식물생명공학회지 제32권 제3호
Korean J. Plant Biotechnol.
Vol. 32, No. 3, 195~199 (2005)

홍경천 (*Rhodiola sachalinensis* A. Bor) 잎절편으로부터 식물체 재분화에 미치는 Cytokinin과 Putresine의 영향

배기화[1], 임 순[2], 윤의수[3], 신차균[1], 김윤영[1], 김윤수[1*]
[1]중앙대학교 인삼산업연구소, [2]한국생명공학연구원 식물세포공학연구실, [3]공주대학교 생물학과

Effect of Cytokinin and Putrescine on Plant Regeneration from Leaf Explant of *Rhodiola sachalinesis* A. Bor

Ki-Hwa Bae[1], Soon Lim[2], Eui-Soo Yoon[3], Cha-Gyun Shin[1], Yoon-Young Kim[1], Yun-Soo Kim[1*]
[1]Korea Ginseng Institute, Chung-Ang University, Anseong, 456-756, Korea
[2]Laboratory of Plant Cell Biotechnolgy, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 52 Oun-dong, Yusung, Daejun 305-806, Korea
[3]Department of Biological Science, Kong-ju National University, Gongju, 314-701, Korea

ABSTRACT The effects of cytokinin and putrescine on adventitious shoot induction from leaf explant of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor were investigated. Among cytokinin used in this experiment, BA was more effective on adventitious shoot induction and shoot elongation than kinetin. Especially, 1 mg/L BA was the best to increase adventitious shoot induction (71%) and shoot elongation (3.0 mm). In addition, 100 mM putrescine in MS medium with 1 mg/L BA was higher in adventitious shoot induction (93%) and shoot elongation (3.8 mm) than single treatment of 1 mg/L BA. Adventitious shoots induced in this experiment rooted on 1/2 MS medium and acclimated over 95% on composed soil (peatmoss:sand=1:1).

Key words: Adventitious shoot, BA, kinetin, putresine, *Rodiola sachalinensis*

서 론

홍경천 (*Rhodiola sachalinensis* A. Bor)은 다년생 초본식물로써 근경으로 번식하는 돌나물과의 돌꽃속 식물이다. 돌꽃에 속하는 식물은 전 세계에 96종이 밝혀지고 있으며 전체의 약 70%가 중국 고산지역 (해발 2,000~3,000 m)에 분포하고, 약 24종만이 유럽등지에서 자생하고 있다 (Jiang 1994). 일반적으로 홍경천은 온도가 낮고 건조하며 낮과 밤의 온도차가 큰 지역에서 생존할 수 있는 특수한 적응성을 가진 식물로 알려져 있다.

홍경천은 중국의 전통 약용식물로 원기를 회복시키고 질병과 체내독소축적을 극복할 수 있는 약으로 이용되어져 왔다. 현대의학적인 측면에서의 주요한 효능은 당뇨병,기억력회복, 산소결핍증, 산업능력개선, 진정 및 해열 기능이 보고되고 있다 (Petkov et al. 1986; Ming 1988). 이러한 작용을 보이는 대표적인 생리활성 물질은 현재까지 salidroside와 p-trysol이 알려져 있다 (Linch et al. 2000). 이 가운데 salidroside는 중추신경의 억제작용, 강심작용, 아드레날린에 의한 혈당저하를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Zhong et al. 1991; Lee et al. 2000). 이러한 기능은 동양의 대표적인 약용식물인 인삼과 가시오갈피의 약리효능과도 유사한 것으로 중국 서장지역에서는 1000년 전부터 잘 알려진 약용식물이다. 또한 홍경천은 salidroside와 같은 주성분이외에도 전분, 단백질, 지방, 탄닌, 플라보노이드 화합물과 아스파라긴산, 트레오닌, 글루타민산, 글리신과 각종 아미노산을 함유하고 있는 것으로 잘 알려져 있다 (Linch et al. 2000).

