

## 동백 자엽절편으로부터 부정아 형성을 통한 식물체의 재분화

김광수\*\* · 황성진\*† · 표병식\* · 김선민\*

\*동신대학교 한약재산업학과, \*\*동신대학교 생물자원산업화지원센터

### Adventitious Bud Induction and Plant Regeneration from Cotyledon Explants of *Camellia japonica* L.

Kwang Soo Kim\*\*, Sung Jin Hwang\*†, Byoung Sik Pyo\*, and Sun Min Kim\*

\*Dept. of Oriental Medicine Materials, Dongshin Univ., Naju 520-714, Korea.

\*\*Biotechnology Industrialization Center, Dongshin Univ., Naju 520-714, Korea.

**ABSTRACT :** Culture conditions for plant regeneration of *Camellia japonica* were achieved by organogenesis in explants of cotyledon. Seed cotyledons were cultured on MS medium containing various auxin, 2,4-D or NAA and cytokinins BA. The adventitious shoot buds were efficiently formed without embryogenesis on the basal region of cotyledon cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/l 2,4-D and 1 mg/l BA. Seed cotyledons could be used as a source of explants in experiments of genetic transformation of the genotypes evaluated for improving the efficiency of production of transgenic *Camellia* plants.

**Key words :** *Camellia japonica* L. seed cotyledons, organogenesis, plant regeneration

## 서 언

동백나무 (*Camellia japonica* L.)는 우리나라의 남부해안의 도서지방을 중심으로 서식하는 상록교목으로 주로 관상용이나 목재용으로 사용되어질 뿐만아니라 민가에서는 종자로부터 얻는 동백유를 식용유, 화장품용, 머리카름용으로 사용하였다. 또한 건조된 꽃잎을 토혈과 같은 증상에 처방하거나 민가에서는 이뇨작용을 필요로 할 때 사용하기도 하였다. 동백나무의 종자는 40% 정도가 올레인산, 팔미틴산, 리놀산, 그리고 소량의 스테롤과 토코페롤이 포함된 오일로 채워져 있으며, 그 밖에 triterpene, tannin, benzenoid, steroid, flavonoid, 그리고 phenyl propanoid 등과 같은 생리활성물질이 종자는 물론 잎과 꽃 등에 함유되어 있는 것으로 밝혀지고 있다 (Pedroso & Pais, 1994; Tsushida & Takeo, 1984). 동백나무는 주로 삽목과 실생법에 의해 번식되어지는 수종이다. 최근 이와같은 동백나무에 대한 기내 (*in vitro*) 배양연구가 다양한 각도에서 시도되고 있다. 기관분화를 통한 미세증식 (Mondal *et al.*, 1998; Sandal *et al.*, 2001)과 체세포배발생을 통한 증식 (Ponsamuel *et al.*, 1996; Akula *et al.*, 2000), 그리고 형질전환 (Mondal *et al.*, 2001)등이 이루어졌다. 단지 국내에 자생하고 있는 수종들에 대한 연구가 거의 없다는게 아쉬운 점

이다. 목본식물의 품종개량에 사용되는 전통적인 교잡육성 방식은 이형접합체의 발생 빈도가 매우 높고 시간과 비용이 많이 소모되기 때문에 최근에는 분자생물학적 기법을 이용하여 새로운 유전형질을 전이하는 형질전환 방식에 초점을 맞추어 나가고 있다 (Mondal *et al.*, 2001). 이와같은 형질전환기술을 이용한 신품종 개발을 위해서는 배양 조직으로부터 식물체를 재분화하는 선행 연구가 이루어져야 한다.

본 연구에서는 국내 자생 수종들에 대한 형질전환 연구를 위해서 자엽절편으로부터 식물체를 재분화시킬 수 있는 최적 조건을 확보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 식물재료 및 표면살균

동백 종자는 전남 장흥군 천관산 일대의 동백 자생 군락지에서 9~10 월경에 열개되지 않은 것을 채취하여 동신대학교 종자은행에서 저온 보관하면서 종자의 크기가 지름 10 mm 정도되는 것만을 선별하여 사용하였다. 종자는 수돗물에서 일단 2~3회 세척한 후 외종피와 내종피를 제거하고 70% ethanol에서 3분간, 그리고 tween 20을 첨가한 3% NaOCl 용액에서 15분간 각각 침지시키는 방식으로 표면살균 처리를 하고 멸균

†Corresponding author: (Phone) +82-61-330-3225 (E-mail) jimhwang@naver.com

Received February 16, 2005 / Accepted March 31, 2005

수로 5회 세척하였다.

