

## 멸종위기 수생식물인 매화마름(*Ranunculus katusensis* Makino)의 기내 신탄 증식

박민완 · 류시현 · 남수환 · 배기화

### *In vitro* shoot propagation of *Ranunculus katusensis* Makino, an endangered aquatic plant

Min Wan Park · Shi Hyun Ryu · Su Hwan Nam · Kee Hwa Bae

Received: 21 June 2017 / Revised: 5 July 2017 / Revised: 9 August 2017 / Accepted: 10 August 2017

© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** A micropropagation method via callus for *Ranunculus katusensis* Makino, an endangered species, was established. When stem segments were cultured on MS media supplemented with 1.0 mg/L IAA, NAA, IBA and 2,4-D, the highest frequency of callus induction was achieved on MS medium supplemented with 1.0 mg/L NAA. Multiple shoot per explant was obtained, the MS medium containing 1.0 mg/L BA and 0.5 mg/L NAA. Additionally, effect of activated charcoal (AC) and sucrose on shoot growth in *in vitro* culture were examined. The most suitable conditions for shoot growth after 4 weeks of culture were the MS medium with AC and sucrose. This *in vitro* propagation protocol will be valuable for conservation and mass propagation of this endangered plant.

**Keywords** Charcoal, Multiple shoot, Sucrose

#### 서론

산업화와 관계시설의 발달로 우리 주변에서 흔히 볼 수 있었던 크고 작은 습지가 점차 사라지고 있어 습지를 자생지로 하는 일부 수생식물도 절멸의 위기에 처해 있다. 과거에는 흔하게

발견되던 구와말(*Linnophila sessiliflora*), 남개연(*Nuphar pumila*), 참물부추(*Isoetes coreana*), 물질경이(*Ottelia alismoides*), 가시연꽃(*Euryale ferox* Salisb.), 각시수련(*Nymphaea tetragona* var. *minima*), 매화마름(*Ranunculus katusensis* Makino), 물고사리(*Ceratopteris thalictroides*), 순채(*Brasenia schreberi*), 전주물꼬리풀(*Dysosphylla yatabeana*), 조름나물(*Menyanthes trifoliata*) 등을 그 예로 들 수 있다(Lee and Choi 2006; Lee 1984; Lee 1996; 김금호 2006).

환경부가 멸종위기야생생물 II급으로 지정해 보호하고 있는 매화마름(*R. katusensis*)은 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 2년생 침수성 수생식물로 주로 논이나 늪, 연못에 자생한다. 매화마름은 1960년대까지만 해도 영등포에서 채집될 정도로 흔했던 식물이지만 경작지의 감소와 도시의 팽창으로 인해 1980년대에 들어서면서 사진조차 구하지 못할 정도로 자생지에서 사라지는 식물이 되었다(김금호 2006). 매화마름에 대한 멸종압력으로는 우선 특정한 서식지에서만 자생하는 생태적 특징을 들 수 있다. 최적의 자생지는 들판이나 소류지가 인접해 있어 겨울철에도 수분이 많은 논이다. 바닥이 완전히 마른 채로 겨울을 나는 논에서는 매화마름 종자가 이듬해 모내기 전까지는 발아를 할 수 없다(김금호 2006). 어렵게 발아를 하여 신탄가 생장하더라도 모내기 전후로 논 잡초를 없애기 위해 뿌리는 제초제에 의해 사멸할 수 있다. 또한 종자를 다량으로 생산하지만 휴면기간이 짧아 이듬해 발아에 실패할 경우에는 자생지에서의 증식이 어려운 특징도 있다(Lee and Choi 2006; Lee 1984; Lee 1996; Lee 2006). 매화마름에 관한 연구로는 접합자배 유래의 체세포 배 생산을 통한 식물체 유도(Min et al. 2007)에 관한 연구결과 외에는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 매화마름의 줄기 절편으로부터 캘러스를 유도하여 기내 재분화체를 생산하고자 하였다. 이를 통해 연중 생산이 가능한 기내 식물체의 생산방법에 대한 기초 자료를 확보하였다.

