

어리연꽃 (*Nymphoides indica* (L.) O. Kuntze) 환경 배양으로부터 체세포배발생을 통한 식물체 재생

오명진¹, 민성란², 유장렬², 김석원^{1*}

¹한국생명공학연구원 생물자원센터, ²식물유전체연구센터

Plant Regeneration from Floral Stem Cultures of *Nymphoides indica* (L.) O. Kuntze. via Somatic Embryogenesis

Myung Jin Oh¹, Sung Ran Min², Jang Ryol Liu², and Suk Weon Kim^{1*}

¹Biological Resource Center, ²Plant Genomics Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea

ABSTRACT Plant regeneration system from floral stem of *Nymphoides indica* via somatic embryogenesis was established. After four weeks of culture onto 1/2MS medium containing 2,4-D, pale-yellow globular structures and calluses were formed on the cut surface of floral stem explants. Upon transfer to 1/2MS basal medium, pale-yellow globular structures were developed into somatic embryos and normal plantlets. These results indicated that pale-yellow globular structures and calluses from floral stem were globular embryos and embryogenic calluses, respectively. The frequency of embryogenic callus formation from floral stem was reached to nearly 100% when floral stem was cultured onto 1/2MS medium supplemented with low concentration of 2,4-D (0.1 to 0.3 mg/L). However, the higher concentration of 2,4-D resulted in decrease of the frequency of embryogenic callus formation. In this study, low concentration of 2,4-D had a stimulative role in embryogenic callus formation, whereas BA showed inhibitory role in callus formation. In comparison to floral stem, leaf explants showed low frequency of embryogenic callus formation. The highest frequency of embryogenic callus formation from leaf explants was 9.5% when leaf explants were cultured onto 1/2MS medium supplemented with 0.3 mg/L of 2,4-D. The plant regeneration system of *Nymphoides indica* established in this study, might be applied to mass proliferation, conservation of genetic resources and genetic transformation for molecular breeding.

서 론

수생식물은 관상용은 물론 수질정화를 통한 수변 생태계 복구에 중요한 식물자원이다. 그러나 최근 수생식물자원은 육상식물과 마찬가지로 인위적인 개발로 인해 서식지의 파괴가 이루어짐으로써 유용 수생식물에 대한 보존 및 활용에 대한 사회적 관심이 고조되고 있다. 따라서 희귀 및 멸종위기 식물종에 대한 보존 및 증식 대책이 시급히 요구되고 있

는 실정이다.

수생식물은 서식지의 생태계 및 조직학적 구조가 상이하 여 조직배양 초기과정인 표면살균 과정에서 육상식물에 비해 어려움이 큰 것으로 알려져 있다 (Madsen, 1985; Godmaire and Nalewajko, 1986; Meyberg, 1988). 이로 인해 국내외적으로 조직배양에 관한 연구가 제한적으로 수행되고 있다. 수생식물의 조직배양에 관한 연구로 부엽성 수생식물인 개구리밥과 좁개구리밥의 기내 식물체 증식체계 확립 및 산업적 활용이 활발하게 진행되고 있으며 (Moon et al., 1998, Stefaniak et al. 2002, Li et al. 2004) 그 외에 *Cryptocoryne*의 식물체 재생 (Kane et al. 1990, Kane et al. 1999) 및 어리연꽃의

*Corresponding author Tel 042-860-4646 Fax 042-860-4677

E-mail: kimsw@kribb.re.kr

기관발생을 통한 식물체 재생 (Jenks et al. 2000)이 보고된 바 있다. 그러나 아직까지 수생식물의 체세포배발생에 관한 보고는 거의 이루어지지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 조름나물과 (Menyanthaceae)에 속하는 다년생, 부엽성 수생식물로서 주로 정원에 식재되거나 주변 습지에 분포하고 있는 대표적인 수생식물인 어리연꽃 (*Nymphoides indica* (L.) O. Kuntze)으로부터 체세포배발생에 미치는 식물 조직 및 성장조절제의 영향을 규명하고자한다.

재료 및 방법

식물재료

어리연꽃 (*Nymphoides indica* (L.) O. Kuntze)의 식물체로부터 잎조직 및 화아 줄기 조직을 절취하여 수돗물에 세척한 다음 10% 상업용 락스 용액에 20분간 표면살균을 하였다. 표면 살균된 잎과 화경 조직을 무균작업대 내에서 멸균수로 3-4회 세척한 다음 멸균된 여과지에서 표면의 수분을 제거하였다. 잎 조직은 넓이가 약 5 mm², 그리고 화경조직은 길이가 약 2-3 mm 두께로 절단하여 캘러스 유도배지에 치상하였다.

