

조직배양을 이용한 처녀치마 [*Heloniopsis orientalis* (Thunb) C. Tanaka] 대량 증식

윤세영 · 이명선 · 임상철 · 신중두*

상지대학교 생명자원과학대학 응용식물학부 자원식물전공

Micropropagation of *Heloniopsis orientalis* (Thunb.) C. Tanaka *in vitro*

YUN, Sei young · LEE, Myung Sun · LIM, Sang Cheol · SHIN, JoungDu*

Natural Resources & Plant Science Department, Collage of Agriculture & Life Science, Sang-Ji University,
Woun-Ju, 220-702, Korea

ABSTRACT The effect of cultural media and growth regulators on multiple plant regeneration from leaf explants of *Heloniopsis orientalis* (Thunb.) C. Tanaka was evaluated. The highest percentage of shoot and root formation were 20 and 30% on MS medium treated at 3.0 mg l⁻¹ of zeatin, respectively. Also 67 and 33% of high shoot formation appeared on 1/2 MS and B5 culture medium treated at zeatin 1.0 and 3.0 mg l⁻¹, respectively. With MS treated at 0.5 mg l⁻¹ of 2,4-D, 1/2 MS and B5 culture media treated at each 1.0 and 3.0 mg l⁻¹ of zeatin the highest ratios of plant produced were 100, 280 and 310 % respectively relative to the other treatments. Generally, there was highest possibility for multiple propagation of *Heloniopsis orientalis* (Thunb.) C. Tanaka with B5 culture media supplemented 3.0 mg l⁻¹ of zeatin.

Key words : cultural medium, *heloniopsis orientalis* (Thunb.) C. Tanaka, masspropagation.

서 론

우리 나라는 북위 43°에서 33°에 걸쳐 남북으로 길게 뻗어 대륙과 연결되어 있다. 북쪽은 대륙과 접하여 온대의 식생을, 그리고 반도의 남해안과 도서지방은 난대의 기후를 띄고 있으므로 난대의 식생이 분포한다. 이러한 남북의 위도 차에 의하여 다양한 식물이 자생하고 있으며 약 4,500여 종의 자생 식물이 분포하고 있는 것으로 알려져 있다.

그렇지만, 공원, 주택단지, 정원 및 생활공간 주변지 녹화 등의 조경 식재에 있어 목본식물 위주의 교목, 관목 및 일부 만경류가 주종을 이루어 왔으며, 조경 식재공사에 있어 교목의 하부 식생의 처리방법은 지피식물로서 잔디가 주종을 이

루고 있으며 부분적으로는 맥문동 및 비비추가 주로 도입되고 있는 실정이다. 그러나, 최근 국민문화수준이 향상됨으로써 생태환경 조성을 위한 새로운 분위기 고조, UR 이후의 WTO 체제, 생물다양성 협약 등 국내외 많은 환경변화에 따른 조경 식물 식재에 있어 생태조경 개념에 입각하여 하부 식생 처리 방법의 일환으로 자원식물인 야생화를 적극적으로 도입하고 있는 실정이다.

또한 2002년 월드컵 게임 및 부산 아시안 게임에 대한 대비뿐만 아니라, 국토의 공간 미화 활용증진을 위한 한국적 분위기 창출을 위해 오래 전부터 자생되어온 야생화를 식재 함으로써 외래종 1년초 및 일부 구근류를 대체할 수 있는 자생 야생화의 보급 기술 개발의 일환으로 단기간 대량번식방법에 관한 연구가 절실히 요구되는 실정이다.

처녀치마 [*Heloniopsis orientalis* (Thunb.) C. Tanaka]는 전국에 걸쳐 산속의 습한 응달에서 자라는 상록성 다년초로서 뿌리와 줄기는 짧고 굵다. 아름다운 꽃을 자랑하는 야생화

*Corresponding author. Tel 033-730-0563

E-mail jdshin@chiak.sangji.ac.kr

의 대부분이 구근 또는 숙근류로서 채종에 의해서 번식하기에는 많은 시간이 소모되고, 또한 번식 방법이 확립되어 있지 않은 상태이다. 이러한 식물로는 열레지, 복수초 및 노루귀 등이 있으며, 조직배양에 의한 대량증식 방법 확립이 시급한 실정이다. 또한 한란과 대엽 풍란 (Lee et al. 1986) 등을 실험 소재로 다룬 조직배양 연구가 일부분이다.