M. W. Park · S. H. Ryu · K. H. Bae (✉)  
국립낙동강생물자원관  
(Nakdonggang National Institute of Biological Resources, 137,  
Donam 2-gil, Sangju-si, Gyeongsangbuk-do, 37242, Republic of  
Korea)  
e-mail: khbae7724@nnibr.re.kr

S. H. Nam  
천리포수목원  
(Chollipo Arboretum, 187, Cheollipo 1-gil, Sowon-myeon,  
Taean-gun, Chungcheongnam-do, 32121, Republic of Korea)

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 배양조건

연구에 사용된 매화마름(*R. kazusensis*)의 전초는 천리포수목원에서 분양받았다. 표면살균은 매화마름의 전초를 흐르는 수돗물에서 30분, 세척 멸균 증류수로 1회 세척, 70% ethanol에 1분, 1% NaOCl 용액에 20분, 멸균 증류수로 5회 세척, 멸균 여과지에서 수분을 제거하는 순으로 진행하였다. 표면 살균한 매화마름의 줄기 절편을  $0.5 \times 0.5$  cm로 세절하여 실험에 사용하였다. 모든 배양물은 온도  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 광주기 16/8(명/암)시간, 광도  $46 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 배양실에서 배양하였다. 실험에 사용한 모든 배지와 기구는  $121^\circ\text{C}$ , 1.5기압으로 20분간 멸균하였으며 배지의 경우 페트리디쉬( $12 \times 5$  cm, SPL, Korea)에는 30 mL, 4각 plastic 배양병( $5 \times 5 \times 15$  cm, SPL, Korea)에 각각 100 mL씩 분주하여 사용하였다.

### 옥신류 호르몬 종류 및 농도에 따른 매화마름 줄기 유래 절편으로부터 캘러스 유도

옥신류 호르몬 종류에 따른 매화마름 캘러스 유도를 위해 줄기절편을 1.0 mg/L의 IAA (Indole acetic acid), NAA (Naphthalene acetic acid), IBA (Indole butyric acid)와 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid)가 첨가된 배지에 치상하여 4주간 배양한 다음 캘러스 유도율을 조사하였다. NAA의 농도에 따른 캘러스 유도하기 위해 0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 mg/L의 NAA가 첨가된 배지에 치상하여 4주간 배양한 후 캘러스 유도율을 조사하였다. 배양 배지는 MS (Murashige and Skoog 1962)배지(30 g/L sucrose, 7 g/L agar, pH 5.7)를 기본으로 제조하여 페트리디쉬에 30 mL씩 분주하였다.

### 옥신류와 사이토키닌류 혼합처리에 따른 다신초 유도 및 기내 증식

매화마름 캘러스 유래의 다신초 유도조건을 조사하기 위해 호르몬이 첨가되지 않은 MS배지에서 2회에 걸쳐 계대배양한 캘러스를 100~200 mg 취해 0, 1.0 mg/L의 BA (Benzylaminopurine)와 Kinetin을 첨가하고 각 배지에 옥신류 호르몬인 NAA, IAA, 2,4-D를 각각 0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/L씩 조합처리한 MS배지(30 g/L sucrose, 7 g/L agar, pH 5.7)에 20개씩 5반복 치상하여 4주간 배양한 후 처리구당 다신초 유도 개수를 조사하였다.

### 기내 다신초 신장에 미치는 활성탄과 sucrose의 영향

활성탄(Activated charcoal, AC, Duchefa, Netherland)과 sucrose의 농도별 처리가 매화마름 다신초 신장에 미치는 영향을 조사하기 위해 2 cm 성장한 다신초를 AC (0, 100, 200, 400 mg/L)

와 sucrose (0, 10, 30, 50, g/L)가 농도별로 첨가된 MS배지(Gelrite 4.0 g/L, pH 5.8)에 6개체씩 3반복하여 치상하였다. 실험은 온도( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), 광주기(12/12시간), 광도( $46 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )가 일정하게 유지되는 배양실에서 실시되었다. 배양 4주 후 신초와 뿌리의 길이, 생중량과 건중량을 각각 조사하였다.

