

갯방풍(*Glehnia littoralis* Schmidt et Miquiel)에서 캘러스 유도 및 식물체 재분화에 미치는 성장조절제의 효과

이병국^{1),3)}, 한미숙^{1),3)}, 정양균⁴⁾, 나의식²⁾, 윤성중¹⁾, 유남희^{3)*}

전북대학교 바이오식품소재개발 및 산업화 연구센터, ¹⁾전북대학교 생물자원과학부,

²⁾순천대학교 식물생산과학부, ³⁾(주)플랜넷, ⁴⁾전주농림고등학교,

Comparative Effect of Plant Growth Regulators on Callus Induction and Plant Regeneration in *Glehnia littoralis* Schmidt et Miquiel

Byoung-Kook Lee^{1),3)}, Mi-Suk Han^{1),3)}, Yang-Kyun Jung⁴⁾, Eui-Shik Rha²⁾,
Song-Joong Yun¹⁾, and Nam-Hee Yoo^{4)*}

Research Center for Industrial Development of Bio Food Materials,
Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

¹⁾Division of Biological resources science, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

²⁾School of Plant Production Science Faculty, Sunchon National University, 540-742, Korea

³⁾Plant Net Company Ltd., Jeonju 561-756, Korea

⁴⁾Jeonju Agriculture and Forestry High School, Jeonju 561-232, Korea

ABSTRACT

Glehnia littoralis is known as an edible and medicinal plant using green leaves and mature roots of plant. In the present paper, the influence of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration was investigated. Callus induction and regeneration occurred from leaf and petiole explants in *Glehnia littoralis*. Optimal condition of plant growth regulators for callus induction from leaf and petiole explants was MS basal medium supplemented with 2mg/L 2,4-D and 2mg/L BA. The frequency of callus induction was higher in petiole explant than leaf. When the callus was cultured on MS basal medium supplemented with 0~1mg/L IAA, 0~1mg/L NAA and 0~2mg/L BA for about 65 days, the most effective plant growth regulators on plant regeneration from callus were 1mg/L NAA and 2mg/L BA. The plantlets acclimatized successfully and grown in vermiculite matrix.

Key words : *Glehnia littoralis*, medicinal plant, NAA, IAA, BA, 2,4-D, leaf, petiole

서언

현재 다양화되고 차별화된 식생활에 힘입어 특수 채소들이 각광을 받고 있는데 그 중에서 갯방풍과 같이 기능성채소로서 개발 가능성이 높은 작물들에 대한 연구가 중요시 되고 있다. 갯방풍은 쌈용 채소로서 개발, 보급이 되기 시작한 작물로 고부가가치의 상품으로 판매가 시도되고 있으나 국내의 재배면적과 생산량은 극히 미미하다. 따라서 연중 생산과 공급이 가능할 수 있도록 주년생산체계의 확립과 우량종묘를 생산하는 것이 중요하고, 우선적으로 새로운 기능성 채소인 갯방풍의 주년생산체계 확립에 필수적인 우량종묘의 기내 대량증식체계의 확립이 요구된다.

갯방풍(*Glehnia littoralis* Schmidt et Miquiel)은 다년생 식물로 자생지는 비교적 따뜻한 지역과 배수조건이 양호한 토양에서 생육이 좋으므로 온난한 해안가의 염분이 있는 곳이 재배적지로 알려져 있다 (Park and Lee, 2000).

갯방풍의 명명은 지역 및 이용자에 따라 다양하게 사용되고 있으나 갯방풍속(*Glehnia*)의 갯방풍(*Glehnia littoralis*)은 빈방풍, 원방풍, 기름나물속(*Peucedanum*)의 갯기름나물(*Peycedaum japonicum*)을 식방풍, 산방풍이라 하여 식물학상 차이가 있다. 국내에서 한약재로 유통되는 대부분의 갯방풍은 *Glehnia littoralis*가 기원이고 식방풍은 갯기름나물과 유사한 *Peucedanum japonicum*에 기원한 것으로 알려져 있다(Park and Lee, 2000).

주로 신경계 질환 및 항암, 항바이러스 작용에 효과가 있어 국내에서 한약재로 이용되어 왔고, 갯방풍의 뿌리에서 β -sitosterol, bergaten, coumarin 등의 물질이 분리 확인되었으며, 갯기름나물에서 일부 성분은 항 혈소판 활성과(Chen *et al.*, 1996), 항 산화 활성을 나타내는 연구 결과가 보고 되었다 (Rendenbach-Muller *et al.*, 1994). 어린 순은 독특한 향기와 풍미가 있어 잎은 쌈채, 샐러드, 나물, 볶음 등 식용하여 왔다(홍정기 등, 2001).