기내의 식물체 분화에 있어서 실험재료로 사용되는 조직부위에 따라서 다양한 결과를 나타내며 식물조직배양에서 실험재료는 중요한 구성요소이다 (Bansal and Pandey 1993). 또한 기내배양을 통한 식물체의 분화 및 탈분화는 생장조절물질을 포함한 배지의 조성 및 배양조건에 따라서 그 양상이 크게 다른 것으로 알려져 있으며 (Bin and Heszky 1990; Data et al. 1990; Van Altvorst et al. 1995), 분화 유도에는 일반적으로 종에 따라 특정농도의 옥옥신과 사이토키닌의 조합이 이용된다. 또한 대부분의 종에서 callus 형성에는 고농도의 옥옥신이, 분화 및 발달에는 저농도의 옥옥신이 유리하고 (Chen et al. 1985; Kawahara and Komamine 1991) shoot 분화에는 옥옥신에 비하여 고농도의 사이토키닌이 요구된다.

대량증식을 위한 목적으로 미숙배 (Michael et al. 1988), 근단 (Rao and MohanRam 1982), 생장점조직 (Yuji and Osamu 1988)을 재료로 기내배양에 관한 연구가 이루어진 바 있으나 국내에서는 조직배양을 이용한 숙근류 야생화 식물의 대량번식에 관한 보고는 거의 전무한 실정이다. 따라서 본 연구는 조직배양을 이용한 처녀치마 대량증식을 위한 적정배지, 생장조절제 및 농도구명을 위해 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에서 사용된 처녀치마 [*Heloniopsis orientalis* (Thunb.) C. Tanaka]는 자생하는 식물의 잎을 채취하여 식물생장조절제에 대한 생물검정을 위한 예비실험의 소재로 사용하였으며, 예비실험 결과에서 얻어진 기내식물체의 잎을 절편으로 본 실험의 재료로 이용하였다.

치상 및 배양 조건

식물체의 잎을 절단하여 멸균수에 세척한 후 70% ethanol에 1분, 1% sodium hypochlorite에 5분간 침지하여 표면살균 후, 멸균수로 3회 세척하였다. 절편의 조제는 정단부의 잎을 재료로 1.5~2.0 mm의 크기로 절단하여 배지 종류별 및 생장조절제별로 조합처리한 배지 위에 각각의 배양병 (500 ml)에 6절편씩, 5반복 완전 임의 배치법으로 치상하였다. 생장상의 조건은 광량 2,000 Lux, 광주기 16/8시간, 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 암 조건으로 10일간 배양한 후 명 상태에서 50일간 배양하였

다.

배지종류 및 생장조절제

기본배지는 MS (Murashige and Skoug 1962), 1/2 MS 및 B5 (Gamborg 1975)배지에 sucrose (30 g l^{-1}), agar (8 g l^{-1})를 첨가하고 pH는 5.8로 조정하였다. 생장조절제는 사이토키닌류 (kinetin과 zeatin)와 2,4-D를 0.1, 0.5, 1.0 및 3 mg l^{-1} 그리고 1/2 MS배지에서 zeatin $1.0 + \text{kinetin } 0.5 \text{ mg l}^{-1}$ 및 kinetin $1.0 + \text{zeatin } 0.5 \text{ mg l}^{-1}$ 을 조합하여 각각의 배지에 첨가하였다. 치상 후 60일에 callus, shoot 및 root 형성률, 식물체 분화수, 식물체의 지상부 생체중 및 근중을 측정하였다.

결과 및 고찰

잎 조직으로부터 기관형성에 미치는 배지의 종류 및 생장조절제의 영향

야생화인 처녀치마 [*Heloniopsis orientalis* (Thunb.) C. Tanaka]의 잎을 절편하여 MS 기본배지, 1/2MS 및 B5 배지에 생장조절제의 종류 및 농도를 달리하여 치상한 후 치상절편에 대한 shoot, 뿌리 및 callus 형성에 미치는 생장조절제의 영향을 조사하였다. 배양 후 60일에 배지종류에 따른 shoot 분화 및 발근, 그리고 callus 발생 양상은 table 1과 같다.