**2. 배지조제**

기본배지로는 MS배지 (Murashige & Skoog, 1962)를 사용하였으며, 여기에 탄소원으로 3% sucrose와 고휘형제로 0.3% Phytigel (Sigma Co. USA), 그리고 식물성장조절물질을 농도별로 첨가하였다. pH는 5.8로 조정하였으며, 증탕 후 121°C에서 20분간 감압멸균하여 사용 하였다.

**3. 체세포분화 유도**

시토키닌류인 BA와 옥신류인 NAA, 2,4-D를 농도별로 단독 또는 조합하여 첨가한 기본배지에 표면살균한 종자로부터 얻은 자엽을 페티리디쉬 당 9개씩 치상하여 광조건 하에서 배양하였다. 한편, 자엽조직 부위별 분화양상은 절취한 자엽을 5등분 하여 배지에 치상한 후 각각 분화양상을 비교 하였다.

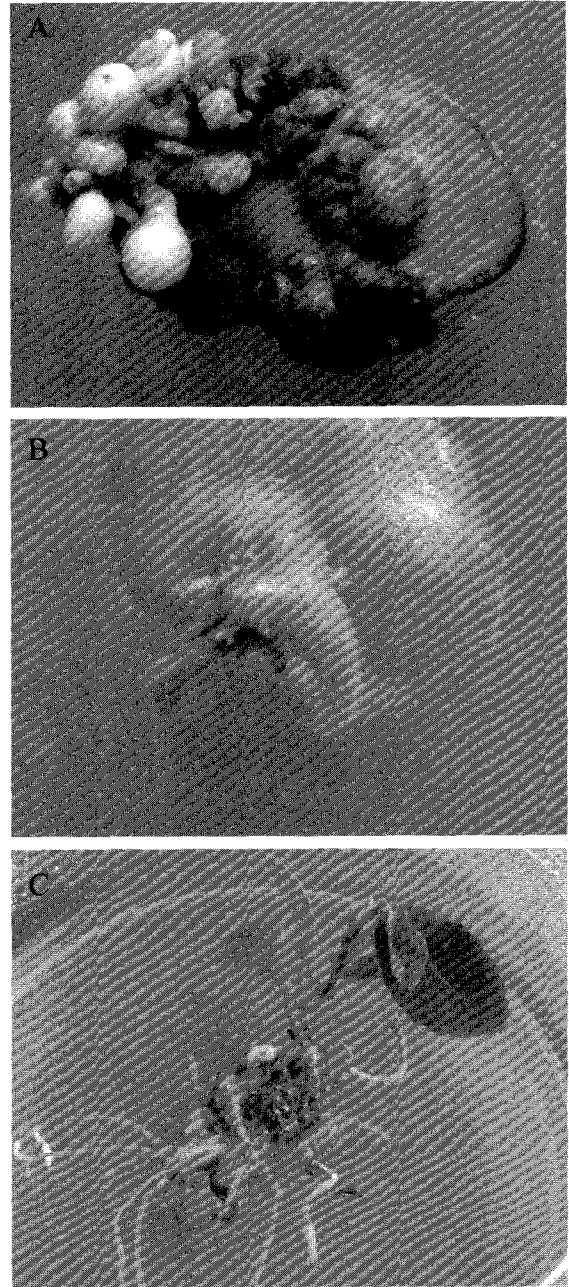
**4. 부정근 형성**

자엽절편으로부터 형성된 발아묘로부터 부정근을 위한 최적 조건을 확인하기 위하여 IBA를 0.5, 1.0, 그리고 2.0 mg/l를 첨가하거나 식물성장조절물질을 첨가하지 기본배지에 자엽절편으로부터 유기한 유묘를 치상하였다.

