

극지식물 *Silene acaulis* subsp. *arctica*의 유근 유래 캘러스로부터 다신초 유도와 기내 증식

서효원^{1*}, 이정윤¹, 박영은¹, 강성호², 정호성², 김지희²
¹농촌진흥청 고령지농업연구소, ²한국해양연구원 부설 극지연구소

Multiple Shoot Induction from Radicle-derived Callus and *in Vitro* Propagation of *Silene Acaulis* Subsp. *Arctica*

Hyo-Won Seo^{1*}, Jung-Yoon Yi¹, Young-Eun Park¹, Sung-Ho Kang², Ho-Sung Chung² and Ji-Hee Kim²

¹National Institute of Highland Agriculture, RDA, Pyongchang 232-955, Korea

²Korea Polar Research Institute, KORDI, Incheon 406-840, Korea

ABSTRACT We describe here an efficient *in vitro* propagation method of *Silene acaulis* subsp. *arctica* (Caryophyllaceae), one of the higher arctic angiosperms, through the multiple shoot regeneration after callus induction from the radicle. The seeds of *S. acaulis* subsp. *arctica* collected from Svalbard, the Norwegian Arctic, were germinated and calli were induced from the radicle on solid MS media supplemented with 0.25 mg/L 2,4-D and 1 mg/L GA₃ at both 10±1°C and 23±1°C. Two weeks after callus induction, the multiple shoots were efficiently regenerated on the MS media supplemented with 0.25 mg/L BA and 0.05 mg/L NAA. The total biomass increment of regenerated shoots increased most efficiently of *S. acaulis* subsp. *arctica* was showed the maximum efficiency in at 23±1°C on 1/2 MS salt strength. The multiple regenerated plantlets of *S. acaulis* subsp. *arctica* were grown to normal plants on soil.

서 론

Silene acaulis 종은 석죽과 (Caryophyllaceae)에 속하는 다년생 식물 (Rønning 1996)로 북극과 북미 록키산맥과 스웨스 알프스 등 고산지역의 한랭한 기후대에 다양한 변종이 분포하며, 아종인 *S. acaulis* subsp. *arctica*는 Svalbard를 포함한 고위도 북극권 툰드라지역 (high-arctic dry tundra)의 대표적인 우점식물이다 (Kojima 2004). 이 식물은 불량한 생육환경에서 수분조건에 상관없이 비교적 잘 생육하며, 빙하에 의해 퇴적된 지역에서 생태적 천이계열의 대표적인 선구식물 (pioneer plant)로 알려져 있다. 또한 저온환경에서의 생육 전략으로 cushion 형태를 이루며 성장하지만 생육환경에 따라

성긴 형태로 생육하기도 한다 (Hagen and Spomer 1989). *S. acaulis* subsp. *arctica*가 가진 저온에 대한 저항성은 형태적인 특성 뿐 만 아니라 유전적인 요인도 관여하고 있음이 보고된 바 있다 (Körner and Larcher 1988, Junttila and Robbrecht 1993). 또한 *S. acaulis*는 한 개체에서 완전화와 암꽃이 같이 피는 독특한 생식양식인 자웅이주성 (gynodioecism)을 보이는 대표종으로 식물의 성 결정 및 화기 진화와 관련한 연구의 주요 연구재료로 활용되고 있다 (Hermanutz and Innes 1994, Delph et al 1999). 특히 식물의 진화과정에서 이루어지는 왕성한 mtDNA간의 유전자 재조합이 이루어진다는 증거를 제공한 식물로 확인되어 관련연구에 주요한 모델식물로 활용되고 있다 (Stadler and Delph 2002). *S. acaulis* subsp. *arctica*는 태양의 고도변화가 극히 적은 백야현상 기간에도 항상 남쪽방향의 영양체부위 (cushion)에서 먼저 개화되고, 이후 북쪽방향에서 개화가 이루어지는 독특한 개화 현상

*Corresponding author Tel 033-330-7815 Fax 033-330-1519

E-mail: shwonkwe

(compass flowering)을 나타낸다. 이처럼 방위에 민감하게 반응하는 특이한 개화 습성 (Rønning 1996)으로 인해 식물의 방위 감지 기능에 대한 연구의 대상 식물로 활용될 가능성이 크다.