Shoot 및 root 형성의 경우 MS 기본배지에 처리한 kinetin 0.5 mg l^{-1} 이 다른 농도와 비교하여 3%와 17%로서 가장 양호하였다. 또한 kinetin과 zeatin처리에서는 callus가 형성되는 것을 관찰할 수 없었지만 2,4-D의 모든 농도에서 callus가 형성되었으며, 특히 0.5 mg l^{-1} 농도에서 shoot 및 callus가 각각 40 및 17%로 유기되는 것으로 나타났다. Zeatin 3.0 mg l^{-1} 에서는 shoot 및 root 형성률이 각각 20, 30%로서 가장 양호한 것으로 나타났다. 1/2 MS배지의 경우 kinetin 및 zeatin 1.0 mg l^{-1} 에서 shoot 형성률이 각각 17과 67%로 가장 양호한 것으로 관찰되었으며, 조합에 있어서는 kinetin $0.5 + \text{zeatin } 1.0 \text{ mg l}^{-1}$ 농도에서 shoot 형성이 가장 양호한 것으로 나타났다. B5 배지에 있어서 kinetin 최저 처리농도인 0.1 mg l^{-1} 에서 shoot와 root 형성이 다른 처리 농도에 비하여 우수한 것으로 나타났으며, zeatin 3.0 mg l^{-1} 처리에서 shoot 형성률이 33%로 가장 양호한 것으로 나타났다.

전반적으로 식물체의 기관형성은 kinetin 및 2,4-D첨가구에 비하여 NAA 및 BA 첨가구에서 잘 이루어 진다고 하였는데 (Punja et al. 1990; Fonneshbech 1974) 본 실험에서는 shoot 형성률은 zeatin 처리에서 callus 형성률은 2,4-D 처리에서 효과적이었다.

Table 1. Effects of culture media and growth regulators on shoots, roots and callus induction from leaf explants of *Heloniopsis orientalis* (Thunb.) C. Tanaka after 60 days of culture.

Types of cultural media	Growth regulators (mg l ⁻¹)			No. of explants cultured	No. of explants forming			
	Kinetin	Zeatin	2,4-D		Shoots	Roots	Callus	
MS	3.0			30	0	0	0	
	1.0			30	1 (3) ^a	4 (13)	0	
	0.5			30	1 (3)	5 (17)	0	
	0.1			30	0	1 (3)	0	
		3.0		30	6 (20)	4 (13)	0	
		1.0		30	1 (3)	3 (10)	0	
		0.5		30	0	6 (20)	0	
		0.1		30	4 (14)	9 (30)	0	
			3.0	30	0	0	2 (7)	
			1.0	30	2 (7)	0	6 (20)	
			0.5	30	12 (40)	0	5 (17)	
			0.1	30	4 (13)	0	4 (13)	
	1/2 MS	3.0			30	2 (7)	0	0
		1.0			30	5 (17)	2 (7)	0
0.5				30	3 (10)	0	0	
0.1				30	6 (20)	3 (10)	0	
		3.0		30	5 (17)	0	0	
		1.0		30	20 (67)	0	0	
		0.5		30	11 (37)	2 (7)	0	
		0.1		30	3 (10)	3 (10)	0	
		1.0	0.5	30	3 (10)	1 (3)	0	
		0.5	1.0	30	12 (40)	0	0	
B5	3.0			30	0	2 (7)	0	
	1.0			30	2 (7)	0	0	
	0.5			30	0	0	0	
	0.1			30	2 (7)	3 (10)	0	
		3.0		30	10 (33)	0	0	
		1.0		30	6 (20)	1 (3)	0	
		0.5		30	2 (7)	2 (7)	0	
		0.1		30	0	0	0	

^a Numbers in parenthesis indicate percentage to the number of explants cultured.