최근에 생약 및 약리성 자원식물에 대한 관심이 고조되면서 유용물질을 생산하기 위한 세포배양에

관한 연구와(Ahn *et al.*, 2000), 자원식물의 대량증식을 위한 식물체 재분화 체계는 산형과에서 보고된 바 있다.(Steward *et al.*, 1958). 또한 갯방풍과 유사한 갯기름나물을 이용한 체세포배 분화 및 식물체 재분화와(Kim *et al.*, 2001 b), 털머위, 안동오이, 맥문동, 구기자 등 자원식물을 기내 배양하여 재분화를 유도한 방식 등(Lee *et al.*, 2002; Kwon and Cho, 1998; Kim *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2001 a)이 보고 되어왔다. 지금까지 갯방풍은 주로 실생번식을 하고 있으며 조직 배양을 통한 대량번식체계는 아직 확립되어 있지 않다. 본 연구에서는 개발가능성이 유망한 갯방풍의 안정적인 종묘생산을 위하여 기내 재분화 및 대량증식 체계를 확립하고, 안정적인 종묘 생산으로 연중 균일하고 우량한 갯방풍의 종묘를 체계적으로 공급하고자 실시하였다.

재 료 및 방 법

식물 재료

본 연구의 배양재료로 사용된 갯방풍(*Glehnia littoralis*)은 전북대학교 부속농장 실험온실에서 2003년 1월 25일에 파종하여 발아한 갯방풍에서 3월 초순에 어린 엽과 엽병을 채취하여 이용하였다. 채취한 오염원이 비교적 적은 어린 엽과 엽병을 70% 에탄올에서 1분간 침지소독을 한 후 2% sodium hypochlorite 용액에서 20분간 shaker에서 표면 살균하였다. 살균 후 멸균수로 4회 세척하고 멸균된 filter paper가 깔린 petridish 안에서 수분을 제거한 후 엽은 직경 약 0.5 × 0.5 cm, 엽병은 약 1 cm 정도의 크기로 자른 후 배양에 사용하였다.

캘러스 유도

캘러스 유도 배지는 MS(Murashige and Skoog, 1962)기본배지에 3% sucrose와 0.8% agar 및 0, 0.5, 1, 2 mg/L 2,4-D, NAA와 0, 1, 2 mg/L BA를 혼합 첨가한 12종의 배지를 제조하여 petridish에 각각 20절편씩 10반복으로 치상하였다.

치상을 종료한 petridish는 25℃, growth-chamber에

갯방풍(*Glehnia littoralis* Schmidt et Miquiel)에서 캘러스 유도 및 식물체 재분화에 미치는 성장조절제의 효과

서 암배양하였고, 배양 후 35일에 캘러스 유도율 조사를 시작하였으며, 캘러스 유도율과 부정아 발생율을 조사하였다.

식물체 재분화 및 순화

식물체 분화배지는 0, 0.5, 1 mg/L IAA, NAA과 0, 1, 2 mg/L BA를 혼합한 11종의 배지를 제조하였고, 유도된 캘러스를 petridish에 20개씩 5반복 치상하여 식물체 분화배지에 옮겨 재분화를 유도하였다. 배양 조건은 growth-chamber에서 명배양조건으로 배양 65일까지의 재분화 개체수를 조사하였다. 이후 재분화된 식물체를 동일배지에 배양하여 shoot를 발생시켜 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 기본 배지에 건전한 유식물체를 옮겨 30일간 배양하여 발근을 유도하였다. 발근 배양 후 4~5매의 잎이 전개되었을 때 30~40 mm, 50~60 mm의 초장에 따라 분리하여 vermiculite를 채운 32공 육묘 tray에 이식하였다. 이식 후 건조하지 않을 정도의 습도를 유지해주며 2~3일이 지난 후부터 공기순환구멍을 일정 간격으로 열어 외부환경과 적응하도록 하고 7일째에는 wrap을 제거하였다. 이후 산광상태에서 2주 동안 순화시켜

초장의 길이에 따른 생존율을 조사한 후 포장에 정식하였다.

