

갯기름나물의 체세포배 분화와 기관 분화를 통한 재분화

김옥태* · 김광수 · 안준철¹ · 황백

전남대학교 생명과학부 및 기초과학연구소, ¹서남대학교 생명과학과

Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis and Organogenesis from *Peucedanum japonicum* THUNB

KIM, Ok Tae* · KIM, Kwang Soo · AHN, Jun Cheul¹ · HWANG, Baik

Department of Biological Sciences and Institute of Basic Science, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea

¹Department of Life Sciences, Seonam University, Namwon, 590-170, Korea

ABSTRACT *Peucedanum japonicum* THUNB used as a edible and medicinal plants was investigated for in vitro regeneration. Callus formation occurred on leaf and stem explant cultures and showed spontaneous embryogenic and organogenic capability on MS basal medium supplemented with 0.1~5 mg/L NAA and 0~10 mg/L BA in dark. The regeneration was highest on the condition supplemented with 2.5 mg/L NAA and 10 mg/L BA. Development of the somatic embryo progressed through the globular, heart-shaped, torpedo-shaped and cotyledonary stage, typical of zygotic embryos. When the first somatic embryos was cultured on the medium supplemented with 0.2 mg/L NAA, secondary somatic embryo were induced with higher frequency on the hypocotyl then on the cotyledon and root.

Key words: A edible and medicinal plants, secondary embryo, somatic embryo

서 론

갯기름나물 (*Peucedanum japonicum* THUNB)은 산형과에 속하는 다년생 식물로서 대개 제주도 해안, 서해안의 강 하연 구나 바닷가 습지나 갯벌에 자생한다. 갯기름나물 (*P. japonicum*)의 어린 순은 나물 등의 식용으로 사용되기도 하며 뿌리에는 nodakenetin (C₁₄H₁₄O₄), decursidin, umbelliferone, pencordin, coumarin 등의 물질들이 함유되어 있어 인플루엔자 바이러스에 대한 활성과 항박테리아 활성을 나타내 감기약 등 약용으로 사용되고 있는 식물이다 (Yasumasa et al. 1994). 최근에는 갯기름나물 (*P. japonicum*) 뿌리에 coumarin 유도체인 praeruptorin, xanthotoxin, psoralen들이 함유되어 있다고 보고되었으며 (Dang et

al. 1999), 지상부와 뿌리에 함유된 coumarin 중 일부는 항혈소판 활성이 있는 것으로 조사되었다 (Chen et al. 1996). 또한 뇌 속의 noradrenalin이나 serotonin 등 monoamine의 농도를 높여주는 monoamine oxidase에 대해 강력한 억제 활성을 보여주고 있다 (Rendenbach-Muller et al. 1994). Koppenhöer (1995)는 이 식물체에 furanocoumarin계에 속하는 bergapton, isopimpinlin, xanthotoxin 등이 피부질병 및 항암제로 사용되고 있는 것으로 보고한 바 있다. 산형과 식물체에 대한 체세포배 발생이나 기관발생을 통한 대량증식에 대한 연구는 많이 보고되고 있으나 (Steward et al. 1958; Pia et al. 1993; Patra et al. 1998) 갯기름나물에 대한 연구는 현재까지 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 온난하고, 해안 습지나 갯벌에 자생하기 때문에 서식처가 제한되어 있는 갯기름나물의 유용물질 이용에 대한 연구에 선행하여 기내배양을 통한 재분화와 대량증식에 대한 기반연구를 확립하고자 하였다.

*Corresponding author. Tel 062-530-0790

E-mail kimot@korea.com

재료 및 방법

식물재료

본 연구에 사용된 갯기름나물 (*Peucedanum japonicum* THUNB)은 전남대학교 약초원에서 재배 중인 50 cm 높이의 식물체를 3월 중순에 채취하여 잎과 엽병을 70% 에탄올에서 2분간, 3% sodium hypochlorite 용액에서 7분간 표면살균 후 멸균수로 3회 세척하고 잎은 0.5 × 0.5 cm의 크기로, 엽병은 약 1 cm의 길이로 잘라서 사용하였다.

체세포배와 기관분화 유도

잎과 엽병 절편은 각 petridish에 10개씩을 3반복으로 치상하였으며, 배지는 3% sucrose와 0.8% 한천 및 여러가지 농도 (0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 mg/L)의 1-Naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 및 Benzyladenine (BA)가 단독 또는 혼합 첨가된 MS 기본배지 (Murashige and Skoog 1962)를 사용하였으며, 배지의 pH는 5.8로 조정된 후, 121°C, 1.2 기압에서 15분간 멸균하여 1회용 petri-dish에 각각 20 mL씩 분주하였다. 배양온도는 25 ± 1°C에서 8주간 암배양하여 체세포배 발생률과 부정아 발생률을 조사하였다.