*Corresponding author Tel 031-676-9063 Fax 031-676-9064
E-mail: yunsoony@hanmail.net

최근 국내에서 홍경천에 대한 연구는 돌나물과 *Sedum* 속 식물체의 잎절편으로부터 식물체 재분화에 관한 연구 (Yoon 1997; Ahn and Lee 2004)와 홍경천의 캘러스배양을 통한 salidroside의 생산에 대한 연구 (Kim et al. 2004)가 활발히 보고되면서 연구자들의 관심이 증가되고 있으나 지금까지 홍경천의 약리효능에 대한 연구만이 일부 국한된 중국 연구자들에 의해서 이루어지고 있을 뿐 (Xu et al. 1998a; Xu et al. 1998b; Li and Chen 2001; Han et al. 2002; Wu et al. 2003; Yan et al. 2004), 식물체를 대량번식하여 주요 약리성분인 salidroside를 대량생산하기위한 노력은 아직 활발히 진행되고 있지 못한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 백두산에서 채취한 홍경천 종자로부터 발아된 잎절편에 6-benzylamino purine (BA)와 kinetin 및 putrescine을 이용하여 부정아 (adventitious shoot)를 유도함으로써 식물체를 재분화하고자 하였으며, 이를 통하여 현재 국내에 자생하지 않는 홍경천의 유전자원을 확보하고자 하였다. 또한 이들의 대량번식 조건을 확립하여 홍경천을 이용한 세포 및 부정근 배양을 위한 식물재료를 공급하고자 하였다. 이러한 연구는 홍경천과 같은 약용자원의 유전자원을 확보할 수 있는 유용한 방법을 제시할 뿐만 아니라 salidroside의 대량생산을 위한 부정근과 모상근의 식물재료를 원활하게 공급할 수 있다는 측면에서 향후 연구에 많은 도움을 줄 것으로 기대된다

재료 및 방법

식물재료

백두산에서 채취한 홍경천 (*R. sachalinensis*) 종자를 유리온실에 파종한 후, 발아된 잎절편을 식물재료로 사용하였다. 잎절편은 70% 에탄올에 약 30초간 침지 후 2~3회 멸균수로 수세하고 NaOCl 1% (v/v)에 10분간 표면살균하였다. 표면살균 후 멸균수를 이용하여 4~5회 수세한 다음, 멸균된 여과지 (Whatman, No 2) 위에서 수분을 제거한 후 부정아를 유도하기 위한 식물재료로 사용하였다.

Cytokinin을 이용한 부정아의 유도

부정아의 유도에 cytokinin이 미치는 영향을 조사하기 위해서 표면살균된 잎절편 (1.5×0.5 cm)은 sucrose 3% (w/v)과 gerlite 0.35% (w/v) (Duchefa, The Netherlands)가 포함된 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에 BA (0, 1, 3, 5, 7 mg/L)와 kinetin (0, 1, 3, 5, 7 mg/L)을 각각 단용처리한 petridish (90×15 mm)에서 6주간 배양하였다. 배양은 각 페트리디쉬에 10개의 절편체를 접종하여 3반복으로 이루어졌다. 배양실의 온도는 25±2℃으로 조정하였으며, 광도는 형광등을 이용하여 약 30 μmol/m^2/sec^{1}로 하여 16시간의 명조건으로 유지하였다.

Putrescine을 이용한 고빈도 부정아의 유도

고빈도의 부정아를 유도하기 위하여, BA 1.0 mg/L이 포함된 MS 배지에 putresine (Sigma Co., USA)을 각각 0, 50, 100, 150, 200 mM로 혼용하여 6주간 배양하였다. 모든 배지는 sucrose 3% (w/v)과 Gerlite (Duchefa Co., The Netherlands) 3.5 g/L 을 포함하고 있으며, 배양방법과 조건은 상기한 실험과 동일하게 수행되었다.