결과 및 고찰

캘러스 유도에 미치는 성장조절제의 효과

갯방풍의 엽과 엽병을 성장조절제가 혼합 첨가된 MS 기본배지에 치상한 후 암배양조건에서 배양 5주째 조직의 팽대현상과 유백색의 캘러스가 유도되었다(Fig. 1).

갯방풍의 엽과 엽병 절편조직으로부터 캘러스 유도에 미치는 영향을 조사한 결과 성장조절제의 종류와 농도에 따라 유도반응에 차이를 나타냈다. 성장조절제가 첨가되지 않은 배지에서는 캘러스가 유도되지 않았고, auxin과 BA의 조합처리에서 2,4-D와 BA가 혼합된 배지에서 캘러스의 유도와 생장이 비교적 양호하였으나, NAA와 BA의 혼합처리에서는 캘러스의 유도와 생장이 느리게 나타났다(Table 1).

식물체의 부위별 캘러스 유도양상은 엽과 엽병의 조직 간에 큰 차이는 보이지 않았지만 캘러스 유도

Table 1. Effects of growth regulators on callus induction from leaf and petiole of *Glehnia littoralis*

Growth regulators(mg/L) ^a			Frequency of callus induction(%) ^b		Frequencies of adventitious buds(%) ^c	Frequencies of adventitious buds(%) ^c
2,4-D	NAA	BA	Leaf	Petiole	Leaf	Petiole
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1.0	0.0	1.0	26.0	35.0	0.0	0.0
1.0	0.0	2.0	30.0	37.0	0.0	0.0
2.0	0.0	1.0	53.0	56.0	0.0	0.0
2.0	0.0	2.0	55.0	59.0	0.0	0.0
0.0	0.5	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.0	0.5	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.0	1.0	1.0	22.0	31.0	52.0	0.0
0.0	1.0	2.0	28.0	34.0	55.0	0.0
0.0	2.0	1.0	41.0	48.0	31.0	0.0
0.0	2.0	2.0	45.0	50.0	34.0	0.0

^a : Plant Growth regulators were added to MS basal medium.

^{b,c} : Total number of explant was 100 per treatment.

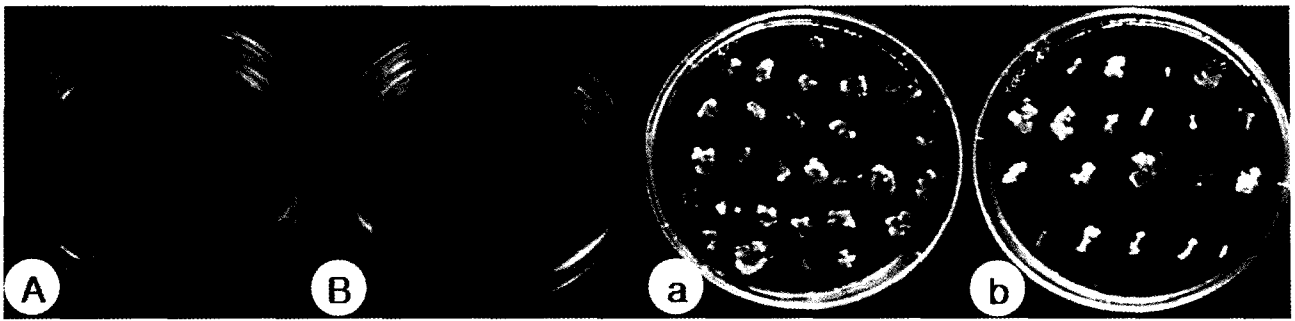


Fig. 1. Explants derived from (A) leaf and (B) petiole in *Glehnia littoralis*. Callus induced from (a) leaf and (b) petiole explants of *Glehnia littoralis*.