전반적으로 MS 기본 배지에 있어서만 식물 성장조절제 처리에 있어 특히 2,4-D 처리를 제외하고는 callus 형성과정을 거치지 않고 직접적으로 shoots 분화과정으로 진입되어 개체 분화과정에 진입되는 것을 관찰할 수 있었으며 1/2 MS 및 B5 배지에 있어서 2,4-D 처리는 농도에 관계없이 치상한 절편이 고사되는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 잎의 부위별 morphogenic competence의 차이에 기인한다고 보고 (Pedro so and Paris, 1993)한 동일한 결과와 일치하지만 2,4-D 를 처리하였을 경우 callus가 유기되는 현상에 관해서는 유전적 요인이 우선적으로 작용하기 보다는 성장조절제의 종류에 따른 차이점이라 생각되었다.

배지 및 성장조절제 처리에 따른 식물체 분화

배지 종류에 따른 식물 성장조절제 처리가 식물체 분화 및 식물체의 지상부 및 뿌리에 대한 지수에 관해서 성장조절제 별 처리농도에 따른 일관성 있는 경향은 나타나지 않았다. MS 배지에 대한 식물체 분화율은 2,4-D 0.5 mg l⁻¹에서 100%, kinetin 0.5 mg l⁻¹에서 7 %, zeatin 3.0 mg l⁻¹에서 37%로 나타났다.

그러나 kinetin 0.1 mg l⁻¹, zeatin 0.5 mg l⁻¹ 및 2,4-D 3.0 mg l⁻¹에서 공히 식물체 분화가 일어나지 않은 것으로 관측 되었다. 식물체 분화율에 관계없이 식물체의 지상부 생육은 2,4-D 1.0 mg l⁻¹처리에서, 뿌리의 발달은 zeatin 0.5 mg l⁻¹에서 각각 shoots/roots 지수가 4.3 과 0 으로 가장 양호하였다 (Table 2).

1/2 MS 배지에 식물 성장조절제 처리가 식물체 분화 및 식물체의 지상부 및 뿌리에 대한 비율을 table 3에 나타내었다. 식물체 분화율은 zeatin 1.0 mg l⁻¹ 및 조합형인 kinetin 0.5 + zeatin 1.0 mg l⁻¹과 kinetin 0.1 mg l⁻¹ 각각 280, 193 및 33% 순으로 나타났으며, 식물체 분화율에 관계없이 식물체의 지상부 발달은 kinetin 1.0 + zeatin 0.5 mg l⁻¹과 뿌리의 발달은 zeatin 0.1 mg l⁻¹에서 shoots/roots 비율이 각각 5.0 및 1.3으로 가장 양호한 것으로 관측되었다.

shoot 분화율에 대한 kinetin과 zeatin의 효과는 조합 처리하여 조사한 결과 zeatin이 양호한 양상을 보였다 (Table 3).

B5 배지에 식물 성장조절제 처리가 식물체 분화, 식물체의 지상부/뿌리에 대한 비율에 미치는 영향에 관해서, 식물체 분

화율은 kinetin 1.0 및 0.1 mg l⁻¹ 공히 17%의 식물체를 얻을 수 있었지만 kinetin 1.0 mg l⁻¹ 처리에서 shoots/roots 지수가 0.9로 kinetin 0.1 mg l⁻¹ 처리에 비하여 지상부와 뿌리 발달이 양호한 것으로 나타났다.

그러나 zeatin 3.0 mg l⁻¹ 처리에서 식물체 분화율은 310%로 다른 농도 처리에 비하여 가장 양호한 것으로 나타났으며, shoots/roots 비율은 11.3으로 조사되었다 (Table 4).

따라서 배지별 식물성장조절제 처리에 따른 식물체 분화율은 MS 배지에서는 2,4-D 0.5 mg l⁻¹, 1/2 MS 배지에서 kinetin 0.5 + zeatin 1.0 mg l⁻¹, 1/2 MS 배지에서 zeatin 1.0 mg l⁻¹ 및 B5 배지에서 zeatin 3.0 mg l⁻¹ 이 각각 100, 193, 280 및 310% 로서 가장 높았다 (Table 2, 3, 4 and Figure 1).

Table 2. Effect of plant growth regulators on plant regeneration from leaf explant of *Heloniopsis orientalis* (Thunb.) C. Tanaka with MS cultural media after 60 days of culture.