발근 및 토양순화

발근을 위하여 부정아로부터 증식된 유식물체 (약 1 cm 길이)는 1/2 MS 고체배지가 담긴 120×80 mm의 배양용기 (Phytohealth, SPL)로 이식하여 6주간 발근과 줄기신장을 유도하였다. 모든 배양은 25±2℃의 배양실에서 30 mol/m^2/sec^1 (16시간의 명조건)의 광도로 이루어졌다. 발근과 신장이 완료된 7~8 cm의 기내식물체는 흐르는 물로 뿌리를 깨끗하게 씻은 후, peatmoss : sand를 1 : 1로 혼합한 상토를 포함한 pot에 이식하여 순화하였다.

결과 및 고찰

Cytokinin을 이용한 부정아의 유도, 증식 및 순화

홍경천의 잎절편으로부터 부정아를 유도하기 위하여 BA와 kinetin을 다양한 농도로 처리한 결과, 배양 2주 후부터 대조구 (Figure 1A)를 제외한 모든 처리구에서 부정아가 다량으로 유도되기 시작하였으며 (Figure 1B, C), 약 6주 후에는 잎절편의 기부를 중심으로 유도된 부정아가 약 2.0~3.0 mm로 신장하였다 (Figure 1D). 처리된 두 종류의 cytokinin 가운데 BA의 처리가 kinetin의 처리보다 부정아의 유도 및 생장에 더욱 효과적인 것으로 나타났다. 특히, BA 1 mg/L에서의 부정아 유도 빈도는 71%로 가장 높게 나타났으며 절편체당 유도된 부정아의 수도 10.7개로 다른 처리구에 비하여 약 25~84%까지 많게 나타났다 (Table 1). 유도된 부정아의 신초길이 역시 BA 1 mg/L에서 3.0 mm로 가장 높게 나타났다. 본 실험의 결과와 같이 BA가 kinetin에 비하여 식물체의 재분화 효율을 증가시킨다는 결과는 다양한 식물체에서 보고된 바 있다 (Purohit and Dave 1996; Purohit and Singhvi 1998). 특히, Soumendra 등 (2000)은 pomegrante (*Punica granatum* L.)의 자엽으로부터 부정아 유도시 배지내 BA의 첨가가 동일한 양의 kinetin보다 부정아의 유도와 신초생장을 더욱 증가시키는 것으로 보고한 바 있다.

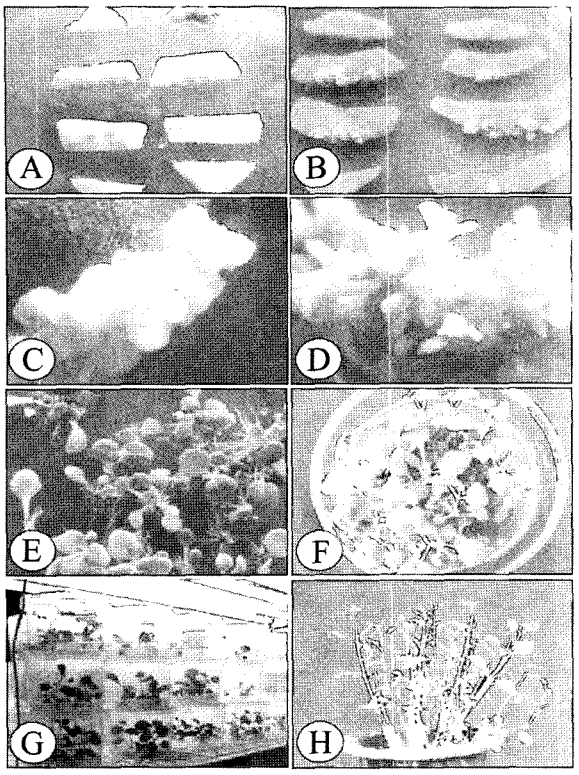

Figure 1. Plant regeneration from leaf explants of *Rhodiola sachalinesis* A. Bor. A: Leaf explants cultured on MS medium without BA 1 mg/L for 2 weeks, B and C: Multiple shoot primordia on MS medium with BA 1 mg/L after 2 weeks of culture, D: Adventitious shoots on MS medium with BA 1 mg/L after 6 weeks of culture, E: Roots emerged from adventitious shoot after 2 weeks on 1/2 MS medium, F and G: Shoot elongation and micropropagation on 1/2 MS medium, H: Acclimatization in pot containing peatmoss and sand.