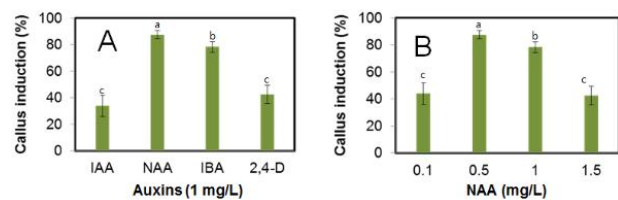
### 통계분석

모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였고, 집단 간 변이 차이를 알아보기 위해서 one-way ANOVA를 실시하여, 유의성이 있는 경우 Duncan's multiple range test로 사후검증을 실시하였다. 통계적 유의성은  $P < 0.05$ 로 설정하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 매화마름 줄기 유래 절편으로부터 캘러스 유도

매화마름의 줄기절편에서 캘러스 유도에 미치는 옥신류 호르몬의 종류를 알아보기 위해 IAA, NAA, IBA와 2,4-D가 각각 1 mg/L 첨가된 MS배지에 줄기절편을 치상한 후에 캘러스 형성율을 조사한 결과, 1.0 mg/L NAA를 첨가한 배지에서 87%의 캘러스 유도율을 보였으며, 1.0 mg/L IBA가 첨가된 배지에서 78%, 1.0 mg/L 2,4-D가 첨가된 배지는 42%, 1.0 mg/L IAA 첨가 배지는 34%의 순으로 조사되었다(Fig. 1). NAA 처리 농도에 따른 캘러스 유도율은 0.5 mg/L의 NAA처리구에서 87.5%로 조사가 되었으나 1 mg/L의 NAA처리구와 유의적으로 차이를 보이지 않았다. 동속은 아니지만 참돌꽃(*Rhodiola rosea* L.)의 경우, 줄기절편을 치상하여 BA와 NAA가 복합적으로 처리가 되었을 때 부정아 및 캘러스 유도율이 가장 우수하다는 결과를 보고하였고(Bae et al. 2005), 또한 난과 식물인 새우난초(*Calanthe discolor*)의 조직배양을 통한 식물체 생산에서도 새우난초의 배양부위(잎, 구경, 뿌리)에 따라 부정아유도율과 캘러스 유도율이 다르고 식물체 재생에 많은 영향을 주는 것으로 보고되었다(Bae et al. 2010). 이와 같이 배양부위 및 배지에 첨가하는 성장조절물질의 종류



**Fig. 1** Callus induction of *R. kazusensis*. A: Kind of auxins, B: NAA concentrations of stem. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at  $P < 0.05$

와 농도에 따라 캘러스 유도 및 신초분화 양상이 다르게 나타남을 알 수 있다(Ryu et al. 1992). 신초의 분화 및 성장에는 세포의 성장과 분열을 촉진하는 성장조절물질(옥신과 사이토키닌)의 첨가가 필수적이며, 배양부위의 분열부위 존재 유무 등이 초기 배양의 성패를 좌우하는 중요한 인자로 작용하는 것으로 보여진다(Murashige and Skoog 1962).

옥신류와 사이토키닌류 혼합처리에 따른 다신초 유도 및 기내 증식

식물성장조절물질 복합처리에 따른 기내 매화마름 캘러스 유래 다신초 유도 조건을 알아보기 위해 BA (0, 1.0 mg/L)와 Kinetin(0, 1.0 mg/L)과 0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/L NAA, IAA, 2,4-D를 각각 조합하여 제조한 MS배지위에 매화마름 캘러스를 치상한 후 4주 후에 다신초 유도 개수를 조사한 결과는 Table 1 과 같다. 매화마름 캘러스 유래의 다신초 유도는 1.0 mg/L의 BA와 0.5 mg/L NAA 조합처리구에서 절편당 평균 47.6개로 가장 많이 유도되었다(Table 1). 호르몬이 처리되지 않는 대조구에서는 캘러스 상태로 계속 유지됨을 확인하였다(Fig. 1B). 2,4-D의 조합처리는 절편당 평균 10개 미만의 다신초가 유도되었다. Min 등(2007)의 연구에서는 체세포배 유래의 식물체 생산기법에 관해 연구하여 캘러스의 다신초 분화 등에 관한 연구는 국내외적으로 처음 수행하는 바이다. 본 연구에서 BA와 NAA를 혼합처리가 매화마름 다신초 유도에 효과적이라는 결과를 보였는데 이는 cytokinin류는 지하부

