

도라지 (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) 부정아 형성을 통한 식물체 재분화

김주영 · 나현선 · 최필선

Plant Regeneration via Adventitious Shoot Formation in *Platycodon grandiflorum* (Jacq. A. DC.)

Ju Young Kim · Hyun Sun Na · Pil Son Choi

Received: 22 May 2017 / Revised: 5 July 2017 / Accepted: 13 July 2017
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract To investigate optimal conditions for plant regeneration in *Platycodon grandiflorum* (Jacq. A. DC.). Both leaf and hypocotyl explants were cultured on Murashige & Skoog's (MS) medium supplemented with combinations of 0.1, 0.5, 1.0, or 2.0 mg/L cytokinins (BA and kinetin) and 1.0 mg/L 2,4-D for 6 weeks, respectively. According to the type of explant, the total shoot organogenesis (56.38%) in leaf explants was higher than in hypocotyls (28.20%). In comparison with kinetin and BA for the plant regeneration, the frequency (70.38%) of leaf explants was higher in combination with kinetin and 2,4-D than of BA with 2,4-D (42.38%), whereas the frequency (35.56%) of hypocotyls explants was higher in BA combination than kinetin combination (20.83%). The highest frequency (94.20%) was observed from the cultures of leaf explants on the MS medium supplemented with 1.0 mg/L kinetin and 1.0 mg/L 2,4-D. Upon transfer onto $\frac{1}{2}$ MS basal medium containing 3% sucrose, shoots developed into plantlets with roots, and were well grown in soil in the greenhouse. These results lead us to speculate that the optimization of culture conditions was responsible for the mass propagation from in vitro cultures of *Platycodon grandiflorum* (Jacq. A. DC.).

Keywords Benzyl adenine, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid,

Hypocotyl, Kinetin, Leaf, Organogenesis, *Platycodon grandiflorum*

서론

도라지(*Platycodon grandiflorum* (Jacq. A. DC.))는 다년생 초본 식물로서 초롱꽃과(*Companulaceae*)에 속하며, 우리나라를 비롯하여 일본 중국 등지에서 자생하는 중요한 식용 및 약용 식물이다. 일반적으로 도라지는 산과 들의 반그늘 또는 양지의 부엽질 토양에서 잘 자라며, 예로부터 우리나라에서는 도라지를 재배하여 장을 담가 식용으로 사용하여 왔다(Han et al. 2014). 최근 도라지의 뿌리에는 여러 가지 이차대사산물 즉, 플라티코디제닌, 폴리갈릭산 등의 사포닌과 글루코스, phytosterol 등이 다량 함유되어 있어 한의학적으로 활용되어 왔다. 이러한 도라지의 중요한 성분 때문에 국내에서는 거담, 진해, 항균, 혈압강하 등에 많이 이용되어 왔고, 최근 해외에서는 건강식품의 원료로 그 수요가 증가하고 있는 실정이다(Lee et al. 2014).

현재까지 도라지의 기내배양은 배양재료로 주로 화기, 소포자, 잎, 줄기, 뿌리가 이용되어 왔으며, 식물호르몬으로서 신초 형성에는 BA와 NAA 혼합 처리가 그리고 체세포배발생에는 2,4-D 단독 또는 Kinetin과 2,4-D 조합 처리가 효과적인 것으로 알려져 왔다(Han and Lee 1976; Ko et al. 1993; Lee et al. 1993; Ko 1999; Kim and Liu 1999; Eun et al. 2000; Chung and Cho 2002; Choi et al. 2004; Kasumi et al. 2006; Han et al. 2014). 많은 약초식물은 다량의 유용성분과 페놀화합물을 함유하고 있어 외부 환경적 스트레스를 받을 경우 방어 기작에 의한 세포분열이 억제되거나(Park and Choi 2015), 배양절편으로 뿌리를 이용할 경우 오염에 의한 초기 배양으로 인하여 배양이