이상과 같이 BA 1 mg/L이 포함된 배지에서 유도된 부정아를 적출하여 1/2 MS배지에 접종함으로써 발근을 유도하였다. 발근 배지에서 약 2주 배양된 후, 부정아로부터 뿌리가 유도되는 것 (Figure 1E)을 확인할 수 있었으며 동일배지에서 약 4주간 배양 후에는 잘 발달된 뿌리와 줄기의 신장이 이루어진 것을 확인할 수 있었다 (Figure 1F). 상기 발근 배지에서 6주 배양 후, 기내유식물체는 약 7~8 cm로 신장하여 배양용기를 가득 채웠다 (Figure 1G). 배양용기에서 생장한 유식물체를 깨끗이 세척하여, peatmoss와 sand가 1:1로 포함된 상토에 이식하였을 때, 유식물체는 별도의 추가 처리 없이 1주일 만에 95%이상이 정상적으로 순화되었다 (Figure 1H).

Putrescine을 이용한 고빈도 부정아의 유도, 증식 및 순화

고빈도의 부정아를 유도하기 위하여, BA 1 mg/L가 포함된 MS 배지에 putresine을 각각 0, 50, 100, 150, 200 mM로 혼용하여 6주간 배양한 결과는 Table 2와 같다. Putrescine을 첨가한 배지에서 2주간 배양한 잎절편에서는 모든 절단면이 비대해지면서 분열조직인 캘러스가 형성되었으나, putrescine을 첨가하지 않고 BA 1 mg/L를 첨가한 배지에서는 이러한 분열현상이 현저하게 저하되는 결과를 나타냈다 (데이터 미제시). 다양한 농도의 putrescine을 첨가한 MS배지에서 잎절편을 6주간 배양한 결과, putrescine 100 mM을 첨가한 배지에서 부정아의 유도 빈도는 93%로 가장 높게 나타났으며 절편체당 유도된 부정아의 수도 14.2개로 다른 처리구에 비교하여 증가하였다 (Table 2). 이러한 결과는 BA 1 mg/L를 단용처리한 결과보다 유도빈도와 부정아 수가 각각 약 10%와 20%가 증가된 결과이다. 또한 신초의 길이에서도 3.8 mm로 BA의 단용처리에 비하여 약 10 mm가 증가한 것으로 나타났다 (Figure 2). 반면에 putrescine 100 mM이상 처리구에서의 절편체들은 약 50%이상이 절단면에 갈변현상을 일으키며 고사되는 것으로 관찰되었으며 절편체당 부정아의 수도 현저히 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 폴리아민류의 생장조절제인 putresine이 배지에 적당량 첨가되었을 때는 식물생장과 분화에

Table 1. Effect of cytokinin on adventitious shoot multiplication from leaf explants of *Rodiola sachalinensis* A. Bor after 6 weeks of culture

Cytokinin (mg/L)		Regeneration frequency (%)	No. of shoot/ explant[z]	Shoot length (mm)[z]
Control		0	0 e	0 f
BA	1	71	10.7 ± 0.6 a	3.0 ± 1.3 a
	3	53	8.0 ± 1.0 b	1.2 ± 0.7 bcd
	5	47	7.0 ± 1.0 b	1.0 ± 0.3 c
	7	20	3.0 ± 0.5 c	0.4 ± 0.1 e
Kinetin	1	11	1.7 ± 0.6 d	0.7 ± 0.3 cde
	3	20	3.0 ± 1.2 c	1.3 ± 0.7 bcd
	5	50	7.7 ± 0.6 b	1.4 ± 0.3 bc
	7	20	3.0 ± 0.7 c	0.7 ± 0.2 de

[z]Data were represented to the mean±SD and DMRT of 30 leaf explants.