의 발육보다는 지상부의 발육을 촉진시키는 역할을 한다는 보고(Short and Torrey 1972)가 있어 다양한 사이토키닌류의 효과를 검증할 필요가 있다고 사료된다. 본 연구에서는 다신초 유도에 미치는 Tidiazuron (TDZ)의 효과를 확인하지는 않았지만, TDZ는 목본식물을 포함한 대부분의 식물체의 대량증식에 효과적이며(Lu 1993) 재분화에 어려운 식물체의 체세포배 형성에 효과적이라고 보고되었고, Cho 등(1999)과 Seo 등(2009)의 연구에서도 나리류의 분화에 NAA와 BA를 혼합처리한 실험구보다 NAA와 TDZ를 혼합처리시 분화에 가장 효과적이라는 연구결과와 보고한 바 있어 향후 TDZ의 효과를 조사해 볼 필요가 있을 것으로 사료된다.

기내 다신초 신장에 미치는 활성탄(activated charcoal)과 sucrose 농도의 영향

매화마름 캘러스 유래의 다신초 신장에 미치는 AC (Activated charcoal)와 sucrose의 농도를 조사한 결과, 엽장(shoot length)은 200 mg/L AC처리구에서 평균 12.6 cm로 가장 긴 반면, 대조구는 평균 8.3 cm로 짧았다(Table 2). 근장(root length)은 50 g/L의 sucrose 처리구에서 평균 5.8 cm로 가장 길었고, 대조구는 1.7 cm로 짧았다(Table 2). 하지만 본 연구결과는 통계적 유의성은 높지 않다(Table 2). Sucrose는 식물체 내 대사활동에 필요한 에너지원으로, 기내 조직배양개체의 세포 내 삼투조절제로 이용된다(Gabriela et al. 2005). 그러나 고농도(50 g/L)의 sucrose 처리는 일본산 나리류(*Lilium bulbocaudatum*)의 기

**Table 1** Effects of cytokinins and auxins concentrations on multiple shoots induction *R. kazusensis* callus 4 weeks of culture on 1/2MS medium supplemented with 20 g/L sucrose and 4.0 g/L gelrite

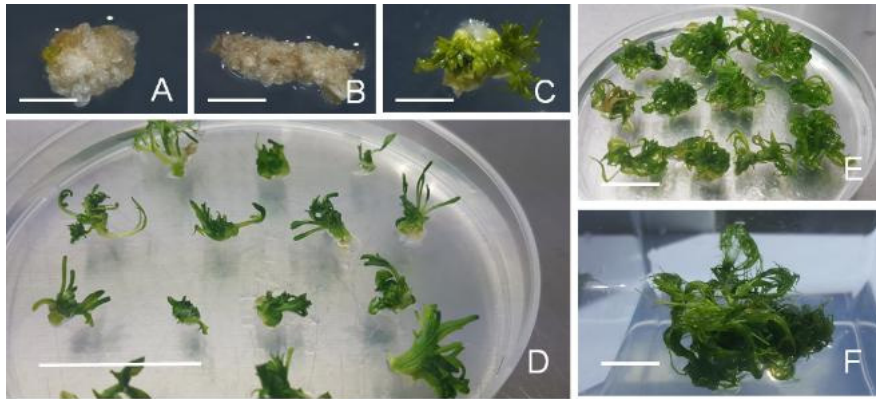
Cytokinins (mg/L)		Auxins (mg/L)			No. of multiple shoot/explant
BA	KT	NAA	IAA	2,4-D	
0	0	0	0	0	0±0*
		0.1			27.8±0.4b
		0.5			47.6±1.0a
		1.0			27.0±0.8b
			0.1		18.5±0.9c
1	0		0.5		12.4±0.4d
			1.0		10.5±0.6e
				0.1	4.2±0.7f
				0.5	3.9±0.2fg
				1.0	3.6±0.1fg
		0.1			19.4±0.7a
		0.5			23.8±0.6a
		1.0			20.3±1.1a
			0.1		14.1±0.3b
			0.5		15.4±0.4b
			1.0		15.2±0.7b
				0.1	2.3±0.4c
				0.5	1.9±0.3c
				1.0	2.7±0.2c

\*Data are the means ± SD, of three experiments. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at P < 0.05.

