

선피막이의 캘러스 배양을 통한 체세포 배발생과 기관분화

김옥태* · 김민영* · 김광수* · 안준철** · 황 백*†

*전남대학교 생물학과, **서남대학교 생명과학과

Somatic Embryogenesis and Organogenesis *via* Callus Culture from *Hydrocotyl maritima* Honda

Ok Tae Kim*, Min Young Kim*, Kwang Soo Kim*, Jun Cheul Ahn**, and Baik Hwang*†

*Department of Biology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea.

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

ABSTRACT : *Hydrocotyle maritima* Honda used as medicinal plants for a hemostatic agent was investigated for *in vitro* regeneration. The petiole explants of *H. maritima* were cultured on callus induction medium containing growth regulators (0~5 mg/l NAA and 0~5 mg/l 2,4-D) either in single or in combination with 0.1~2 mg/l BA for 6 weeks. Although single treatments of 2,4-D or NAA resulted in callus formation, the best results were combination of 0.5 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BA, 5 mg/l NAA and 0.5 mg/l BA, respectively. The highest number of shoot (12 shoots per callus) was achieved with 3 mg/l Kinetin. Also, when pieces of embryogenic callus induced on the medium supplemented with 0.5 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BA were subcultured on hormone-free medium, somatic embryos were differentiated and developed further into well-developed plants.

Key words : embryogenesis, *Hydrocotyle maritima*, monoterpene, organogenesis

서 론

선피막이 (*Hydrocotyle maritima* Honda)는 산형과 (Umbelliferae)에 속하는 다년생 포복성 초본으로서 우리나라에서는 남부지방에서만 자생하는 것으로 알려졌다 (이, 1993). 특히, 선피막이의 잎을 지혈제로 사용하기 때문에 피막이풀이라고 부르며, 줄기 끝이 다소 서있어 선피막이풀이라고도 한다. 또한 한방에서 선피막이는 이뇨, 황달 등에 달여 쓰는데 이것은 구안와사 (눈과 입이 한쪽으로 쏠려 뺨뺨떨어지는 병)에 더없이 훌륭한 발포 치료제로 쓰이고 있다. 선피막이의 주유효성분은 trans- β -farnesene이며, 그리고 monoterpene인 α -terpinen과 thymol이 많은 양으로 존재한다. 또한 선피막이의 sesquiterpenoid의 구

성요소는 병풀 (*Centella asiatica*)의 구성요소와 유사하다 (Yoshinori *et al.*, 2001). 주요 물질인 이들 essential oil은 항균적, 구충적 성질을 갖고며, 구풍제, 거담약 등 약학적성질을 갖는다 (Chao *et al.*, 2000; Horne *et al.*, 2001). 염장 (鹽藏) 햄을 취급하는 회사에서 햄을 숙성 및 저장 가공하는 동안 요구되는 높은 습도와 온도는 응애 (*Tyrophagus putrescentiae*)의 발육에 유리하기 때문에 고부가가치 제품의 상품성을 감소시키므로 경제적 손실이 발생한다. 선피막이의 주성분인 α -terpinen은 이와 같은 응애에 대해 살비활성 (acaricidal activity)을 나타낸다고 보고한 바 있다 (Ismael & Pedro, 2000).

이처럼 유용한 물질을 함유한 선피막이에 대한 유용물질 연구 및 상업적 개발을 위한 대량생산 연구는 없는 실정이

† Corresponding author : (Phone)+82-62-530-3392 (E-mail) bhwang@chonnam.ac.kr

Received February 17, 2003 / Accepted November 14, 2003

다. 따라서 본 연구에서는 처음으로 기내에서 조직배양방법을 통한 선피막이의 대량 배양을 위한 식물체 재분화 시스템을 확립하여 유용물질 연구에 대한 기초자료를 제공함에 목적이 있다.

재료 및 방법

1. 식물재료

본 연구에 사용된 선피막이 (*Hydrocotyl maritima* Honda)은 전남대학교내에서 서식 중인 식물체를 10월초에 채취하여 잎을 제거하고 엽병만을 70% 에탄올에서 3분간, 3% sodium hypochlorite 용액에서 6분간 표면을 살균 후 멸균수로 5회 세척하여 약 10 mm의 길이로 잘라서 사용하였다.