북극권 (arctic circle)은 일반적으로 7월 평균기온이 10°C 인 등온선 이북 지역을 뜻한다. 이 지역에 분포하는 대부분의 식물들은 짧은 여름기간 동안 영양생장과 생식생장을 마쳐야 하므로 독특한 광합성 기작과 저온 적응기작을 가질 것으로 생각되고 있으나 관련연구 보고는 매우 드물다 (Robberecht and Junttila 1992). 특히 극지방의 백야현상으로 인해 암기장이 적은 생육환경에서 광합성과 동화 산물의 전이가 이루어지게 되므로 독특한 물질대사 기작을 가질 것으로 생각되나 극지식물을 활용한 연구 결과는 극히 적다. 본 연구는 북극지역에 우점하여 분포하는 *S. acaulis* subsp. *arctica*를 이용한 저온 대사관련 연구와 유용 유전자원의 서식지의 기내보존 기술을 확립하기 위해 수행되었으며, 자생지의 생육온도보다 높은 조건에서 효율적으로 증식시킬 수 있는 방법을 찾기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

식물재료

실험에 사용한 북극식물 *S. acaulis* subsp. *arctica*의 종자는 2005년도 7월 북극 다산과학기지가 소재하고 있는 노르웨이령 Svalbard제도 Spitsbergen의 Brøgger-halvøya 지역 (N 78° 55.064", E 11° 54.411)에서 채집하였다. 채집한 종자는 4°C에서 2개월간 저온처리 하였으며, 이후 종자를 살균하여 실험 재료로 사용하였다. 종자의 살균은 Lee 등 (2004)의 방법을 다소 변형한 방법으로 수행하였다. 선별한 종자를 하루 동안 증류수에 담가둔 후 70% 에탄올로 30초, 유효 염소농도 1.5%의 차아염소산나트륨용액으로 표면 살균하였으며, 이 후 멸균수로 5회 세척하고 흡수지로 수분을 제거하여 준비된 water agar에 치상하였다.

종자의 발아와 캘러스 유도

종자의 발아와 발아된 유식물체로부터 캘러스 유도는 실온 (23±1°C)으로 유지되는 배양실에서 수행하였다. 0.8% (w/v) water agar에서 발아된 후 약 5 mm 내외의 유근을 0.10, 0.15, 0.25 mg/L 2,4-D와 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L GA₃가 각각 조합된 농도로 조제된 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)에 옮겨 23±1°C 조건으로 배양하면서 캘러스를 유도하였다 (Table 1). 가장 왕성한 캘러스 증식을 보이는 배지상에서 캘러스의 직

경이 약 1 cm 이상이 될 때 까지 6주간 배양하였다. 이 후 녹화된 캘러스로부터 다신초를 유도하기 위해 서로 다른 종류와 농도의 식물생장조절제가 포함된 배지로 계대배양을 실시하였다.

캘러스로부터의 다신초 유도 및 기내 증식

형성된 캘러스는 BA (0.10, 0.25, 0.50 mg/L)와 NAA (0.05, 0.10, 0.15, 0.20 mg/L)가 각각 조합되어 첨가된 MS 배지에서 다신초 형성을 유도하였다. 배양조건은 서로 다른 농도로 조합된 성장조절물질들이 포함된 배지에 계대배양한 후 상온 (23±1°C) 조건의 배양기에서 배양하면서 조사하였다. 배양기 내의 조건은 광도가 3000±100 Lux로 조절된 식물생장용 형광등 아래에서 21/3h의 광주기로 고정하여 수행하였다. 적정 성장물질농도로 판단되는 배지조건으로 각각 4 캘러스 군체가 포함된 3~5반복의 배양을 수행하며 적정배양 조건을 확인하였다. 다신초로 재분화된 식물체의 적정 증식 온도 조건을 확인하기 위해서는 계대배양 이후 다신초가 재분화되는 것이 확인된 2주째에 일부 배양용기를 저온 조건인 10±1°C의 생육상에서 배양하면서 생체량 증가정도를 비교하였다. 다신초로 재분화된 식물체는 peat moss와 마사토를 1:1로 배합한 상토에 옮겨 50% 차광막 하에서 순화하고 생장시키면서 완전한 식물체로의 발달여부를 판단하였다.

Table 1. Effect of growth regulators on callus induction of *Silene acaulis* subsp. *arctica* cultured on MS solid medium.