J. Y. Kim · H. S. Na · P. S. Choi (✉)
남부대학교 한방제약개발학과
(Department of Oriental Pharmaceutical Development, Medicinal Plant Transformation Center, Nambu University, Gwangju 506-824, Korea)
e-mail: cps6546@hanmail.net

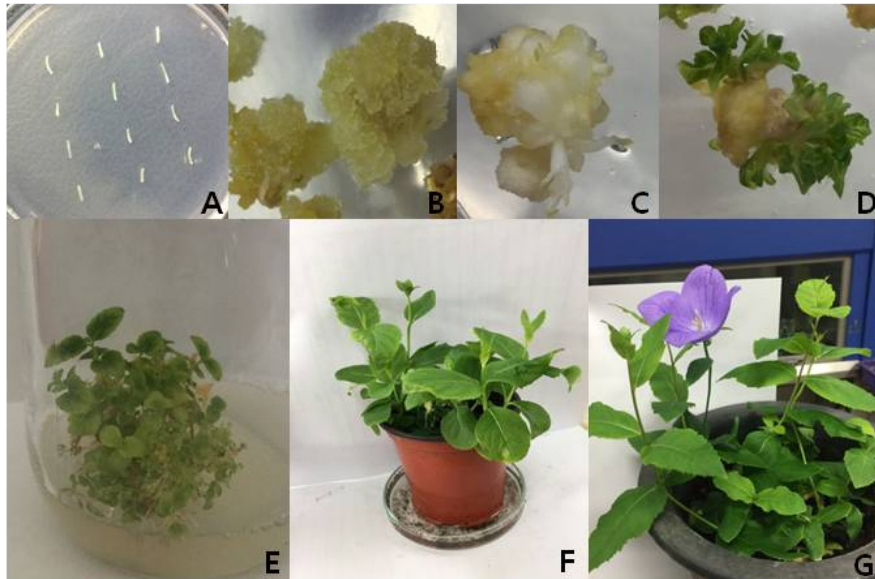


Fig. 1 Shoot organogenesis and plant regeneration from the cultures of hypocotyl explants on MS medium with combinations of BA and 2,4-D in *Platycodon grandiflorum* A: Hypocotyl explants, B: Callus formation after 3 weeks of culture, C, D: Shoot organogenesis from callus clone, E: Propagation of plantlets $\frac{1}{2}$ MS basal medium containing 3% sucrose. F, G: Plants growing in soil and flowering

까다로운 것으로 알려져 있다. 따라서 약초식물을 대상으로 식물체 대량생산과 생물학적 연구를 위해서는 성숙한 뿌리나 줄기절편을 이용하는 것 보다는 세포분열능이 높은 미성숙 배양절편을 이용하는 것이 좋으며(Cho et al., 1998), 특히 무균 발아된 유식물체의 배축이나 어린 잎 절편을 배양함으로써 식물체 재분화에 성공할 수가 있다(Park and Choi 2015). 또한 최적의 호르몬 종류와 농도를 선정하는 것이 선행되어야 한다(Erisen et al., 2010). 일반적으로 체세포배발생에는 세포의 탈분화에 효과적인 2,4-D 처리가(Soh et al. 1996), 신초발생에는 BA 와 NAA 혼합처리가 매우 중요한 것으로 알려져 있다(Chung and Cho 2002; Kasumi et al. 2006; Han et al. 2014). 그러나 많은 식물의 종과 재료에 따라 여러 종류의 옥신과 사이토키닌을 혼용처리의 중요성이 보고되어 있기 때문에(Turgut-Kara and Ari, 2008; Park and Choi 2015) 신초발생과 같은 형태발생을 통한 식물체 대량생산 연구를 위해서는 호르몬의 선택과 적정농도의 선택이 필수 불가결하다 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 도라지 기내 식물체 대량생산을 위한 최적의 배양조건을 규명하기 위하여 미성숙한 잎과 배축절편을 1.0 mg/L 2,4-D와 kinetin 또는 BA 를 각각 조합첨가한 MS 배지에 배양하여 최적의 배양절편과 호르몬 종류 및 농도를 선정하기 위하여 시도하였다.