Table 2. Effect of putrescine on adventitious shoot multiplication from leaf explants of *Rodiola sachalinensis* A. Bor after 6 weeks of culture

Putrescine (mM)	Regeneration frequency (%)	No. of shoot/ explant[z]	Shoot length (mm)[z]
0	67	10.2 ± 1.6 b	2.8 ± 0.9 b
50	79	11.3 ± 0.6 a	2.7 ± 0.2 b
100	93	14.2 ± 1.2 a	3.8 ± 0.7 a
150	53	8.6 ± 1.3 c	1.8 ± 0.3 c
200	44	6.4 ± 0.5 d	2.3 ± 0.5 c

[z]Data were represented to the mean±SD and DMRT of 30 leaf explants.

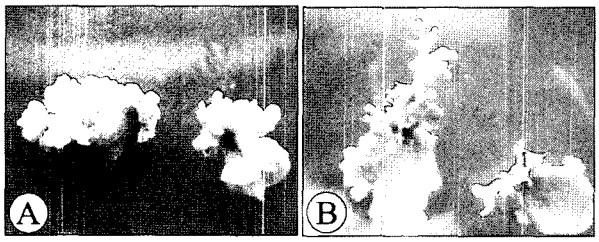

Figure 2. Comparison of adventitious shoot induced on MS medium with BA 1 mg/L (A) and on MS medium with BA 1 mg/L and putrescine 100 mM after 6 weeks of culture.

시너지효과로 작용하지만 (Valero et al. 1999), 적정수준 이상의 putrescine처리는 배양용기내 에틸렌 생성을 촉진시켜 식물체내의 노화를 촉진함과 동시에 식물체의 정상적인 분화를 억제하는 것으로 알려져 있다 (Crisosto et al. 1988; 1992). 본 실험에서 유도된 부정아의 발근과 순화 역시 95%이상 정상적으로 이루어졌다. 이상의 결과는 현재 우리나라에 일반적으로 분포하지 않지만, 약용자원으로써 중요한 재료로 인정받고 있는 홍경천의 대량증식 가능성을 제시한 결과로, 향후 홍경천에서의 salidroside 생산능력을 증대시키는 metabolic engineering 연구와 식물공학의 방법을 이용한 salidroside의 대량생산 연구에 중요한 식물재료를 공급할 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

홍경천 (*Rhodilola sachalinensis* A. Bor)의 잎절편로부터 부정아를 유도하고자 BA와 kinetin을 처리한 결과, BA의 처리가 kinetin의 처리보다 부정아 유도와 신초의 생장에 양호한 것으로 나타났으며, 특히 BA 1 mg/L처리에서 부정아 유도빈도와 신초길이는 각각 71%와 3.0 mm로 가장 높게 나타났다. 또한 고빈도의 부정아를 유도하고자 다양한 농도의 putrescine를 처리한 결과, putrescine 100 mM 처리에서 부정아 유도빈도가 BA 1 mg/L 단용처리보다 약 20%가 증가되었고 신초길이 역시 약 10 mm가 증가된 것으로 나타났다. 이상의 결과에서 유도된 부정아는 생장조절물질이 포함되지 않은 1/2MS배지에서 발근과 신장이 정상적으로 이루어졌으며 약 7 cm 정도 생장한 유식물체는 peatmoss:sand가 1:1로 혼합된 상토에서 약 95%이상 정상적으로 순화되었다.

사 사

이 논문은 2003년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2003-005-F00003).