Growth regulators (mg/L)		Callus induction index (0-4) ^{a)}
2,4-D	GA ₃	
0.10	0.5	0
	1.0	0
	1.5	1
	2.0	1
	0.5	1
0.15	1.0	1
	1.5	2
	2.0	1
	0.5	2
	1.0	4
0.25	1.5	4
	2.0	3

^{a)}0; non-induced, 1; 1-25%, 2; 26-50%, 3; 51-75%, 4; 75-100%

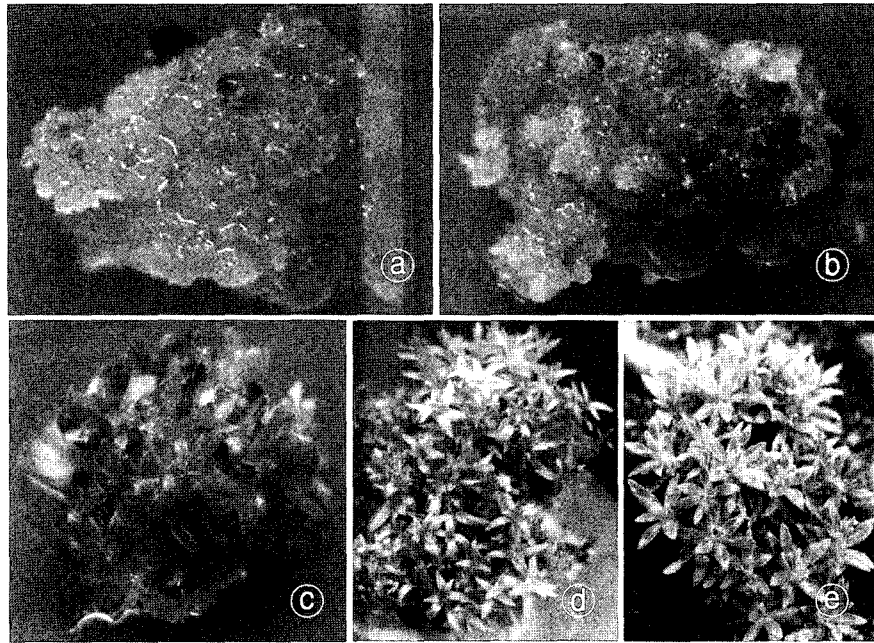


Figure 1. Multiple shoots regeneration from seedling-derived callus of *S. acaulis* subsp. *arctica* on 1/2 MS medium supplemented with 0.25 mg/L BA and 0.05 mg/L NAA at 23±1 °C of culture temperature. a, callus from radicle; b and c, early stage shoots induction from callus; d, regenerated multiple shoot from callus; e, acclimatized plants potted in soil.

결과 및 고찰

캘러스 유도와 다신초 형성 조건

유근으로부터의 캘러스 유도는 성장조절물질 0.25 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L GA₃가 포함된 1 MS 배지에서 가장 양호하였으며, GA₃가 1.5 mg/L로 포함된 배지에서도 비교적 잘 유도되었다 (Table 1). GA₃의 농도가 2.0 mg/L 이상, 2,4-D의 농도가 0.15 mg/L 이하의 조건에서도 캘러스 유도는 비교적 잘 되었으나 재분화가 이루어지기 곤란한 부서지기 쉬운 상태로 유도되었으므로 이후의 캘러스 배양은 0.25 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L GA₃가 포함된 배지조건으로 수행하였다. 또한 저온 (10±1 °C) 조건에서도 캘러스의 유도가 가능하였으나 유도된 캘러스의 생체량 증가는 상온에서 보다 훨씬 늦게 이루어지는 것으로 확인하였다 (결과 미제시). 유근으로부터 유기된 캘러스가 분화되지 않는 상태로 최초 4주간 녹화와 생장이 이루어져 미분화 캘러스의 생체량 증대를 위한 별도의 암배양은 수행하지 않았다 (Figure 1).

한편 캘러스에서 재분화한 식물체는 크기가 작고, shoot의 유합과 분지정도가 심하여 재분화된 shoot 수를 적정배지 선발의 판단 기준을 이용하는 것이 곤란하였다. 따라서 배양기간 내의 총 생체중 증가가 가장 큰 조건의 배지를 적정배지로 판단하였다. 다신초의 유도는 온도에 상관없이 0.25 mg/L BA와 0.05 mg/L NAA의 배지에서 최적의 결과를 나타내었다 (Table 2). 그러나 사용된 배지조건 대부분에서 shoot의 분화

Table 2. Effect of growth regulators on biomass increment of regenerated multiple shoots from calli of *S. acaulis* subsp. *arctica* radicle in half-strength MS medium.