2. 캘러스 유도

엽병 절편은 각 petri dish에 15개씩 치상하였으며, 배지는 3% sucrose와 0.8% 한천 및 여러가지 농도 (0, 0.1, 0.5, 1, 2.5 및 5 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 & Skoog, 1962)를 사용하였으며, 배지의 pH는 5.8로 조정 한 후, 121°C, 1.2 기압에서 15분간 멸균하여 1회용 petri dish에 각각 20 ml씩 분주하였다. 배양온도는 25±1°C에서 6주간 암배양하여 캘러스 발생을 조사하였다.

3. 기관분화 유도

유도된 캘러스들은 3주 간격으로 계대배양 하였으며, 5 mg/l NAA와 1 mg/l BA가 첨가된 처리구에서 유도된 유백색의 캘러스를 100 mg을 cytokinin [Zeatin, Thidiazuron (TDZ), BA, Kinetin]이 여러 농도(0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 3 및 5 mg/l)로 첨가된 배지에 치상하여, 16 시간 광조건하에서 6 주간 배양하여 부정아 발생을 조사하였다.

4. 체세포배 발생 및 식물체 재분화

0.5 mg/l 2,4-D와 0.5 mg/l BA가 첨가된 처리구에서 유도된 캘러스로부터 체세포배의 발생을 위해 0~1 mg/l의 2,4-D와 0~1 mg/l의 BA를 조합하여 3% (v/v) sucrose와 0.8% agar (w/v)가 포함된 MS배지에 첨가하였다. Petri dish 당 100 mg의 embryogenic callus를 치상하고, 5 주간 명배양하여 체세포배의 발생을 조사하였다. 기내배양을 통하여 발생된 체세포배는 호르몬이 첨가되지 않은 MS 기본배지로 계대배양 하였다. 완전한 식물체는 vermiculite: perlite (1:1) 혼합토로 채운 pot에 옮겨 실온에서 순화하였다.

결과 및 고찰

1. 캘러스 유도

기내배양을 통한 식물체의 탈분화 및 재분화는 성장조절 물질을 포함한 배지의 조성, 배양조건에 따라 그 양상이 크게 다른 것으로 알려져 있으며 (Binh & Heszky, 1990; van Altvorst *et al.*, 1995), 캘러스 유도에는 일반적으로 종에 따라 특정농도의 옥신 또는 옥신과 시토키닌의 조합이 작용한다. 따라서 캘러스를 유도하기 위해 호르몬의 종류와 농도를 알아보았다. 2,4-D를 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2.5 및 5 mg/l 농도로 단독으로 처리했을 때 모든 처리구에서 엽병 절편체로부터 캘러스가 발생하였지만 피사하거나 갈변하였다. NAA를 2,4-D의 농도와 마찬가지로 단독으로 처리한 결과 호르몬에 대한 반응이 없거나 유도된 캘러스는 2,4-D를 처리했을때와 마찬가지로 피사하거나 갈변하였다 (Data not shown). 다음으로 2,4-D와 BA를 조합하여 처리하였다. 그 결과 각각 0.5 mg/l 농도에서 유백색을 띄는 캘러스가 발생하였으며 유도 및 생장이 가장 활발하였다 (Table 1; Fig. 1A). 2,4-D 농도를 고농도로 처리할수록 반응이 없거나 캘러스가 피사하여 캘러스 유도에는 저농도가 적합하였다. NAA와 BA를 조합한 처리구에서는 캘러스 발생과 함께 부정근 발생이 주를 이루었다 (Table 2). NAA 5 mg/l 와 BA 0.5 mg/l 처리구에서 캘러스 발생이

Table 1. Effect of 2,4-D and BA on induction of callus from petiole explants of *H. maritima*.

Medium	BA (mg/l)	% of callus induction				
		2,4-D (mg/l)				
		0.1	0.5	1	2.5	5
MS	0.1	70.2	75.3	80.7	24.6	14.0
	0.5	91.2	95.2	30.2	25.0	20.4
	1	94.5	45.6	12.0	-†	-
	2	36.1	15.9	18.5	-	-

†No respond.

Table 2. Effect of NAA and BA on induction of callus from petiole explants of *H. maritima*.

Medium	BA (mg/l)	% of callus induction				
		NAA (mg/l)				
		0.1	0.5	1	2.5	5
MS	0.1	-†	15.4 ^R	43.0	38.3 ^R	32.0 ^R
	0.5	-	20.5	30.1	85.0 ^R	98.2 ^R
	1	33.8	30.5	43.3 ^R	60.0 ^R	90.2 ^R
	2	30.5	27.7	28.5	67.3	72.0

†No respond. ^RAdventitious roots were induced on the medium.

