller RA, Ojimak (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50: 151-158
- Gingas VM, Lineberger RD (1989) Asexual embryogenesis and plant regeneration in *Quercus*. Plant Cell Tissue Organ Cult 17: 191-203
- Gmitter FG, Moore GA (1986) Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus*: embryo production, germination and survival. Plant Cell Tissue Organ Cult 6: 139-147
- Gupta PK, Durzan DJ (1987) Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. Biotech 5: 147-151
- Hakman I, Arnold SV (1985) Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce). J Plant Physiol 121: 149-158
- Ham CY, Lee SY (1985) Genetic engineering-agricultural uses. Ilzogak Press, Korea pp 546
- Huber J, Constabel F, Gamborg OL (1978) A cell counting procedure applied to embryogenesis in cell suspension cultures of anise (*Pimpinella anisum* L.). Plant Sci Lett 12: 209-215
- Kudielka RA, Theimer RR (1983) Derepression of glyoxylate cycle enzyme activities in anise suspension culture cells. Plant Sci Lett 31: 237-244
- Kudielka RA, Theimer RR (1983) Repression of glyoxysomal enzyme activities in anise (*Pimpinella anisum* L.) suspension cultures. Plant Sci Lett 31: 245-252
- Kudielka RA, Theimer RR (1983) Loss of competence for glyoxysome formation during somatic embryogenesis in anise (*Pimpinella anisum* L.) suspension cultures. Plant Cell Rep 2: 261-264
- Lee TB (1989) Illustrated flora of Korea. Hyangmun Press, Korea pp 990
- Lutzenberger A, Theimer RR (1983) Fatty acid B-oxidation and glyoxylate cycle enzyme activities of induced glyoxysomes from anise suspension cultures. Plant Cell Rep 2: 160-163

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-479

The Office of Rural Development (1991) The native plants in Korea. Agricultural Community Development Association Press, Korea pp 376

Tremblay L, Tremblay FM (1991) Effect of gelling agents, ammonium nitrate, and light on the development of *Picea mariana* (Mill) B.S.P.

(black spruce) and *Picea rubens* Sarg. (red spruce) somatic embryos. *Plant Sci* **77**: 233-242

von Arnold S, Eriksson T (1979) Bud induction on isolated needles of Norway spruce (*Picea abies*) grown *in vitro*. *Plant Sci Lett* **15**: 363-372

(1993년 12월 17일 접수)