Growth regulators (mg/L)		Biomass increment ^{a)} (g fresh weight/plant)	
BA	NAA	10±1 °C	23±1 °C
0.10	0.05	-	1.06±0.42
	0.10	-	1.75±0.83
	0.15	2.09±0.47	2.88±0.84
	0.20	1.98±0.52	3.06±0.91
0.25	0.05	2.34±0.74	3.32±0.72
	0.10	1.90±0.55	3.20±0.61
	0.15	1.64±0.34	3.12±0.70
	0.20	1.52±0.23	1.79±0.66
0.50	0.05	1.74±0.44	1.55±0.78
	0.10	0.51±0.51	-
	0.15	0.80±0.71	-
	0.20	-	-

^{a)}Fresh weight after 6 weeks of culture. Fresh weight of initiating calli, 0.3±0.1 g

가 비교적 잘 이루어지는 결과를 보였는데, 이러한 결과는 캘러스 유도 단계에서 이미 재분화 직전단계의 녹화가 이루어진 캘러스를 사용했기 때문인 것으로 판단된다. 실제 캘러스 유도를 위한 배지에서도 부분적으로 shoot가 재분화 되는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 녹화된 캘러스의 경우 처리한 성장조절제 및 내생의 식물 hormone에 의해서 부분적으로 shoot 분화가 시작된 것으로 추정된다. 그러나 캘러스 유도배지에서 재분화된 shoot는 생장이 느리고 쉽게 갈변하여 고사



Figure 2. Different growth patterns of multiple shoots of *S. acaulis* subsp. *arctica*. The shoots were cultured on 1/2 MS media supplemented with 0.25 mg/L BA and 0.05 mg/L NAA for 6 weeks. a, Multiple shoots cultured at 10±1°C b, Multiple shoots cultured at 23±1°C

하는 특성을 보였다.

캘러스로부터 다신훈초가 재분화 되기 시작하는 약 2주 후 온도조건을 다르게 하여 약 4주간 배양한 결과 비교적 고온인 23±1°C 조건에서 실제 자생지 생육온도와 유사한 10±1°C 조건으로 배양한 경우보다 왕성한 생체량 증가를 나타내었다 (Figure 2 and 4). 10±1°C 조건에서의 생장이 억제되는 요인은 정확히 확인할 수 없었으나 저온에서의 영양흡수억제에 의한 것으로 판단되었다. 실제 저온에서도 식물체의 재분화는 왕성하게 이루어졌으나 이후 shoot 생장이 억제되고 결국 갈변으로 고사하는 형태로 노화가 진행되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 2).

효율적인 다신훈초 형성과 기내증식

다신훈초의 발생 이후 생체량 증가속도는 4주까지는 뚜렷한 차이가 없었으나 5주 후 부터는 1×MS 배지에서보다 sucrose를 제외한 기본 염류, 비타민류를 모두 1/2로 조절한 1/2 MS 배지에서 약 20% 높게 나타났다 (Figure 3). 이러한 결과는 같은 석죽과 식물로 남극에 분포하는 남극개미자리 (*Colobanthus quitensis*)에서의 결과와 유사했는데 (결과 미제시), 저온에서 생육하는 같은 과 (科) 식물의 영양흡수 방식에 의한 것이거나 고농도의 염에 의한 삼투 스트레스에 의한 영양염류의 흡수 억제에 의한 것으로 판단된다. 이는 기내 식물체의 생장이 높은 농도 염류가 포함된 배지상에서 억제된다는 보고 (Moon et al. 1999)와 배양조건에 따라 일부 식물의 경우 1/2 MS 배지에서 체세포배의 발달이 보다 효율적이었다는 보고 (Lee et al. 2004)와 일치하는 결과로 뿌리를 통하지 않는 영양염류의 흡수효율은 저농도의 배지염류에서 보다 효율적으로 이루어질 수 있다는 것을 의미한다. 또한 목본식물인 가시오가피의 접합자배의 발아와 신장 정도가 1/2 MS 배지에서 가장 높게 나타났던 최근의 보고 (You et al. 2005) 등과도 일치하는 결과이다.