이차 체세포배 유도와 식물체 재분화

기내에서 발생된 체세포배로부터 이차 체세포배의 발생을 위하여 0.1 ~ 1 mg/L의 NAA와 2,4-D를 첨가한 MS배지에 20 mL씩 petridish 당 10개의 자엽시기의 체세포배를 3회 반복으로 치상하고, 4주간 명배양하여 이차 체세포배의 발생률을 조사하였으며, 기내배양을 통하여 발생된 체세포배는 호르몬이 첨가되지 않은 MS기본배지로 계대배양하였다.

결과 및 고찰

체세포배와 기관분화 유도

갯기름나물 (*P. japonicum*)의 잎과 엽병의 절편체를 0 ~ 5 mg/L의 NAA, 2,4-D 및 0 ~ 10 mg/L BA가 단독 또는 혼합 첨가된 MS 기본배지에 치상하여 암배양한 결과 배양 4주 후부터 절편체로부터 캘러스화가 진행되어 조직의 팽배와 함께 절단면으로부터 유백색의 캘러스가 유도되었다 (Figure. 1A). 2,4-D 단독 및 BA와의 조합처리에서 캘러스의 발생 및 생장이 양호하였고, 반면에 NAA 단독 및 BA와의 조합 처리에서는 캘러스는 발생하였으나 생장이 더디었고, 첨가되는 NAA의 농도가 1 mg/L 이상 첨가된 처리구에서는 캘러스의 발생

과 함께 다량의 부정근이 발달하였으며, 첨가된 BA의 농도가 높을수록 캘러스의 발생, 성장 및 부정근의 발생과는 반비례 관계를 나타내었다. 절편체의 종류에 따른 캘러스의 유도는 잎 절편체보다는 엽병의 절편에서 캘러스의 발생이 좋았다 (데이터 미제시).

체세포배 발생과 기관 발생 과정을 2,4-D (0.1 ~ 5 mg/L)와 NAA (0.1 ~ 5 mg/L)의 단독처리 및 BA (0.1 ~ 10 mg/L)와의 조합 처리하여 조사하였다. 그 결과 2,4-D보다는 NAA가 모든 처리 농도에서 체세포배 형성률이 높았으며, BA와의 혼용 처리에서도 2.5 mg/L NAA와 0.5 mg/L BA가 조합 첨가된 처리구에서 가장 높은 빈도의 체세포배 형성률 (75%)을 나타내었다. 또한, NAA가 1 mg/L 이상 (1 ~ 5 mg/L)과 10 mg/L BA가 조합 첨가된 처리구에서는 체세포배 발생과정은 관찰되지 않았고 기관 발생만 나타났다 (Table 1).

간접 체세포배 발생 양상은 캘러스의 형성 후 배발생 캘러스로부터 구형의 배가 형성되고 (Figure. 1B), 심장형의 배를 걸쳐 (Figure. 1C) 어뢰형의 배로 발달되었으며 (Figure. 1D), 배지의 조건 변화 없이 어뢰형의 배는 자엽시기의 배로 발달