배양배지 및 배양조건

어리연꽃의 잎 및 화경조직을 위한 배양배지로 MS (Murashige and Skoog, 1962)배지의 모든 무기염류 농도를 1/2로 낮춘 배지에 각각 0.4 mg/L thiamine · HCl, 100 mg/L myo-inositol, 30 g/L sucrose 및 4 g/L Gelrite가 첨가된 배지를 기본배지 (1/2MS 배지)로 사용하였다. 배양배지의 pH는 고압살균전에 1N NaOH 용액으로 5.8로 조정하였다. 배양조건은 캘러스 유도과정은 25°C 암실에서 배양하였으며 체세포배로부터 식물체 재생은 25°C 명배양 (dir 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; 광주기 16/8시간) 하였다.

체세포배발생에 미치는 성장조절제의 영향

어리연꽃의 잎 및 화경조직으로부터 식물체 재생체계를 확립하기 위하여 1/2MS 배지에 성장조절제로 BA (benzyl aminopurine) 및 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)를 각각 0, 0.1, 0.3, 1, 3과 10 mg/L 첨가된 배지를 사용하여 각각의 식물 절편을 10개씩 3반복으로 치상하여 상기의 배양조건에 따라 배양하였다. 성장조절제 첨가에 따른 어리연꽃의 조직의 반응 양상 및 캘러스 형성 여부를 주기적으로 관찰하였으며 4주 배양 후 치상된 식물조직으로부터 연황색의 구형세포괴 형성유무를 관찰하여 체세포배 형성빈도를 조사하였다.

체세포배로부터 식물체 재생

어리연꽃의 화경조직으로부터 형성된 체세포배는 성장조절제가 첨가되지 않은 1/2MS 배지로 옮겨 주었으며 25°C 명배양 (약 80 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; 광주기 16/8시간)을 통하여 체세포배의 발달과 뿌리발달을 통한 정상적인 식물체 재생이 이루어지는지 여부를 조사하였다.

결과 및 고찰

어리연꽃의 화경조직으로부터 형성된 캘러스로부터 체세포배발생을 통한 기내 식물체 재생체계를 확립하였다 (Fig. 1). 어리연꽃의 화경조직으로부터는 2,4-D가 첨가된 배양배지에 4주 배양 후 연황색의 구형세포괴가 발달하였으나 (Fig. 1A), 잎조직에서는 캘러스 형성이 이루어지지 않았으며 배양기간이 증가될수록 갈변 고사하였다. 형성된 구형의 세포괴를 동일 조성의 성장조절제가 첨가된 배양배지로 옮겨 캘러스의 증식 및 구형세포괴의 신장을 유도하였다 (Fig. 1B). 신장된 구형세포괴 및 캘러스 조직을 성장조절제가 첨가되지 않은 1/2MS 배지로 옮겨 명배양한 결과, 약 배양 2주후부터 녹색의 체세포배 유사구조의 발달이 관찰되었다 (Fig. 1C). 배양 4주 경과 후 구형의 세포괴는 다수의 체세포배 유사구조로

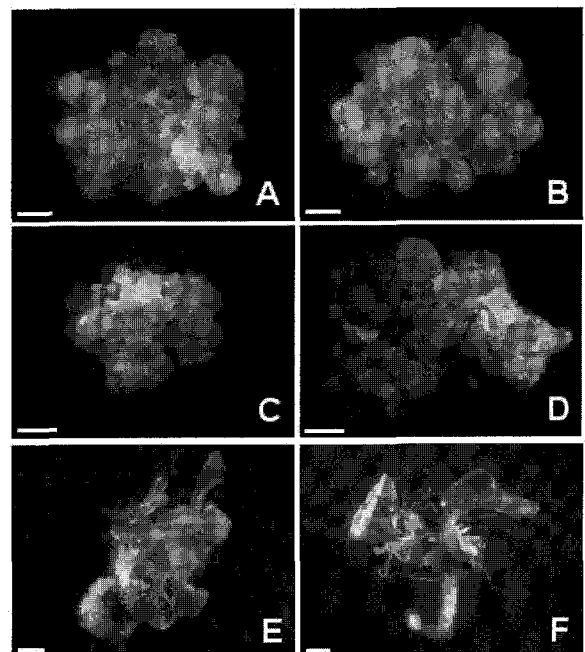


Figure 1. Plant regeneration of *Nymphoides indica* via somatic embryogenesis. A: Globular structure and callus formation from stem explants after four weeks of culture; B: Further development of globular structure; C: Elongation of somatic embryo; D: Development of cotyledonary stage somatic embryos; E: Rooting of somatic embryos; F: Plantlets formation. Scale bars represent 1 mm.