Growth regulators (mg l ⁻¹)			No. of explants cultured	No. of plants regenerated	Fresh weight (mg/plant)		Shoot/root index
Kinetin	Zeatin	2,4-D			Shoots	Roots	
3.0			30	0	0.0	0.0	0.0
1.0			30	1 (3) ^a	67.4	4.9	13.8
0.5			30	2 (7)	4.5	3.0	1.5
0.1			30	-	0.0	12.3	0.0
	3.0		30	11 (37)	155.9	31.4	5.0
	1.0		30	3 (10)	86.1	0.7	123.0
	0.5		30	-	0.0	180.9	0.0
	0.1		30	8 (27)	23.7	41.7	0.6
		3.0	30	-	0.0	73.7	0.0
		1.0	30	2 (7)	228.7	53.6	4.3
		0.5	30	30 (100)	59.0	55.8	1.1
		0.1	30	7 (23)	14.5	7.7	1.9

^a Numbers in parenthesis indicate percentage to the number of explants cultured.

Table 3. Effect of plant growth regulators on plant regeneration from leaf explant of *Heloniopsis orientalis* (Thunb.) C. Tanaka with 1/2 MS cultural media after 60 days of culture.

Growth regulators (mg l ⁻¹)		No. of explants cultured	No. of plants regenerated	Fresh weight (mg/plant)		Shoot/root index
Kinetin	Zeatin			Shoots	Roots	
3.0		30	8 (27) ^a	11.0	2.2	5.0
1.0		30	9 (30)	18.4	2.8	6.6
0.5		30	3 (10)	4.7	15.9	0.3
0.1		30	10 (33)	20.4	3.0	6.8
	3.0	30	18 (60)	10.6	1.2	8.8
	1.0	30	85 (280)	16.0	4.8	3.3
	0.5	30	27 (90)	15.7	9.3	1.7
	0.1	30	8 (27)	54.0	41.2	1.3
1.0	0.5	30	12 (40)	78.9	15.8	5.0
0.5	1.0	30	58 (193)	1.8	1.6	1.1

^a Numbers in parenthesis indicate percentage to the number of explants cultured.

Table 4. Effect of plant growth regulators on plant regeneration from leaf explant of *Heloniopsis orientalis* (Thunb.) C. Tanaka with B5 cultural media after 60 days of culture.

Growth regulators (mg l^{-1})		No. of explants cultured	No. of plants regenerated	Fresh weight (mg/plant)		Shoot/root index
Kinetin	Zeatin			Shoots	Roots	
3.0		30	-	-	40.8	0.0
1.0		30	5 (17) ^a	11.0	12.8	0.9
0.5		30	0	0.0	0.0	0.0
0.1		30	5 (17)	9.3	4.1	2.3
	3.0	30	93 (310)	15.8	1.4	11.3
	1.0	30	47 (157)	13.0	6.6	2.0
	0.5	30	3 (10)	26.7	2.1	12.7
	0.1	30	-	0.0	0.0	0.0

^aNumbers in parenthesis indicate percentage to the number of explants cultured.

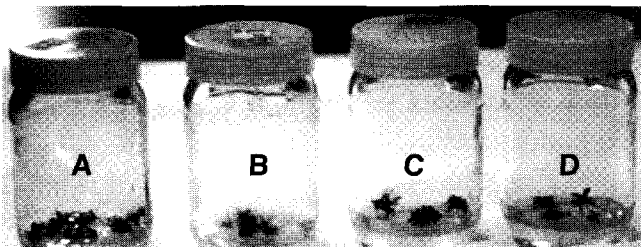


Figure 1. Plant regeneration from leaf ex-plant of *Heloniopsis orientalis* (Thunb.) C. Tanaka after 60 days of culture. A: B5 media treated with zeatin 3.0 mg l^{-1} , B: 1/2 media treated with zeatin 1.0 mg l^{-1} , C: 1/2 media treated with kinetin $0.5 + \text{zeatin } 1.0 \text{ mg l}^{-1}$, D: MS media treated with 2,4-D 0.5 mg l^{-1} .

전반적으로 야생화인 처녀치마의 잎 조직으로부터 multiple shoots 유도를 통하여 대량증식에는 B5 배지에 zeatin 3.0 mg l^{-1} 을 첨가시켜 줌으로써 가능할 것으로 판단되었다.