다신훈초 형성 이후 온도에 따른 지상부 성장정도는 영양 및

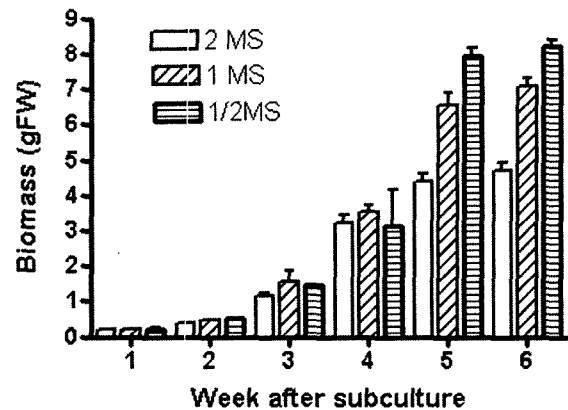


Figure 3. Comparison of the shoot biomass increment of *S. acaulis* subsp. *arctica* by different salt strength of MS media cultured at 23±1°C

생식 성장기간 동안의 생육지 평균온도와 유사한 10±1°C 보다 상대적으로 훨씬 고온인 23±1°C 조건에서 훨씬 높았다 (Figure 4). 저온생육 식물이 고온의 기내에 도입되어 생장이 더욱 왕성해지는 이유는 정확히 알 수 없으나 강한 내동성 식물로 주목되는 남극식물인 남극솜새풀 (*Deschampsia antarctica*)의 최근의 연구 보고 (Cuba et al. 2005)와 유사한 결과로 판단된다. 10±1°C에서 분화된 캘러스로부터 발생한 다신훈초는 짧고 녹화된 캘러스와 엉켜서 신장하고 쉽게 갈변되는 반면 (Figure 2-(a)) 상대적으로 고온 조건인 23±1°C에서는 비교적 길이신장이 왕성하였으며, 생체량의 증가도 큰 것으로 확인되었으며, shoot의 재분화와 더불어 뿌리의 발생도 왕성하게 이루어지는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 2-(b)). 다신훈초로 재분화된 식물체를 상토에 옮겨 성장시켜본 결과 완전한 식물체로 발달하였으며, 약 1개월 후 측지의 분화가 시작되었다 (Figure 1-e). 그러나 개화와 채종이 가능한 조건은 추가로 규명되어야 할 것으로 판단된다.

현재까지 *S. acaulis* subsp. *arctica*의 식물체를 기내에 도입하여 증식한 연구 보고는 확인된 바 없다. 이는 이 식물에 대한 연구가 주로 생태적인 연구 (Van der Wal et al. 2001, Spomer 1983) 에 치중되어 왔고, 분포하는 지역이 극히 제한되어 있

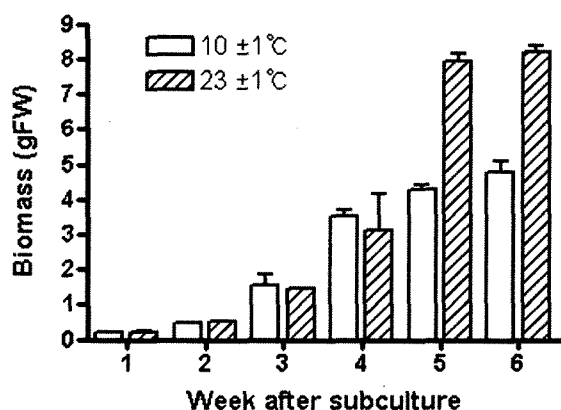


Figure 4. Comparison of the shoot biomass increment of *S. acaulis* subsp. *arctica* by different cultivation temperature. The shoots were cultured on 1/2 MS media supplemented with 0.25 mg/L BA and 0.05 mg/L NAA.

어 연구재료로서의 접근이 곤란했던 것도 주요한 이유인 것으로 판단된다. 이 식물은 고위도 북극지역의 생태천이 계열의 대표적인 선구종으로 알려져 있고, 생육환경의 변화에 민감한 식물로 확인되고 있어 최근 문제가 되고 있는 지구온난화의 정점으로 알려진 북극지역 기후변화의 지표종으로 활용될 가능성이 높다. 기후변화에 대한 지표종의 연구, 저온저항성 유전자원으로서의 활용은 다른 생물체나 환경요인을 배제하여 연구할 수 있는 재료의 확보가 필수적인데 이번 연구를 통해 확보된 무균 상태에서의 증식기술은 이종을 활용한 관련연구의 재료로서 제공될 것이라 기대된다. *S. acaulis* subsp. *arctica*는 저온환경에 대한 적응성이 높은 식물로 보고 (Junttila and Robberecht 1993) 된바 있어 저온 적응성 관련 유전자의 클로닝 등의 연구재료로도 유용할 것으로 판단된다.