재료 및 방법

배양재료

도라지(*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) 종자를 70% 알

코율에 1분, 0.4% 클로락스용액에 15분간 침적하면서 표면 살균하였고, 이후 멸균수로 3-5회 수세하였다. MS기본배지(Murashige and Skoog 1962)에 치상하여 4주 후 유식물체를 얻었다. 잎과 배축절편 2 × 3 mm 크기로 절단하여 배양재료로 이용하였다(Fig. 1A)

신초 형성에 대한 호르몬 조합의 효과

도라지 잎과 배축 절편으로부터 신초 형성에 대한 kinetin과 BA 효과를 조사하기 위하여 각 절편을 1.0 mg/L 2,4-D와 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L kinetin 또는 BA를 각각 조합 첨가한 MS배지에 옮겨 24°C, 광주기(46 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) 조건으로 약 6주 동안 배양하였다. 배양 6주째에 배양절편으로부터 신초를 형성하는 빈도를 기록하였으며, 처리구 당 9개의 절편을 3회 반복 수행하였다. 또한 배양절편으로부터 신초를 조심스럽게 분리하여 호르몬이 첨가되지 않은 $\frac{1}{2}$ MS기본배지에 옮겨 6주 동안 배양하여 식물체를 유도하였다. 뿌리가 완전히 자란 유식물체는 배양병에서 꺼내어 수돗물에 세척하여 붙어있는 배지를 제거하였고, 멸균된 토양에 옮겨 온실에서 순화하였다.

결과 및 고찰

도라지 배축과 잎 절편을 2,4-D와 kinetin 또는 BA 각각 농도별 조합 첨가된 MS배지에 배양하면서 관찰 하였다. 배양 2주째부터 절단부위로부터 세포분열이 시작되면서 초기 캘러스가 형성되기 시작하였고, 부드러운 노란색의 캘러스가

Table 1 The frequency (%) of shoot organogenesis on MS medium supplemented with the combinations of 1.0 mg/L 2,4-D and cytokinins (0.1–2.0 mg/L) in the cultures of leaf and hypocotyl explants of *Platycodon grandiflorum* for 6 weeks

Explants	^a Frequency (%) of callus with shoot organogenesis		Total (%)
	Kinetin + 2,4-D	BA + 2,4-D	
Leaf	70.38 ± 10.16	42.38 ± 5.12	56.38
Hypocotyl	20.83 ± 4.09	35.56 ± 4.98	28.20

^aEach value represents the mean ± standard error of at least three replicates

Table 2 The effects of combining cytokinins and 2,4-D on the plant regeneration from the cultures of leaf explants on the MS medium in *Platycodon grandiflorum* for 6 weeks

Cytokinin concentrations with 2,4-D 1.0 (mg/L)	^a Frequency (%) of callus with shoot organogenesis	
	Kinetin	BA
0.1	60.00 ± 9.13	47.73 ± 4.51
0.5	68.55 ± 5.12	45.23 ± 3.18
1.0	94.25 ± 10.34	55.25 ± 4.73
2.0	58.73 ± 3.72	21.31 ± 2.62

^aEach value represents the mean ± standard error of at least three replicates

왕성하게 형성되었다(Fig. 1B). 배양 4주째부터 노란색의 캘러스 주위로부터 흰색의 단단한 신초돌기 형성되었으며(Fig. 1C), 배양 6주째에는 녹색을 띠는 뚜렷한 신초가 형성되었다(Fig. 1D). 이러한 신초는 1/2 MS 기본배지에서 뿌리가 잘 발생하였으며, 토양에서 건강하게 자라 보라색의 꽃을 피울 수 있었다(Fig. 1E, F, G).