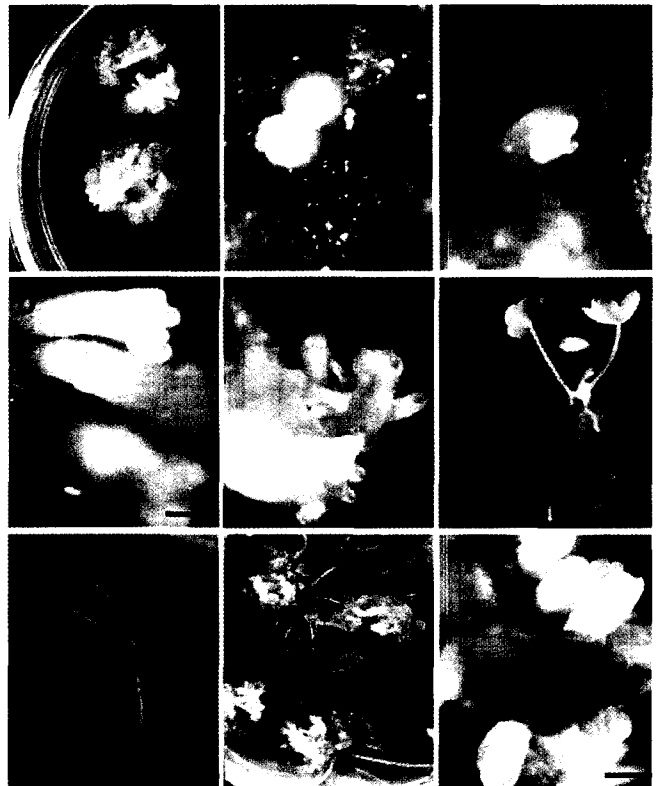


Figure 1. A, Induction of calli from petiole explant cultures of *Peucedanum japonicum*. (Bar = 10 mm); B, The globular stage of somatic embryos. (Bar = 1 mm); C, The heart-shaped stage of somatic embryo. (Bar = 2 mm); D, The torpedo stage of somatic embryo. (Bar = 2 mm); E, The cotyledonary stage of somatic embryos. (Bar = 5 mm); F, Regenerated plant (Bar = 10 mm); G, Direct organogenesis from leaf explant cultures. (Bar = 5 mm); H, Indirect organogenesis from petiole explants cultures. (Bar = 20 mm); I, Secondary somatic embryo induced from primary somatic embryos cultured. (Bar = 2 mm).

한 후 (Figure. 1E) 완전한 식물체로 발달하였다 (Figure. 1F). 발생한 체세포배의 대부분은 2개의 자엽을 갖는 전형적인 접합자배 (zygotic embryo)의 모습을 보였으나, 자엽이 융합된 나팔모양 (jar shape)이나, 자엽의 수가 1개, 3개, 4개나 5개인 비정상적인 배의 발생도 관찰되었고, 자엽이 융합된 나팔모양 (jar shape)이나 1개인 경우에는 완전한 식물체로의 발달이 어려웠으나 2개, 3개 4개의 자엽을 갖는 체세포배는 완전한 식물체로 발달하였다.

한편, 기관분화 (organogenesis)를 통한 부정아의 발생은 auxin (NAA, 2,4-D)류의 단독 처리에는 일어나지 않았으나 NAA와 적정농도의 BA 혼용처리에 한해서만 발생하였다. 부정아는 조직절편에서 캘러스의 발생 없이 직접 발생하기도 하였으나 (Figure. 1G), 대부분은 배발생 캘러스로부터 기관분화를 통하여 간접적으로 발생하였는데, 1~5 mg/L NAA와 10 mg/L BA가 조합첨가된 배지에서, 배양 6주 후에 절편체에서 발생 중인 캘러스로부터 다량의 부정아가 발생하였다 (Table 1). 같은 농도의 성장조절제가 첨가된 배지에서의 부정아의 발생은 암배양 (테이터 미세시)에 비하여 명배양시 발생기간도 짧아지며 발생률도 높게 나타났다 (Figure. 1H). 이는 빛이 광형태 발생에 관여하여 나타난 결과로 보이며, 배양 1주 후부터 배양 중인 캘러스의 표면에 붉은 색소의 침적

이 일어나 붉게 변하기 시작하였으며 배양 4주 후부터는 캘러스의 표면에 녹색 반점이 형성되기 시작하면서 부정아가 유도되었다. 재분화된 부정아의 발근은 MS 기본배지에 배양하였을 때 정상적인 식물체로 발달하였다.

이차 체세포배 유도와 식물체 재분화

기내배양을 통하여 발생한 일차 체세포배를 0.1~1 mg/L의 NAA와 2,4-D가 첨가된 MS 고체배지에 배양하여 조사하였다. 2,4-D 처리시는 농도가 높아짐에 따라 캘러스화가 진행되어 이차 체세포배의 발생이 감소하였으나, NAA 처리구에서는 다수의 이차 체세포배 (Figure. 1I)가 발생하였으며 0.2 mg/L 처리에서 이차 체세포배의 발생률이 91%로 가장 높았다 (Table 2). 배 발생한 일차 체세포배를 0.2 mg/L의 NAA가 첨가된 배지에서 배양하였을 때, 이차 체세포배가 발생하였으며 주로 일차 체세포배의 배측과 하배측에서 많이 발생하였고 그 다음으로 자엽이나 뿌리 부분에서 발생하였다. 발생한 체세포배들은 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 배지에 배양하면 정상적인 식물체로 발달하였다. 한편, 재분화된 유식물체들은 배양실 환경조건 하에서 vermiculite 용토에 이식, 순화과정을 거쳐 4주 후 식물체들은 온실로 옮겨 계속 성장하였다.

이상의 실험결과로 갯기름나물의 잎과 엽병의 절편체로부터 직접 체세포배 발생뿐만 아니라 캘러스를 통한 간접 체세포배 발생과 직접 부정아 발생, 또한 캘러스를 통한 간접 부정아 발생 등, 조직배양을 통한 일련의 재분화 과정이 확인되었다. 따라서 본 연구를 통하여 갯기름나물이 함유하는 유용성분의 함량과 생합성 부위 규명 등을 위한 기초자료로서 효율적인 체세포 배발생 및 기관분화를 이룰 수 있는 기내 배양조건의 확립이 가능하였고, 이를 토대로 coumarin 유도체와 nodakenetin 등의 생산 및 생합성 부위의 규명을 위한 연구가 연속될 수 있을 것으로 사료된다.