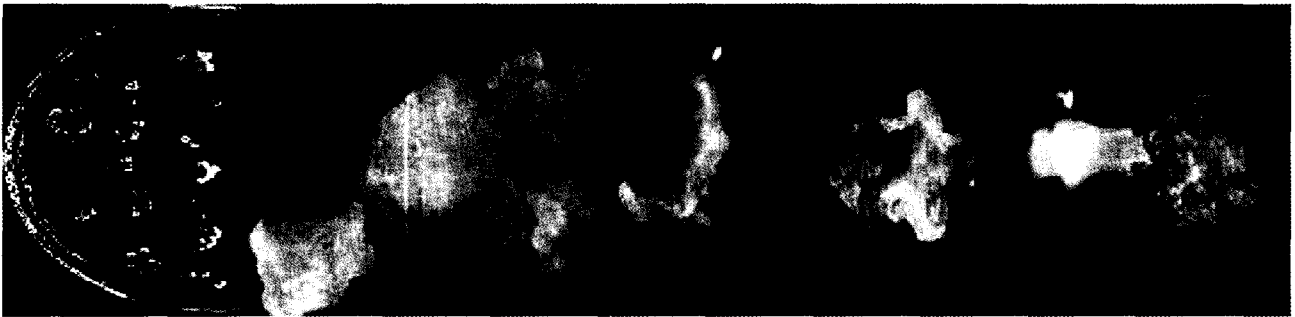


Fig. 2. Adventitious buds developed from callus of leaf explants in *Glehnia littoralis*.



Fig. 3. The growth of adventitious bud developed from callus of leaf explants on MS basal medium. A number of adventitious buds were regenerated into plantlets with shoot and root.

율과 생장은 엽병조직에서 양호하였고, auxin에 농도에 따른 캘러스 유도율은 NAA보다 2,4-D가 보다 효율적인 것으로 보며, 1~2 mg/L 2,4-D와 BA의 혼용처리, 1~2 mg/L NAA와 BA 혼용처리에서 높은 유도율을 보였다(Table 1). 또한 캘러스 유도에 미치는 생장조절제의 영향에 대한 많은 연구가 보고되었는데, 털머위에서 2,4-D, NAA와 BA의 혼용조합의 경우 2,4-D 단독첨가 배지에서만 높은 캘러스 유도율을 나타내는 반면, 갯기름나물의 2,4-D와 NAA 첨가 배지에서 모두 높은 캘러스 유도율 양상은 본 실험

과 유사한 결과이다. 또한 엽조직으로부터 캘러스를 유도하기 위해서는 고농도의 NAA와 kinetin이 요구된다고 하였는데(Seong *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2002) 이와 달리 갯방풍에서는 낮은 농도에서도 캘러스의 유도율이 높았다.

생장조절제에 따른 부정아 발생

부정아의 발생빈도는 2,4-D와 BA의 조합에서는 관찰되지 않았지만, NAA와 BA의 조합에서는 1~2 mg/L NAA와 1~2 mg/L BA의 혼용조합에서 배양 8

Table 2. Effects of growth regulators on plant regeneration from the callus derived from leaf and petiole of *Glehnia littoralis*

Growth regulators(mg/L)a			Leaf		Petiole	
IAA	NAA	BA	NP ^b	(%)	NP ^b	(%)
0.0	0.0	0.0	0	0	0	0
0.0	0.0	1.0	2	3.3	4	6.6
0.0	0.0	2.0	6	10	7	11.6
0.5	0.0	1.0	20	33.3	23	38.3
0.5	0.0	2.0	27	45.0	30	50.0
1.0	0.0	1.0	35	58.3	37	61.6
1.0	0.0	2.0	42	70.0	43	71.6
0.0	0.5	1.0	47	78.3	47	78.3
0.0	0.5	2.0	48	80.0	49	81.6
0.0	1.0	1.0	50	83.3	52	86.6
0.0	1.0	2.0	53	88.3	55	91.6

^a : Plant Growth regulators were added to MS basal medium; Total of 60 calli was cultured.

^b : Number of plantlets per callus

주 후에 다수의 부정아와 부정근이 발생하였는데 배양 6주부터 캘러스의 표면이 녹화현상을 보이며 시작되었고(Fig. 2), 부정아의 발생 후 부정근이 발생하였다. 부정아는 대부분 캘러스 유도과정을 지난 후에 간접적으로 발생하였고, 재분화된 부정아와 부정근을 호르몬이 첨가되지 않은 MS 기본배지에 계대배양하여 정상적인 식물체로 발달시켰다(Fig. 2, 3).

갯방풍과 유사한 갯기름나물에서 발생양상과 같이 이 연구에서도 캘러스로부터 기관분화를 통한 간접적인 부정아의 발생양상은 비슷한 결과이지만, 갯기름나물에서 엽병 조직에서 발생한 것(Kim *et al.*, 2001 b)과는 달리 갯방풍에서는 엽조직에서 부정아와 부정근이 발생하였다.