적 요

고위도 북극지역에 분포하는 고등식물인 *Silene acaulis* subsp. *arctica* (Caryophyllaceae)의 유근에서 유도된 캘러스로부터 다신초를 재분화시키는 방법을 통하여 이 식물의 효율적인 기내 증식 방법을 확립하였다. 북극권 노르웨이령 Svalbard로부터 수집한 *S. acaulis* subsp. *arctica*의 종자를 발아시키고 0.25 mg/L 2,4-D와 1 mg/L GA₃가 포함된 고체 MS 배지상에서 10±1°C와 23±1°C 온도조건으로 발아된 종자의 유근으로부터 캘러스를 유도하였다. 캘러스가 형성된 2주 후부터는 0.25 mg/L BA와 0.05 mg/L NAA가 포함된 MS 배지에서 재분화가 효율적으로 이루어졌다. 재분화된 다신초들의 총 생체량 증가는 23±1°C의 온도와 1/2 MS 배지에서 가장 높은 것으로 나타났다. 기내에서 다신초로 재분화된 식물체는 인공상토에서 정상적인 식물체로 성장하였다.

사 사

본 연구는 극지연구소 (한국해양연구원 부설)에서 주관하는 극지생물재현 및 활용기반 구축사업 (PE06060)의 연구비 지원으로 수행되었다.

인용문헌

- Cuba M, Guitierrez-Moraga A, Butendieck B, Gidekel M (2005) Micropropagation of *Deschampsia antarctica* - a frost-resistant Antarctic plant. *Antarctic Sci* 17: 69-70
- Delph LF, Bailey MF, Marr DL (1999) Seed provisioning in the gynodioecious species *Silene acaulis* (Caryophyllaceae). *Amer J Bot* 86: 140-144
- Hagen S, Spomer GG (1989) Soil temperature control of growth form in the arctic-alpine cushion plant *Silene acaulis*. *Arctic Alpine Res* 21: 163-168
- Hermanutz LA, Innes DJ (1994) Gender variation in *Silene acaulis*. *Plant Sys Evol* 191: 69-81
- Junttila O, Robberecht R (1993) The influence of season and phenology on freezing tolerance in *Silene acaulis* L., a Subarctic and Arctic cushion plant of circumpolar distribution. *Ann Bot* 71: 423-426
- Kojima S (2004) Three-year vegetation change in Arctic environment as observed in a permanent plot in Ny-Alesund, Svalbard. *Polar Biosci* 17: 123-127
- Körner Ch, Larcher (1988) Plants in cold climates In: Long SP, Woodward FI, eds. *Plants and temperature*. The Company of Biologists Ltd, Cambridge, pp 25-57
- Lee WS, Choi EG, Kim JW (2004) Mass propagation of somatic embryos and plantlets of *Aralia elata* through bioreactor culture. *Kor J Plant Tiss Cult* 31: 219-223
- Moon HK, Oh KE, Son SH (1999) Factors influencing somatic embryo induction and plant regeneration in *Aralia elata* Seem. *Kor J Plant Tiss Cult* 26: 275-280
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Robberecht R, Junttila O (1992) The freezing response of an arctic cushion plant, *Saxifraga caespitosa* L.: Acclimation, freezing tolerance and ice nucleation. *Ann Bot* 129-135
- Rønning OI (1996) *The Flora of Svalbard*. Norwegian Polar Institute, Oslo, pp 35-36
- Spomer GG (1983) Ecology and physiological investigations of alpine cushion plants. *Natl Geo Soc Res Rep* 15: 601-607
- Stadler T, Delph LF (2002) Ancient mitochondrial haplotypes and evidence for intragenic recombination in a gynodioecious plant. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11730-11735
- Van der Wal R, Suzan MJ, van Lieshout M, Loonen JJE (2001) Herbivore impact on moss depth, soil temperature and arctic plant growth. *Polar Biol* 24: 29-32
- You KL, Choi YE, Yi JS (2005) Rapid *in vitro* germination of embryos via endosperm removal in *Eleutherococcus senticosus*. *J Plant Biotech* 7: 75-80

(접수일자 2006년 10월 25일, 수리일자 2006년 11월 20일)