적 요

조직배양을 이용한 처녀치마 대량증식을 위한 적정배지, 생장조절제 및 농도구명을 위해 본 연구를 수행하였다. Shoots 및 roots 분화의 경우 zeatin 3.0 mg l^{-1} 을 첨가한 MS 배지에서 shoots 및 roots 형성률이 각각 20, 30 %로서 가장 양호한 것으로 나타났다. 1/2 MS배지의 경우 zeatin 1.0 mg l^{-1} 에서 shoots 형성률이 67 %, B5 배지에 있어서 zeatin 3.0 mg l^{-1} 처리에서 33 %로 가장 양호한 것으로 나타났다.

배지에 따른 식물 생장조절제 처리에 따른 식물체 분화율은 MS 배지에서는 2,4-D 0.5 mg l^{-1} , 1/2 MS 배지에서 zeatin 1.0 mg l^{-1} 및 B5 배지에서 zeatin 3.0 mg l^{-1} 에서 각각 가장 많은 100, 193, 280 및 310 %의 분화된 식물체를 얻을 수 있었다.

전반적으로 야생화인 처녀치마의 잎 조직으로부터 multiple shoots을 유도하여 대량증식을 위한 목적으로는 B5 배지에 생장조절제인 zeatin 3.0 mg l^{-1} 을 첨가시키는 것이 가장 효과적인 것으로 나타났다.

사사 - 본 연구는 상지대학교 교내연구비 지원에 의해 수행되었으며, 실험을 수행하는데 지원을 아끼지 않은 춘천농업과학기술원 엄남용선생님과 자원식물학과 심명보 및 광정임 학생에게 사의를 표합니다.

인용문헌

- Binh OQ and Heszky LE (1990) Restoration of the regeneration potential of long term cell culture in rice (*Oryza sativa* L.) by salt pretreatment. *J Plant Physiol* **136**: 336-340.
- Chen TH, Lam L, Chen SC (1985) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured inflorescence of *Oryza sativa* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* **4**: 51-54.
- Data SK, Data K, and Portrycus I (1990) Embryogenesis and regeneration from microspores of both 'indica' and 'japonica' rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci* **67**: 83-88.
- Fonneshbech M (1974) The influence of NAA, BA and temperature on shoot and root development from *Begonia* × *Cheimantha* petiole segment grown *in vitro*. *Physiol Plant* **32**: 49-54.
- Gamborg, O. L (1975) Callus and cell culture. In O. L. gamborg (Ed.), *Plant tissue culture methods*. Ottawa: National Research Council of Canada.
- Kawahara R and Komamine A (1991) Mechanism of somatic embryogenesis in carrot. *Kor J Plant Tiss Cult* **18**: 334-339.
- Lee JS, Shim KK, Yoo MS, Lee JS, Kim YJ (1986) Studies on Rhizome Growth and Organogenesis of *Cymbidium kanran* Cultured *in vitro*. *J Kor Hort Sci* **27**(2); 174-180.

- Michael EK, Sheehan TJ, and Ferwerda FH** (1988) *In vitro* growth of American lotus embryos. Hort Sci **23**: 611-613.
- Murashige T and Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. **15**: 473-497.
- Pedroso MC and Pais MS** (1993) Direct embryo formation in leaves of *Camellia japonica* L. Plant Cell Reports. **12**: 639-643.
- Punza ZK, Abbas N, Sarmiento GG, and Tag FA** (1990) Regeneration of *Cucumis sativus* and *C. sativus* var. *hardwickii*, *C. melo* and *C. metuliferus* from explants through somatic embryogenesis and organogenesis. Plant Cell Tiss and Org Cult **21**: 93-102.
- Rao S and Mohan Ram HY** (1981) Regeneration of whole plants from cultured root tips of *Limnophila indica*. Can J Bot **59**: 969-973.
- Van Altvorst AC, Yancheva S, and Dons H** (1995) Cell within the nodal region of carnation shoots exhibit a high potential for adventitious shoot formation. Plant Cell Tiss Org Cult **40**: 151-157.
- Yuji Y and Osamu M** (1988) Tissue culture of lotus (*Nelumbo nucifera Gaertn*). Bull Yamaguchi Agric Expt Stn **40**: 44-48.

(접수일자 2000년 7월 5일)