배양절편에 따른 신초형성율을 비교한 결과, 잎 절편의 경우 1.0 mg/L 2,4-D와 kinetin을 조합하였을 때 70.38%, BA와 조합에서 42.38%를 나타냈고, 배측 절편의 경우 kinetin 조합배지에서 20.83% 그리고 BA 조합배지에서 35.56%를 보여 전체 신초발생율은 잎 절편(56.38%)이 배측 절편(28.20%)보다 높은 것으로 나타났다(Table 1). 대부분의 식물의 경우 배양절편의 종류와 성숙도에 따라 캘러스와 같은 탈분화과정이나 신초발생과 같은 기관발생능의 차이를 보일 수 있다(Choi et al. 2002). 도라지의 경우에도 최적의 식물체 재생 조건을 규명하기 위하여 많은 배양재료를 사용해 왔는데, 체세포배유도를 위해서 성숙한 접합자 배와 약 배양(Ko 1999; Ko et al. 1993)을 진행해 왔고, 특히 성숙한 접합자 배의 43%로부터 체세포배가 형성됨을 보고하였다(Kim and Liu 1999). 신초형성에서도 도라지 자방(ovary)을 이용하여 약 73.3%의 빈도를 얻을 수 있었고(Kasumi et al. 2006), 잎 배양을 통해 676.6%의 높은 신초 형성빈도를 보고한 바 있다(Han et al. 2014). 이와 같이 본 연구에서와 마찬가지로 배양절편에 따라 기관발생능이나 체세포배발생능이 달라질 수 있음을 보여주었으며, 특히 잎 절편의 경우 kinetin이 그리고 배측 절편의 경우 BA가 효과적으로 나타나 배양절편에 따라 호르몬의 종류가 중요함을 보여주었다.

2,4-D와 kinetin 또는 BA 조합첨가에 의한 신초 형성율을 비교한 결과, kinetin의 경우 잎 절편 배양에서 0.1 mg/L에서

농도가 증가 할수록 신초형성율이 증가하여 1.0 mg/L에서 최대치를 보였고, 2.0 mg/L에서는 감소하는 경향을 나타냈다. 최대 형성빈도는 1.0 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L kinetin 조합첨가배지에서 94.25%의 신초형성율을 보였다. BA의 경우 kinetin 농도기울기와 비슷한 신초형성율 경향을 보였고, 최대 형성빈도는 1.0 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L BA 첨가배지에서 55.25%였다(Table 2). 반면 배측 절편에서 kinetin의 경우 0.1 mg/L 농도에서 최대치를 보이고, 농도가 증가할수록 신초 형성빈도가 감소하였다. 가장 높은 빈도(37.82%)는 1.0 mg/L 2,4-D와 0.1 mg/L kinetin 조합첨가 배지에서 얻어졌다. BA 경우 kinetin 농도기울기와 다르게 신초형성율을 나타냈으며, 가장 높은 빈도(47.18%)는 1.0 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L BA 조합첨가배지에서 얻을 수 있었다(Table 3). 이와 같이 본 연구에서는 cytokinin의 종류와 농도에 따라 신초형성 빈도는 달라질 수 있음을 보여주었으며, 이는 식물의 종과 배양 재료에 따라 최적의 호르몬 종류와 적정 농도를 선정하여 사용하는 것이 매우 중요하다 할 수 있다(Park and Choi 2015). 대표적으로 대부분 식물에서 체세포배 발생은 1.0~2.0 mg/L의 2,4-D 농도를 선호하지만 대두의 체세포배 발생에는 훨씬 높은 7.5~10.0 mg/L 2,4-D의 높은 농도가 요구되어 달라질 수 있음을 보여주며(Cho and Widholm, 2002), 자운영 모상근으로부터 체세포배 발생에는 2,4-D가 효과적이지만 같은 속인 *Astragalus chrysochlorus*에서는 3.0 mg/L IAA가 효과적인 것으로 보고되어(Turgut-Kara and Ari, 2008) 식물 종과 속(*genus*)에 따라 다를 수 있음을 보여주었다. 또한 도라지 신초형성에는 BA와 NAA 조합첨가가 매우 효과적으로 알려져 있으며, 가장 적정농도는 0.5 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA로 보고되어 왔다(Han et al., 2014; Ko 1999; Ko et al. 1993). 이는 많은 작물의 신초발생 연구에서 BA가 매우 효과적이라는 결과와 일치하고 있다(Malik and