**Table 2** Effects of AC and sucrose concentrations on shoot growth from multiple shoot of *R. kazusensis* after 4 weeks of culture on MS medium supplemented with 4.0 g/L gelrite

AC (mg/L)	Sucrose (g/L)	Length of shoot (cm)	Fresh weight (g)
0	0	8.3±0.8*b	4.4±1.2c
100	-	11.5±0.5a	6.8±1.7b
200	-	12.6±0.2a	6.6±1.1a
400	-	11.2±1.1a	6.4±1.6a
-	10	7.8±1.3a	6.1±1.4a
-	30	8.1±0.9a	6.3±0.8a
-	50	8.2±0.8a	6.8±1.3a

\*Data are the means ± SD, of three experiments. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncan's multiple range test at  $P < 0.05$ .



**Fig. 2** *In vitro* propagation of *R. kazusensis*. A: Leaf (scale bar, 0.2 mm), B: Stem (scale bar, 0.2 mm), C: Multiple shoot induction of *R. kazusensis* stem (scale bar, 0.5 mm), D: Shoot conversion from multiple shoot (scale bar 20 mm), E-F: Shoot elongation (scale bar, 20 mm)

내 배양 시 잎 발생을 억제하고, 캘러스 유도를 촉진하여 생육이 저해된다고 하였다(Takayama and Misawa 1979). 반면, *Cocos nucifera* L의 경우는 저농도(5 g/L)의 sucrose 처리는 고농도(70 g/L) 처리에 비해 광합성능을 향상시켜 토양순화에 적합한 독립영양식물로 발달을 촉진시켰다(Gabriela et al. 2005). 또한, 터키산 마르타곤 나리(*Lilium martagon*)에서는 sucrose 저농도 처리가 고농도 처리에 비해 배지 내 양분흡수를 촉진시키고, 생장억제물질 생성을 감소시켜 구근의 형성과 발달에 효과적이었다(Magdalenal and Anna 2005). 하지만 본 연구결과에서는 통계적 유의성이 없었다(Table 2). 배지 내 AC의 첨가는 고온·고압 멸균 후 교질재료(gelling agent)에 의해 pH가 낮아지는 현상을 억제하여 배지의 pH를 안정화시켜 세포 또는 기관의 생장과 발달에 긍정적인 영향을 주고(Eymar et al. 2000; Pan and van Staden 1998), 신초형성 및 뿌리 유도를 촉진하는 역할을 한다(Dumas and Monteuis 1995). 결과적으로, 본 연구결과는 매화마름의 기내 무균증식에 필요한 최적 조건을 확립하였고, 이러한 결과는 향후 야생에서 멸종되어가는 식물의 유전적 다양성을 유지하면서 서식지 외에서 보존하거나 증식된 식물체를 서식지에 복원하는 활동에 중요한 참고자료로 활용 될 수 있을 것이다.