인용문헌

Ahn JH, Lee SY (2004) Effects of growth regulators on callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Sedium sarmentation*. Kor J Plant Biotech 31: 25-29

Crisosto CH, Lombard PB, Richrdson DG, Tetley R (1992) Putrescine extends effective pollination period in 'Comice' pear (*Pyrus communis* L.) irrespective of post-anthesis ethylene levels. Sci Hort 49: 211-221

Crisosto CH, Lombard PB, Sugar D, Polito VS (1988) Putrescine influences ovulve sensecence, fertilization time, and fruit set in 'Comeice' pear. J Am Soc Hort Sci 113: 708-712

Han X, Zhang T, Wei Y, Cao X, Ito Y (2002) Separation of salidroside from *Rhodiola crenukata* by high speed counter current chromatography. J Chroma 971: 237-241

Jiang M, Zhong W, Han H (1994) Studies on producing effective medicinal ingredients of *Rhodiola sachalinensis* by tissue culture. Chin J Shen Univ 25: 355-359

Kim SJ, Hwang B, Hwang SJ, Ahn JC (2004) Production of salidroside from callus culture of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. Kor J Plant Biotech 31: 89-94

Lee MW, Lee YH, Park HM, Tosh SH, Lee EJ, Jang HD, Kim YH (2000) Antioxidant phenolic compounds from the roots of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. Arch Pharm Res 23: 455-458

Li HB, Chen F (2001) Preparative isolation and purification

of salidroside from the Chinese medicinal plant *Rhodiola sachalinensis* by high-speed counter-current chromatography. J Chroma A 932: 91-95

Linch PT, Kim YH, Hong SP, Jian JJ, Kang JS (2000) Quantitative determination of salidroside and tyrosol from the chromatography. Arch Pharm Res 23: 349-352

Ming HQ, Xia GC, Zhang RD (1988) Advanced research on *Rhodiola*. Chin Trad Herbal Drugs 19: 229-234

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

Petkov VD, Yonkov D, Mosharoff A, Kambourova T, Alova L, Petkov V, Todorov I (1986) Effects of alcohol aqueous extract from *Rhodiola rose* L. root on learning and memory. Act Physiol Pharmacol Bulg 12: 3-16

Pradhan C, Kar S, Pattnaik S, Chand PK (1998) Propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. through in vitro shoot proliferation from cotyledonary nodes. Plant Cell Rep 18: 122-126

Purohit SD, Dave A (1996) Micropropagation of *Stercula urens* Roxb. an endangered tree species. Plant Cell Rep 15: 704-706

Purohit SD, Singhvi A (1998) Micropropagation of *Achra sapota* through enhanced axillary ranching. Sci Hort 76: 219-229

Soumendra NK, Sitakanta P, Pradeep KC (2000) High frequency axillary shoot proliferation and plant regeneration from cotyledonary nodes of pomegranate (*Punica granatum* L.). Sci Hort 85: 261-270

Valero D, Martinez-Romero D, Serrano M, Riquelme F (1999) Polyamine roles on the post-harvest of fruits: a review. In: Pandalai S (Ed), Recent Research Development in Agricultural and Food Chemistry. Research Sign-post, Trivandrum, India, pp 39-55

Wu SX, Zu YG, Wu M (2003) High yield production of salidroside in suspension culture of *Rhodiola sachalinensis*. J Biotech 106: 33-43

Xu JF, Su ZG, Feng PS (1998a) Activity of tyrosol glucosyltransferase and improved salidroside production through biotransformation of tyrosol in *Rhodiola sachalinensis* cell culture. J Biotech 61: 69-73

Xu JF, Su ZG, Feng PS (1998b) Suspension culture of compact callus aggregate of *Rhodiola sachalinensis* for improved salidroside production. Enzym and Micro Tech 23: 20-27

Yan XF, Wu SX, Wang Y, Shang XH, Dai SJ (2004) Soil nutrient factors related to salidroside production of *Rhodiola sachalinensis* distributed in Chang Bai Mountain. Env Exp Bot 53: 267-276

Yoon ES (1997) Effect of plant growth regulators on plant regeneration from leaf and stem explant culture of *Sedium erythrostichum* Miq. Kor J Plant Biotech 24: 285-289

Zhong Y, Lowell K, Ping JA, Che CT, Pezzuto JM, Fong HH (1991) Phenolic constituents of *Rhodiola coccinea* a tibetan folk medicine. Planta Med 57: 589

(접수일자 2005년 7월 29일, 수리일자 2005년 9월 8일)