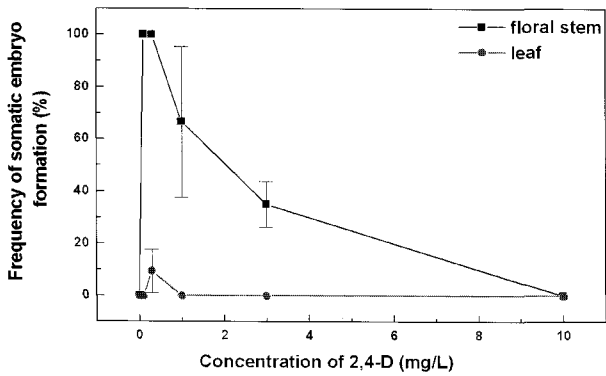


Figure 2. Effects of 2,4-D on somatic embryo formation from floral stem (■) and leaf explants (●) of *Nymphoides indica*. Each 2,4-D treatment consisted of 10 explants with three replicates. Vertical bars represent SD.

발달하였으며 (Fig. 1D) 동일배지로 옮겨 배양한 결과 녹색의 소식물체로 발달하면서 뿌리의 형성이 이루어졌다 (Fig. 1E). 형성된 소식물체는 잎의 신장이 이루어지면서 정상적인 식물체로 발달하였다 (Fig. 1F). 성장조절제로 2,4-D 대신에 BA가 첨가된 처리구에서는 어리연꽃의 화경조직은 물론 잎 조직에서도 전혀 캘러스 형성이 이루어지지 않았다.

화경조직으로부터 배발생캘러스 형성에 미치는 2,4-D의 영향을 조사한 결과, 0.1-0.3 mg/L 2,4-D가 첨가된 1/2MS 배지에서는 거의 100% 연황색의 구형세포괴가 발달하였다 (Fig. 2). 그러나 2,4-D 농도가 증가할수록 배발생캘러스의 형성빈도는 반대로 감소하였으며 고농도 2,4-D 처리구에서는 캘러스 형성이 전혀 이루어지지 않았다. 고농도 2,4-D 처리구와 마찬가지로 2,4-D가 첨가되지 않은 1/2MS 배지에서는 화경 및 잎 조직에서 캘러스 형성이 이루어지지 않았으며 배양 기간이 증가될수록 조직의 갈변이 이루어지면서 고사하였다. 성장조절제로 2,4-D 대신에 BA를 2,4-D와 같은 농도로 처리하여 동일한 배양조건에서 배양하였으나 화경조직에서 연황색의 구형세포괴가 전혀 형성되지 않았으며 갈변 고사되었다 (데이터 미제시).

어리연꽃 잎 조직의 경우는 화경조직에 비하여 연황색 구형 세포괴 형성빈도가 매우 낮아 0.3 mg/L 2,4-D 처리구 (배발생캘러스 형성빈도 9.5%)를 제외하고는 나머지 모든 처리구에서 연황색 구형 세포괴 형성을 관찰 할 수 없었다 (Fig. 2). 또한 성장조절제로 2,4-D 대신에 BA 단독처리구에서도 화경조직과 마찬가지로 캘러스 형성 없이 갈변 고사되었다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 어리연꽃의 화경조직이 잎 조직에 비하여 체세포배발생을 통한 식물체 재생 효율이 높았으며 성장조절제로 저농도 (0.1 -0.3 mg/L) 2,4-D 처리가 매우 효과적임을 알 수 있었다. 현재 배발생캘러스의 현탁배양체계를 확립중이며 수생식물자원의 초저온보존 연구에 활용할 예정이다. 본 연구에서 확립된 어리연꽃의 화경조직으로부터

체세포배발생을 통한 식물체 재생체계는 어리연꽃의 기내 대량증식 수단은 물론, 유용 형질 도입을 통한 분자육종의 수단으로 활용이 가능할 것으로 기대된다. 이는 수생식물자원의 현지의 보존의 대체수단으로 활용이 가능할 것으로 예상되며 아울러 멸종위기에 처한 다른 수생식물자원의 기내배양체계 확립 연구에 활용이 가능할 것으로 예상된다.