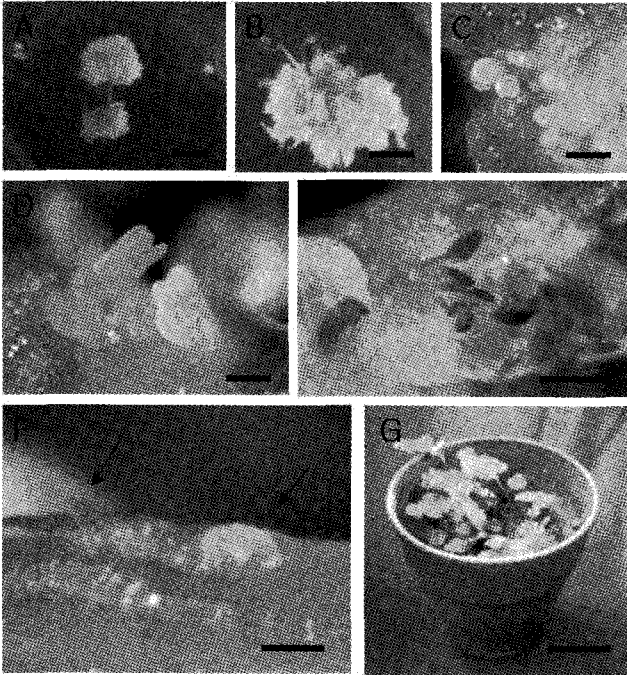


Fig. 1. Plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis of *H. maritima*. A, Induction of callus on petiole explant (Bar = 15 mm); B, Shoot formation from callus (Bar = 8 mm); C, The globular stage of somatic embryo (Bar = 0.4 mm); D, The torpedo stage of somatic embryo (Bar = 0.7 mm); E, The cotyledonary stage of somatic embryos (Bar = 2 mm); F, The direct induction of embryo on the surface (arrows are embryo) (Bar = 0.5 mm), and G, 3 weeks old acclimatized plant in pot (Bar = 5 cm).

활발하였고 부정근 또한 발생하였다. NAA는 BA와 조합할 경우, 2,4-D와는 다르게 고농도로 첨가되었을 때 캘러스 발생이 활발하였다.

2. 기관발생

5 mg/ℓ NAA와 0.5 mg/ℓ BA가 첨가된 처리구에서 유도된 캘러스를 3주 간격으로 계대배양하여 기관분화를 유도하였다. 선피막이의 캘러스가 신초 발생시 가장 적합한 식물생장조절제와 농도를 알아보기 위해 Kinetin, BA, Zeatin 및 TDZ를 첨가하여 조사한 결과, Kinetin과 BA가 다른 처리구에 비해 우수한 신초 발생율과 재분화율을 보였고, Zeatin은 약간의 부정근만 발생하였으며 TDZ 처리구에서는 BA와 Kinetin보다 낮은 재분화율을 나타내었다 (Table 3). 배지에 시토키닌류를 단독으로 처리하여 여러 개의 부정아를 유도하는 방법으로 (Clog *et al.*, 1990), 선피막이에서는 기관발생을 통해 만들어졌으며, 배의 발생

단계를 거치지 않고 신초가 발생하였다 (Fig. 1B). Kinetin과 BA 모두 3 mg/ℓ 첨가된 처리구에서 가장 좋은 결과를 보여 가장 적당한 농도로 조사되었다. Kinetin과 BA의 농도가 고농도로 첨가될수록 재분화율은 높게 나타나지만, 신초 발생은 낮게 발생하여 재분화 효율을 저해하는 것으로 나타났다.

Table 3. Effect of cytokinins on shoot induction from callus that was induced on the medium supplemented with 5 mg/ℓ NAA and 0.5 mg/ℓ BA.

Cytokinins [†] (mg/ℓ)	% of shoots from callus	No. of shoots per callus
Control	0	0
Kinetin	0.1	80
	3	83
	5	93
BA	0.1	76
	3	73
	5	87
Zeatin	0.1	- [*]
	3	-
	5	-
TDZ	0.01	64
	0.025	45
	0.05	-

[†]Cytokinins were added to MS basal medium. ^{*}no respond.