## 적 요

본 연구는 자생 멸종위기 수생식물인 매화마름의 기내 증식에 미치는 배양환경(식물생장조절제, AC, sucrose)을 조사하기 위해 수행되었다. 효율적인 캘러스 유도조건을 알아보고자 IAA, NAA, IBA와 2,4-D가 각각 1 mg/L 첨가된 MS배지에 줄기절편을 치상한 후에 캘러스 형성율을 조사한 결과, NAA를 첨가한 배지에서 87%의 캘러스 유도율을 보였으며, IBA가 첨가된 배지에서 78%, 2,4-D가 첨가된 배지는 42%, IAA 첨가 배지는 34%의 순으로 조사되었다. NAA 처리 농도에 따른 캘러스 유도율은 0.5 mg/L의 NAA처리구에서 87.5%로 조사가 되었으나 1 mg/L의 NAA처리구와 유의적으로 차이를 보이지 않았다. 매화마름 캘러스 유래의 다신초 유도는 1.0 mg/L의 BA와 0.5 mg/L NAA 조합처리구에서 절편당 평균 47.6개로 가장 많이 유도되었다. 호르몬이 처리되지 않는 대조구에서는 캘러스 상태로 계속 유지되었다. 2,4-D의 조합처리는 절편당 평균 10개 미만의 다신초가 유도되었다. 매화마름 캘러스 유래의 다신초 신장에 미치는 AC (Activated charcoal)와 sucrose의 농도를 조사한 결과, 엽장(shoot length)은 200 mg/L AC처리구에서 평균 12.6 cm로 가장 긴 반면, 대조구는 평균 8.3 cm로 짧았다. 결과적으로 본 연구는 매화마

름의 기내증식에 미치는 몇 가지 요인에 관한 구체적인 결과를 제시하였고, 이러한 결과는 향후 매화마름의 증식 및 보전 전략 개발에 중요한 기초자료로 제공 될 것이다.

## 사 사

본 논문은 환경부 국립낙동강생물자원관 2017년 “담수생물다양성보전·관리기반구축” 사업의 지원을 받아 수행되었습니다.

## References

- Bae KH, Yoon ES, Yun PY, Choi YE (2010) Soil acclimatization of *Calanthe discolor* through multiple shoot formation from tissue culture. *Kor. J. Plant Res.* 23(1):7-13
- Bae KH, Yoo JA, Yoon ES (2005) Effect of growth regulators of plant regeneration from *Rhodiola sachalinensis* leaf segments. *Kor. J. Plant Res.* 18:410-416
- Cho WJ, Park HB, Choi EG (1999) Effects of growth regulators and sucrose on plant differentiation and bulblet formation of *Lilium cernuum* Komarov. *Bulletin of the Agricultural College, Chonbuk National University.* 30:22-32
- Dumas E, Monteuis O (1995) *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants influence of activated charcoal. *Plant Cell Tiss Org Cult* 40: 231-235
- Eymar E, Alegre J, Toribio M, Lopez-vela D (2000) Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on in vitro nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 63:57-65
- Gabriela F, Carlos T, Carlos O, Yves D, Jorge MS (2005) Exogenous sucrose can decrease in vitro photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) in vitro plantlets. *In Vitro Cell Devel Biol* 41:69-76
- Lee JS, Choi BH (2006) Distribution and red data of wild orchids in the Korean Peninsula. *Kor. J. Plant Taxon* 36:335-360
- Lee, TB (1984) Outline of Korean endemic plants and their distribution. *Kor. J. Plant Taxon* 14:21-32
- Lee, WT (1996) *Lineamenta Florae Koreae*. Academy Press, Seoul
- Lee, YN (2006) *Flora of Korea*. Gyohaksa, Seoul
- Magdalena, K, Anna B (2005) Morphogenesis of *Lilium martagon* L. explants in callus culture. *Acta Biol Craco Series Bot* 47:65-73
- Min, SR, Liu JR, Kim SW (2007) Plant regeneration from zygotic embryo-derived embryogenic cell suspension cultures of *Ranunculus katusensis*. *Plant Biotechnol Rep.* 1:57-60
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-479
- Lu, CY (1993) The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology.* 29:92-96
- Ryu, J. H., Doo, H.S., and Kwon, T. H. 1992. Induction of haploid plants by anther culture in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Kor. J. Plant Biotech.* 19:171-177
- Seo, JN, Kim HY, Lee SG, Kang HD (2009) Effects of plant growth regulators on bulbets regeneration of *Lilium cernuum* K. *Journal of Agriculture and Life Science.* 43:29-33
- Short, KC, Torrey JG (1972) Cytokinins in seedling roots of pea. *Plant Physiology.* 49:155-160
- Takayama S, Misawa M (1979) Differentiation in *Lilium bulboscales* grown in vitro: Effect of various cultural conditions. *Physi Planta* 46:184-190