식물체 재분화에 미치는 생장조절제의 효과

갯방풍의 식물체 분화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MS 기본배지에 IAA, NAA와 BA가 첨가된 11종의 재분화 배지에 계대배양하여 배양 후 65일에 재분화체 수를 조사하였다 (Table 2).

계대배양 후 대부분 신초가 먼저 분화되어 식물체로 발달되었고 점차 뿌리가 발생하였다. 11종의 재분화 배지에서 IAA, NAA, BA의 무첨가와 BA의 단독 첨가 배지조합에서는 재분화가 이루어지지 않

았고, 혼용된 배지의 조합에서 대부분 높은 재분화율을 보였으며, 또한hormone의 농도가 높을수록 점차 높은 양상을 보였다.

식물생장조절제가 단독 또는 혼용된 11종의 조합 중 재분화율은 1 mg/L NAA와 2 mg/L BA을 첨가한 배지에서 높게 나타났으며 auxin류 간 비교에서는 IAA보다 NAA첨가배지에서 식물체 분화가 활발하게 이루어졌다. 배양조직별 식물체 분화율은 엽보다는 엽병조직에서 높게 나타났고, 따라서 갯방풍에서 캘러스로부터 식물체의 분화율을 높이기 위한 적절한 식물생장조절제의 농도는 1mg/L NAA과 2mg/L BA를 첨가한 혼용조합이다(Fig. 4, A).

이와 같은 결과는 구기자 나무, 국화, 참외, 딸기, 배추 등의 경우에서 보고 되어졌고 hormone의 단독 처리나 BA와 IAA의 혼용처리보다 BA와 NAA의 혼용처리에서 재분화가 높은 양상을 보인 것과 본 실험결과는 유사하였다(Kim *et al.*, 2001 a; Moon *et al.*, 2000; Kaul *et al.*, 1990; Hachey *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 1998).

캘러스로부터 식물체 조직별 재분화율의 차이는 크게 나타나지는 않았지만 엽 보다는 엽병 조직이 조금 높은 양상을 보였다.