Table 1. Effects of growth regulators on the induction of somatic embryogenesis and organogenesis from petiole explants of *Peucedanum japonicum* after 8 weeks culture.

Growth regulators (mg/L) ^a			Frequency of somatic embryo (%)	Frequencies of adventitious buds (%)
2,4-D	NAA	BA		
0.0			- ^b	-
0.1			9.0	-
0.5			15.0	-
1.0			18.0	-
2.5			-	-
5.0			-	-
0.1		0.1	34.0	-
0.5		0.1	-	-
1.0		0.1	-	-
2.5		0.1	-	-
5.0		0.1	-	-
	0.1		-	-
	0.5		30.0	-
	1.0		-	AR
	2.5		-	AR
	5.0		-	AR
	10		-	-
	1.0	0.5	40.0	-
	2.5	0.5	75.0	-
	5.0	0.5	60.0	-
	1.0	10	-	57.0
	2.5	10	-	81.0
	5.0	10	-	78.0

^a Plant growth regulators were added to MS basal medium.
^b -: no response, AR: generation of adventitious roots.

Table 2. Effects of growth regulators on the induction of secondary somatic embryos from primary somatic embryos of *Peucedanum japonicum* after 4 weeks culture.

Growth regulators (mg/L) ^a		Frequency of secondary somatic embryos (%)		
NAA	2,4-D	hypocotyl	cotyledon	root
0.0		12.0	-	-
0.1		45.0	10.0	-
0.2		91.0	23.0	12.0
0.5		60.0	9.0	5.0
1.0		48.0	-	-
	1.0	54.0	11.0	-
	0.2	30.0	-	-
	0.5	20.0	-	-
	1.0	- ^b	-	-

^a Plant growth regulators were added to MS basal medium.
^b -: no response.

적 요

식용 및 약용으로 사용되는 갯기름나물의 기내배양을 통한 재분화율을 조사하였다. 캘러스는 잎과 엽병의 절편체에서 발생하였고 0~5 mg/L의 NAA와 0~10 mg/L BA가 첨가된 MS 기본배지에 치상하여 암배양 결과 자발적인 배 분화와 기관 분화를 보여주었으며 2.5 mg/L NAA와 10 mg/L BA의 조건에서 재분화율이 가장 높았다. 체세포 배의 발생양상은 구형, 심장형, 어뢰형을 거쳐 자엽 단계로 발달하여 전형적인 접합자 배의 모습으로 발달하였다. 배 발생한 일차 체세포배를 0.2 mg/L의 NAA가 첨가된 배지에서 배양하였을 때, 이차 체세포배가 발생하였으며 주로 일차 체세포배의 배측과 하배측에서 많이 발생하였고 그 다음으로 자엽이나 뿌리 부분에서 발생하였다.

사사 - 이 논문은 2000년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2000-015-DP0360).

인용문헌

Chen IS, Chang CT, Sheen WS, Teng CM, Tsai IL, Duh CY, Ko FN

(1996) Coumarin and antiplatelet aggregation constituents from formosan *Peucedanum japonicum*. *Phytochemistry* 41:525-530

Dang TLH, Choi HC, Rho TC, Lee HS, Lee MK, Kim YH (1999) Inhibitory activity of monoamine oxidase by coumarins from *Peucedanum japonicum*. *Arch Pharm Res* 22:324-326

Koppenhöfer E (1995) Kaliumkanalblocker in der Neurologie : 5MOP Zur behandlung MS-bedingter Funktions de fizite. *TW Neurogie Psychiatrie* 585-591

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497

Patra A, Rai B, Rout GR, Das P (1998) Successful plant regeneration from callus culture of *Centella asiatica* (L.) Urban. *Plant Growth Regulation* 24:13-16

Pia V, Kirsi-Marja OC, Jaana L, Raimo H (1993) Spontaneous somatic embryogenesis and plant regeneration from root cultures of *Peucedanum palustre*. *Plant Cell Rep* 12:453-456

Rendenbach-Muller B, Schlecker R, Traut R, Weifenbach H (1994) Synthesis of coumarins as subtype-selective inhibitors of monoamine oxidase. *Bioorg Med Chem* 4:1195-1198

Steward FC, Mapes MO, Mears K (1958) Growth and organized development of cultured cells. *Am J Bot* 45:653-704

Yasumasa I, Izumi M, Yutaka T (1994) Coumarin glycosides from *Peucedanum japonicum*. *Phytochemistry* 35:1339-1341

(접수일자 2000년 12월 23일)