Table 3 The effects of combining cytokinins and 2,4-D on the plant regeneration from the cultures of hypocotyl explants on the MS medium in *Platycodon grandiflorum* for 6 weeks

Cytokinin concentrations with 2,4-D 1.0 (mg/L)	^a Frequency (%) of callus with shoot organogenesis	
	Kinetin	BA
0.1	37.82 ± 2.24	44.55 ± 3.16
0.5	21.49 ± 3.18	41.01 ± 2.19
1.0	19.60 ± 2.98	47.18 ± 5.81
2.0	4.53 ± 0.94	9.55 ± 0.71

^aEach value represents the mean ± standard error of at least three replicates

Saxena 1992; Gill and Saxena 1992; Barwale et al., 1986; Wright et al., 1986). 그러나 도라지 자방 배양으로부터 신초형성은 1.0 mg/L NAA와 5.0 mg/L BA배지가 더 효과적인 것으로 보고되어(Kasumi et al. 2006) 적정농도가 다를 수 있음을 보여 주었고, 자운영 속(*genus*)인 *Astragalus melilotoides*에서 신초형성에 BA보다 2,4-D와 kinetin이 조합이 가장 효과적인 것으로 보고되었다(Hou and Jia, 2004). 이는 같은 식물 속 또는 종에서 호르몬 종류와 농도에 따라 신초형성 빈도가 달라질 수 있음을 보여주고 있으며, 특히 농도 또한 매우 중요한 요소임을 보여주고 있다. 본 연구에서도 마찬가지로 도라지 배양 절편에 따라 신초형성에 적합한 호르몬의 종류와 농도가 다를 수 있으며, 특히 배축의 경우는 kinetin보다는 BA가, 잎 절편에서는 BA보다 kinetin이 효과적임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 향후 도라지 기내 대량생산 시스템에 적용시킬 수 있을 뿐 아니라 유용형질 도입을 위한 형질전환 연구에서도 매우 중요한 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

도라지(*Platycodon grandiflorum* (Jacq. A. DC.))에서 신초발생에 대한 최적의 호르몬 조건을 조사하기 위하여 잎 및 배축 절편을 1.0 mg/L 2,4-D와 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mg/L BA 또는 kinetin과 각각 조합 첨가한 MS 기본배지에 6주 동안 명 배양 하였다. 배양절편에 따라 신초발생율은 잎 절편에서 56.38%로 배축절편(28.20%)보다 높았다. Kinetin과 BA를 2,4-D와 조합첨가 하였을 때 kinetin의 경우 앞에서 70.38%로 BA (42.38%)보다 더 효과적이었으며, 반면 BA의 경우 배축에서는 35.56%로 kinetin (20.83%)보다 더 높은 빈도를 보였다. 가장 높은 신초형성 빈도(94.20%)는 1.0 mg/L 2,4-D와 1.0 mg/L kinetin이 조합첨가된 MS 배지에서 잎 절편을 배양하였을 때 얻을 수 있었다. 대부분의 신초는 1/2 MS기본배지에서 뿌리를 유도한 후 토양에서 완전한 식물체를 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 최적의 기내배양 조건을 통해 도라지의 대량생산 가능성을 보여주었다.

사 사

이 논문은 2017년도 남부대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

References

Barwale UB, Meyer MM, Widholm JM (1986) Screening of *Glycine max* and *Glycine soja* genotypes for multiple shoot formation at the cotyledonary node. *Theor. Appl. Genet.* 72: 423-428

Cho DY, Lee EK, Soh WY (1998) Plant regeneration from somatic embryo with structural diversity from leaf explants cultures of *Osteicum koreanum* Kitagawa. *Kor J Plant Tiss Cult* 25:51-56

Cho HJ, Widholm JM (2002). Improved shoot regeneration protocol for hairy roots of the legume *Astragalus sinicus*. *Plant Cell, Tiss Org Cult* 69(3):259-269

Choi PS, Komatsuda T, Kim MH, Choi KM, Choi DW, Liu JR (2002) Screening of soybean recombinant inbred lines for high competence somatic embryogenesis. *Kor J Plant Biotechnol* 29:135-138