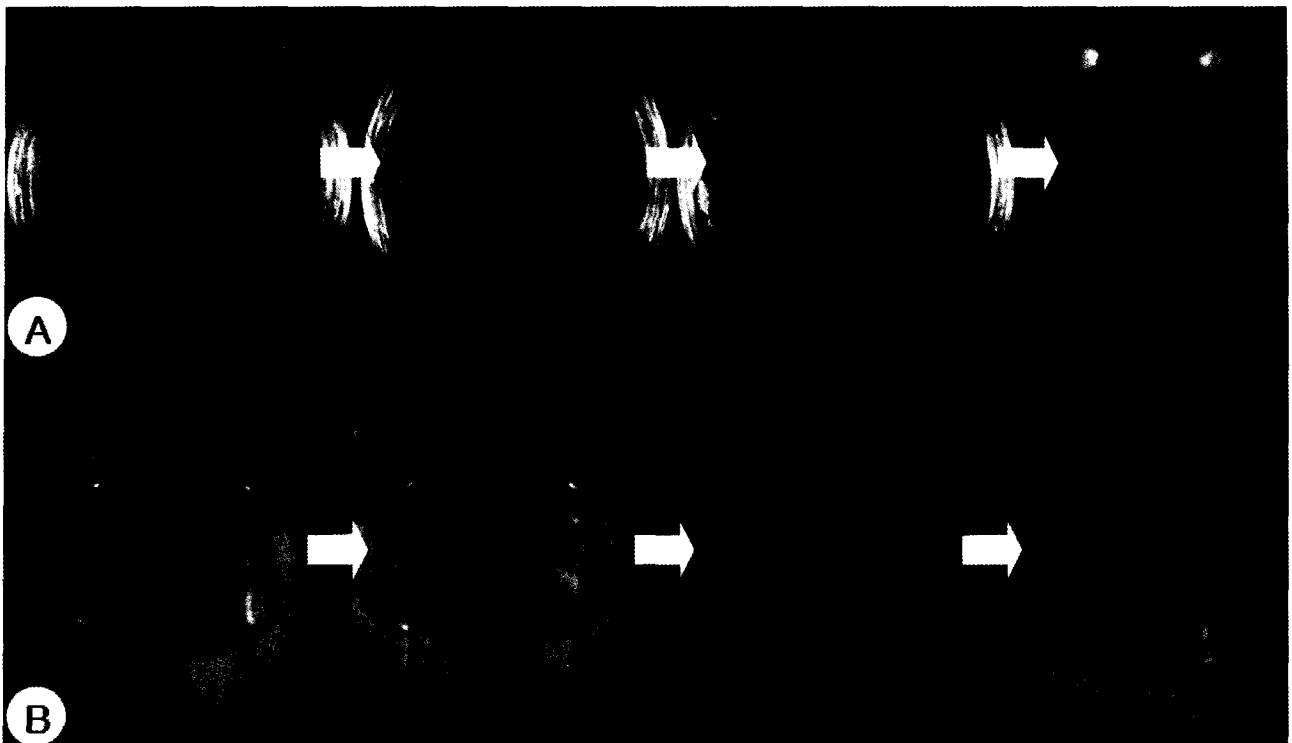


Fig. 4. Plantlets regenerated from callus on MS regenerate-medium. (A) Multiple shoot developed from callus, (B) Regenerated plants in rooting medium.

Table 3. Effect of plantlet height on the survival of acclimatized plantlets in vermiculite

Plant height (mm)	Number of tested plantlet	Number of survival plantlet	Survival rate (%)
30~40	60	54	90.0
50~60	88	88	100.0
Total	148	142	95.9

유식물체의 초장에 따른 순화율

재분화 배지에서 형성된 식물체를 기내 대량증식시키기 위해 동일조합의 배지에 계대배양하여 multiple shoot를 발생시키고 활력있는 유식물체를 분리하여 MS 기본배지에 옮겨 뿌리를 유도했다 (Fig. 4). 뿌리를 충분히 발달시킨 후 멸균된 vermiculite에 이식한 후 식물체의 초장에 따른 생존율을 비교한 결과 초장이 30~40 mm 크기의 식물체의 생존율은 초장 50~60 mm 크기의 식물체보다 10% 낮은 결과를 보였으나, 전반적인 생존율은 95.9%로 높은 양상을 보였다(Table 3, Fig. 5).

마지막 순화단계를 거쳐 포장에 이식하였을 때

모든 개체가 양호한 생육을 보였다(Fig. 5).

이와 같이 갯방풍은 기내 뿌리 형성과 발달, 토양에 대한 뿌리의 활착률이 우수하여 재분화된 식물체의 생존율이 높기 때문에 향후 조직배양을 이용하여 기내증식을 위한 체계를 확립하는데 양호한 조건을 갖추었음을 볼 수 있다.

식물의 조직배양은 품종, 식물체 배양부위, 성장 조절제의 요인들에 큰 영향을 미치게 된다. 이에 따라 재분화 양상도 달리 나타나는데, 갯방풍의 안정적인 종묘생산을 위한 조직배양의 대량증식체계를 확립하기 위해서는 우선 식물체의 재분화율이 보다 높게 유지될 수 있는 조건을 갖추는 것이 중요하므

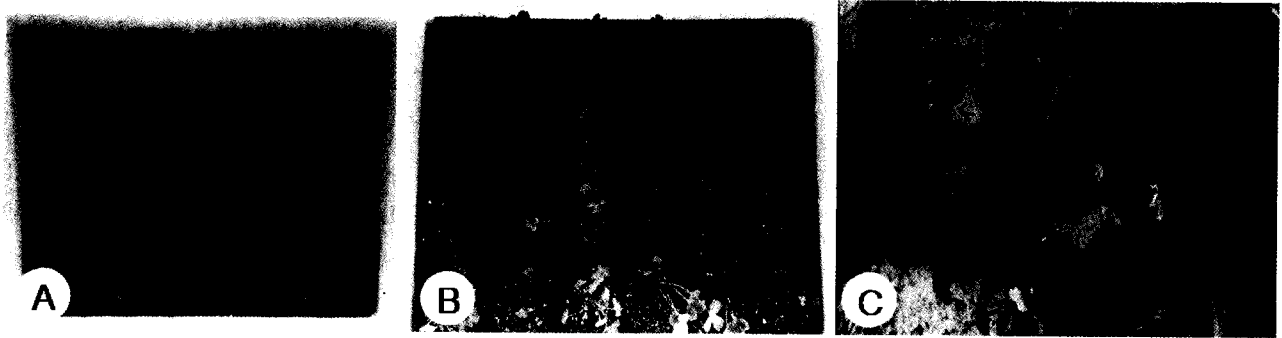


Fig. 5. Regenerated plantlets (A), (B) in acclimation and (C) transplanted in soil.