적 요

어리연꽃의 화경조직으로부터 형성된 캘러스로부터 체세포배발생을 통한 기내 식물체 재생체계를 확립하였다. 2,4-D가 첨가된 배양배지에 4주 배양 후 어리연꽃의 화경조직으로부터 연황색의 구형세포괴가 발달하였으며 성장조절제가 첨가되지 않은 1/2MS 배지로 옮겨 명배양한 결과, 약 배양 2주 후부터 녹색의 체세포배 유사구조의 발달이 관찰되었으며 정상적인 식물체로 발달하였다. 따라서 캘러스 발달 초기에 형성된 구형 세포괴 및 캘러스는 초기 단계의 체세포배이며 캘러스는 배발생캘러스임을 알 수 있었다. 화경조직으로부터 배발생캘러스 형성빈도는 0.1-0.3 mg/L 2,4-D가 첨가된 1/2MS 배지에서는 거의 100%이었으며 2,4-D 농도가 증가할수록 배발생캘러스의 형성빈도는 반대로 감소하였고 고농도 2,4-D 처리구에서는 캘러스 형성이 전혀 이루어지지 않았다. 한편 BA는 처리 농도에 상관없이 조직의 갈변 및 고사를 유발함으로써 체세포배 형성에 저해적임을 알 수 있었다. 어리연꽃의 잎조직의 경우는 화경조직에 비하여 연황색 구형 세포괴 형성빈도가 매우 낮아 0.3 mg/L 2,4-D 처리구 (배발생캘러스 형성빈도 9.5%)를 제외하고는 나머지 모든 처리구에서 배발생캘러스의 형성을 관찰 할 수 없었다. 현재 배발생캘러스의 현탁배양 체계를 확립중이며 본 연구에서 확립된 어리연꽃의 식물체 재생체계는 어리연꽃의 기내 대량증식 수단은 물론, 유용 형질 도입을 통한 분자육종의 수단으로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 유전자원지원활용사업 (BDM080 0622), 환경부 차세대핵심환경기술사업 (EGW0600611)과 한국생명공학연구원 기관고유사업 지원으로 수행되었으며 어리연꽃 식물체를 제공해주신 자생식물사업단 야생식물종자은행팀에게 감사사를 드립니다.

인용문헌

Godmaire H and Nalewajko C (1986) Axenic culture of *Myriophyllum spicatum* L.: Importance to extracellular product

- estimates. *Aquat Bot* 26: 385-392
- Jenks MA, Kane ME, McConnell DB (2000) Shoot organogenesis from petiole explants in the aquatic plant *Nymphaoides indica*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 63: 1-8
- Kane ME, Davis GL, McConnell DB and Gargiulo JA (1999) *In vitro propagation of Cryptocoryne wendtii*. *Aquatic Botany* 63: 197-202
- Kane ME, Gilman EF, Jenks MA and Sheehan TJ (1990) *Aquatic plant micropropagation: Cryptocoryne lucens*. *Hort-Science* 25: 687-689
- Li J, Jain M, Vunsh R, Vishnevetsky J, Hanania U, Flaishman M, Perl A, Edelman M (2004) Callus induction and regeneration in *Spirodela* and *Lemna*. *Plant Cell Reports* 22: 457-464
- Madsen JD (1985) The use of vegetative propagules for sterile cultures of aquatic macrophytes. *Mich Bot* 24: 169-174
- Meyberg M (1988) Cytochemistry and ultrastructure of the mucilage secreting trichomes of *Nymphaoides peltata* (Menyanthaceae). *Ann Bot* 62: 537-547
- Moon HK, Rajbhandari N and Stomp AM (1998) Effect of media components and phytohormones on in vitro frond proliferation of *Lemna gibba* G3 and 24 additional *L. gibba* strains. *Plant Res* 1: 98-104
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Stefaniak B, Wonzy A, Bunda I (2002) Callus induction and plant regeneration in *Lemna minor* L. *Biologia Plantarum* 45: 469-472

(접수일자 2007년 1월 26일, 수리일자 2007년 2월 5일)