Choi SR, Kim MJ, Eun JS, Ahn MS, Lim HS, Ryu J, You DH (2004) Effects of membrane filter and sucrose concentrations on the growth of balloon flower (*Platycodon geandiflorum* A. DC.) plantlets in vitro. *Kor J Plant Biotechnol* 31:209-217

Chung JH, Cho SH (2002) Tissue cultures of *Platycodon grandiflorum*. *J Agricult Life Sci* 36:9-18

Eun JS, Kim YS, Kim YH (2000) Effects of light emitting diodes on growth and morphogenesis of in vitro seedling in *Platycodon geandiflorum*. *Kor J Plant Tiss Cult* 27:71-75

Erisen S, Yorgancilar M, Atalay E, Babaoglu M, Duran A (2010.) Callus induction and plant regeneration of endemic *Astragalus nezaketiae* in Turkey. *Electron of Biotechnol.* DOI: 10.2225/vol13-issue6-fulltex-3

Gill R, Saxena PK (1992) Direct somatic embryogenesis and regeneration of plants from seedling explants of peanut (*Arachis hypogaea*): promotive role of thidiazuron. *Can J Bot* 70:1186-1192

Han C, Lee Y (1976) Induction of plantlets in the anther culture of *Platycodon grandiflorum*. *Kor J. Plant Tiss Cult* 4:1-3

Han EH, Son YW, Kim MB, Shin YW, Cho YS, Lee SW (2014)

- Establishment of tissue culture and acclimation of white balloon flower (*Platycodon grandiflorum* DC. cv. Jangback) for the eaising of *in vitro* propagated seedlings. J Plant Biotechnol. 41:134-139
- Hou SW, Jia JF (2004) High frequency plant regeneration from *Astragalus melilotoides* hypocotyl and stem explants via somatic embryogenesis and organogenesis. Plant Cell Tiss Org Cult 79(1):95-100
- Kasumi M, Suzuki K, Gonai T, Nog M, Yamafa T, Takatsu Y (2006) Adventitious buf formation and plant regeneration from ovary explants in balloon flower (*Platycodon geandiflorum*). J Ja Soc Hort Sci 75:284-286
- Kim SW, Liu JR (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryo cultures of balloon flower. Plant Cell Tiss Org Cult 58:227-230.
- Ko JA (1999) Effect of low temperature pretreatment on pollen dimorphism and embryo formation in anther culture of *Platycodon grandiflorum*. Kor J Plant Tiss Cult 26:149-156
- Ko JA, Kim YS, Kim MJ, Eun JS (1993) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and stem culture of *Platycodon grandiflorum*. Kor J. Breeding 25:337-343
- Lee BK, Ko JA, Kim YS, Eun JS (1993) Embryogenesis and plnat regeneration in anther cultures of *Platycodon grandiflorum*. Kor J Plant Tiss Cult 20:153-157
- Lee SW, Son YW, Shin YW, Cho YS (2014) The current status in Korea and future perspectives of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) in Gyeongsangnam-do. Kor J Int Agric 26: 68-72
- Malik KA, Saxena PK (1992) Regeneration in *Phaseoulus vulgaris* seedling by N⁶-benzylaminopurine and thidiazuron. Planta 186:384-389
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-479
- Park MS, Choi PS (2015) Plant regeneration from hypocotyl explants of *Astragalus sinicus* L. J Plant Biotechnol 42: 396-400
- Soh WY, Cho DY, Lee EK (1996) Multicotyledonary structure of somatic embryo formed cell cultures of *Daucus carota* L. Korean J Bot 39:71-79
- Turgut-Kara N, ARI Ş (2008) *In vitro* plant regeneration from embryogenic cell suspension culture of *Astragalus chrysochlorus* (*Leguminoseae*). Afr J Biotechnol 7:1250-1255
- Wright MS, Koehler SM, Hinchee MA, Carnes MG (1986) Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. Plant Cell Rep 5:150-154