로 이에 대한 보다 깊은 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

적요

갯방풍의 캘러스 유도와 식물체 재분화에 영향을 미치는 성장조절제에 대한 몇 가지 요인들을 조사하였다. 식물체 조직으로부터 캘러스의 유도에 적절한 배지의 조건은 1~2 mg/L 2,4-D와 1~2 mg/L BA 혼용 처리 조합에서 캘러스의 유도율이 높았고, 조직별 캘러스 유도율은 엽조직 보다 엽병에서 우수하였으나, 다른 식물의 부정아 발생 양상과 달리 엽조직에서 발생한 캘러스로부터 부정아와 부정근의 형성을 보였다. 조직별 캘러스의 식물체 분화율은 식물성장 조절제의 농도가 높을수록 양호하였고 적정농도는 1 mg/L NAA와 2 mg/L BA 이었다. 이후 분화된 식물체를 계대배양하여 대량증식을 위해 multiple shoot를 발생시키고 뿌리를 발생 시킬 수 있도록 발근배지에 옮겨 생육 시킨 후 식물체의 초장에 따라 vermiculite에 순화시켜 생존율을 조사한 결과 높은 생존율을 보임을 알 수 있었다.

인용문헌

Ahn JC, Hwang SJ, Hwang B. 2000.

Micropropagation of some medicinal plants and

production of valuable secondary metabolites by organ culture. *Kor J Medicinal Crop Sci.* 8:12-25.

Chen IS, Chang CT, Sheen WS, Teng CM, Tsai IL, Duh CY, Ko FN. 1996.

Comarin and antiplatelet aggregation constituents from formosan *Peucedanum japonicum*. *Phytochemistry.* 41:525-530.

Choi JY, Kim HJ, Hyung NI. 1998.

Plant regeneration via organogenesis from leaf and stipule segments of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch). *Kor J Plant Tiss Cult.* 25:347-351.

Hachey JH, Shama KK, Moloney MM. 1991.

Efficient shoot regeneration of *Brassica campestris* using cotyledon explants cultured in vitro. *Plant Cell Rep.* 9:549-554

Kaul V, Miller RM, Hutchinson JF, Richards D. 1990.

Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelez. (syn. *Crysanthemum molifolium* Ramat.). *Plant Cell Tiss Org Cul.* 21:21-30.

Kim DC, Chung HJ, Min BH, Yang DC. 2001 a.

Plant regeneration from leaf and internode segment cultures of Boxthorn (*Lycium chinense* Mill). *Kor J Plant Tiss Cult.* 28:329-333.

Kim YC, Kim SM, Lee SH, Kwon YC, Kim HY. 1996.

Callus induction and plant regeneration efficiency according to tissue culture conditions in *Liriope platyphylla*. *Kor J Breed* 28:194-198.

- Kim OT, Kim KS, Ahn JC, Hwang B. 2001 b.
Plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis from *Peucedanum japonicum* Thunb. Kor J Plant Tiss Cult. 28:21-24.
- Kwon ST, Cho MS. 1998.
Callus induction and somatic embryogenesis from *Sicyos angulatus* L. Kor J Plant Tiss Cult. 25:119-123.
- Lee SY, Yoo SO, Bae JH, Lee JH. 2002.
Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration of *Farfugium japonica*. Kor J Plant Biotechnol. 29:45-49.
- Moon JG, Choo BK, Doo HS, Kwon TH, Yang MS, Ryu JH. 2000.
Effects of growth regulators on plant regeneration from the cotyledon explant in oriental melon (*Cucumis melo* L.). Kor J Plant Tiss Cult. 27:1-6.
- Murashige T, Skoog F. 1962.
A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15:473-497.
- Park BK, Lee SB. 2000.
Ecological characteristics of *Glehnia littoralis* Schmit et Miquel at Tae-an Peninsula in Korea. Kor J Intl Agri. 12:287-297.
- Rendebach-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.
- Seong NS, Park CH, Lee ST, Youn KB. 1993.
Callus induction and plant regeneration from axillary bud of *Aconitum camichaeli* Debx. Kor J Breed. 25:222-229.
- Steward FC, Mapes MO, Mears K. 1958.
Growth and organized development of cultured cells. Am J Bot. 45:653-704.
- 홍정기, 함승시, 박철호, 장광진, 김원배. 2001.
산채생산이용학. 도서출판 진솔 246-249.
- (접수일 2004. 3. 02)
(수락일 2004. 5. 20)