3. 체세포 배발생

0.5 mg/ℓ 2,4-D와 0.5 mg/ℓ BA가 첨가된 처리구에서 유도된 캘러스로부터 체세포 배를 유도하였다. 체세포 배발생에 대한 성장조절제의 영향은 농도가 낮을수록 발생이 활발하였다. 특히, 성장조절제가 없는 배지에서 배발생이 가장 많이 유도되어 배발생에 식물생장조절제는 필요 없는 것으로 나타났다 (Table 4). 발생된 배는 접합자 배와 같은 정상적인 단계를 거쳐 식물체를 이루었다 (Fig. 1C~E). 또한, 정상적인 배 단계를 거쳐 완성된 식물체의 배측에서 이차 배가 표피로부터 직접적으로 발생하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1F). 산형과인 갯기름나물 (*Peucedanum japonicum*)에서도 이런 단계를 거쳐 배측에서 이차 배가 유도되었지만, NAA가 첨가된 처리구에서 이차 배 유도가 활발하였다 (Kim *et al.*, 2000).

기관발생으로 유도된 신초에 NAA를 처리하여 발근을 유도한 결과 NAA 호르몬 없이도 발근이 쉽게 유도되었

다. 기관분화와 배분화를 통하여 이루어진 완전한 식물체는 3주간 기내에서 배양 후 바로 vermiculite : perlite = 1:1 토양에 옮겨, 온도 25±1℃에서 습도를 유지시키면서 활착을 유도한 결과 쉽게 활착을 하여 대량증식의 가능성을 높여주었다 (Fig. 1G).

Table 4. Effects of plant growth regulators on embryo induction from callus of *H. maritima*.

Growth regulators [†]	No. of embryos per callus (Mean±SE)
0 (control)	47±24.05
0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BA	25±10.35
1.0 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BA	20±11.55

[†] Plant growth regulators were added to MS basal medium.

적 요

약용식물로 쓰이는 선피막이 (*Hydrocotyle maritima* Honda)를 기내에서 재분화 가능성에 대해 조사하였다. 선피막이의 엽병 절편체를 식물생장조절제 (0~5 mg/l NAA와 0~5 mg/l 2,4-D)가 단독 또는 0.1~2 mg/l BA와 조합 첨가된 배지에서 6주동안 배양하였다. 2,4-D 또는 NAA를 단독으로 처리해도 캘러스가 발생하나, 가장 좋은 결과는 각각 0.5 mg/l 2,4-D와 0.5 mg/l BA, 5 mg/l NAA와 0.5 mg/l BA 조합구에서 나타났다. Kinetin를 3 mg/l로 처리시 캘러스로부터 가장 많은 싹 (캘러스당 12개)을 발생시켰다. 또한, 0.5 mg/l 2,4-D와 0.5 mg/l BA가 첨가된 배지에서 유도된 배 발생 캘러스를 호르몬이 없는 배지에서 배양하였을 때, 체세포 배가 분화되었고, 식물체로 더 잘 발달하였다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21 사업의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사 드립니다.

LITERATURE CITED

Binh OQ, Heszky LE (1990) Restoration of the regeneration potential of long-term cell culture in rice (*Oryza sativa* L.) by salt pretreatment. *Plant Physiol.* 136:336-340.

Chao SC, Young DG, Oberg CJ (2000) Screening for activity of essential oils on selected bacterial, fungi and viruses. *J. Essent. Oil Res.* 12:639-649.

Clog E, Bass P, Walter B (1990) Plant regeneration by organogenesis in *Vitis* root stock species. *Plant Cell Rep.* 18:493-497.

Horne D, Holm M, Oberg C, Chao S, Young DG (2001) Antimicrobial effects of essential oils on *Streptococcus pneumoniae*. *J. Essent. Oil Res.* 13:387-392.

Ismael SR, Pedro C (2000) Acaricidal activity of natural monoterpenes on *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank), a mite of stored food. *J. Stored Products Res.* 37:93-101.

Khallouki F, Hmamouchi M, Younos C, Soulimani R, Bessiere JM, Essassi EM (2000) Antibacterial and molluscicidal activities of the essential oil of *Chrysanthemum viscidifolium*. *Fitoterapia* 71:544-546.

Kim OT, Kim KS, Ahn JC, Hwang B (2000) Plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis from *Peucedanum japonicum* Thunb. *Korean of Plant Tissue Culture.*

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

van Altvorst AC, Yancheva S, Dons H (1995) Cell within the nodal region of carnation shoots exhibit a high potential for adventitious shoot formation. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 44:31-35.

Yoshinori A, Reiko M, Tsunematsu T (1982) Mono- and sesquiterpenoid from *Hydrocotyle* and *Centella* species. *Phytochemistry* 21:2590-2592.

이창복 (1993) 대한식물도감. 향문사.