**결과 및 고찰**

**자엽절편으로부터 체세포분화 유도**

모식물체로부터 절취한 조직절편으로부터 식물체를 생산 하려는데 있어서 일차적으로 고려해야 할 점은 절취부위의 나이 (age), 생리적인 상태, 그리고 활성도 (viability)와 같은 시료 자체가 갖는 조건들이다 (Kato, 1974). 많은 종류의 식물들에서 이와같은 기본조건을 충족할 수 있는 것으로는 분화의 정도가 낮고 세포활성이 높은 분열조직 즉, 미숙배, 자엽, 생장점, 어린 잎, 어린 화서, 배축, 주심 등을 들 수 있다 (Vieitez & Barciela, 1990; Koh et al., 1997). 본 연구에서 동백의 잎과 줄기와 같은 성숙조직에서부터 측아와 자엽등과 같은 미분화 조직을 사용하여 기내배양을 시도한 결과 식물성장조절물질에 대한 반응도나 배지 적응도에 있어서 현저한 차이를 보여주었다 (자료 미제시). 따라서, 동백 종자로부터 자엽을 절취하여 2,4-D, NAA, 그리고 BA가 농도별 (0, 0.1, 0.5, 1.0, 3.0 mg/l)로 단독 또는 조합하여 처리된 MS배지에 치상 한 결과 1주일 이 후부터 자엽 절편체의 가장자리가 부풀어 오르는 조직팽화가 시작되어 2주 후에 캘러스의 형성 없이 직접 구형의 원배체 (proembryogenic mass)가 형성되었다 (Fig. 1A). 조직의 팽화현상과 원배체의 형성은 배축 중심에 가까운 조직절편에서 뚜렷히 나타났다. 이와같은 현상은 배축 중심부에서부터 말단부에 이르는 조직에서 내재호르몬의 농도구배가



**Fig. 1.** Plant regeneration via adventitious shoot buds formation in cotyledon explants of *Camellia japonica* L. A, Cluster of pro-embryogenic mass induced from cotyledon explant on MS medium containing 0.1 mg/l 2,4-D and 1 mg/l BA. ; B, Adventitious shoots formation ; C, Regenerated plantlets.

현저하고 조직세포의 생리적 상태 또한 다양하다는데 이유가 있다. 자엽을 배축 중심부와 같은 방향으로 하여 5등분한 후 배지에 치상한 결과 중심에 가까운 절편일수록 반응이 뚜렷하게 나타났다 (Table 1). 4주가 경과하면서부터 식물성장조절물질을 처리하지 않은 대조구와 처리구 모두에서 다소 차이는 있으나 팽화된 조직으로부터 캘러스 형성없이 직접 원배체가 형성됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 1B). 식물성장조절물질의 처

**Table 1.** Effect of explant region on pro-embryogenic mass (PEM) formation in cotyledon explants of *C. japonica* L.

Explant regions	No. of explants incubated	PEM formation (%)
proximal	30	36
sub-proximal	30	27
median	30	15
sub-distal	30	15
distal	30	9

**Table 2.** Effects of plant growth regulators on adventitious shoot buds formation in cotyledon explants of *C. japonica* L.

Plant growth regulator (mg/l)	No. of explants incubated	Shoot buds formation (%)
Control	90	4.4
2,4-D 0.1	BA 0	15.6
	0.1	13.3
	0.5	27.7
	1.0	34.4
	3.0	22.2
	1.0	15.6
1.0	0	15.6
	0.1	12.2
	0.5	8.9
	1.0	10.0
	3.0	5.6
	NAA 0.5	90
1.0	0.5	90
	1.0	90
	3.0	90
	0.5	90
	1.0	90
	3.0	90

\* Explants were cultured on MS medium containing 3% sucrose (pH 5.8).

리구 별 부정아 형성을 조사한 결과 0.1 mg/l 2,4-D와 1.0 mg/l의 BA를 조합하여 처리한 실험구에서 가장 높게 나타났다 (Table 2). 본 실험에서는 대체적으로 BA를 NAA와 함께 처리하는 것보다는 2,4-D와 함께 처리할 경우 체세포분화를 유도하는데 효과적 이었으며, 단독으로 처리할 경우에는 단지 NAA 처리구에서 반응을 보여주었다. 한편, 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 기본배지에서 체세포분화를 확인할 수 있었다. 종자에서 채취한 접합자배의 경우 채취 시기와 크기에 따라 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 기본배지 만으로도 약 69%까지 체세포배의 발생이 이루어질 수 있다는 연구결과도 있으나 (Vicitez & Barciela, 1990) 일반적으로 옥신과 시토키닌의 처리를 통해서 좀더 효율적으로 재분화가 가능하다고 볼 수 있다 (Ficcadenti & Rotino, 1995; Gambley & Dodd, 1990). 본 실험에서는 식물성장조절물질을 처리하지 않은 조건에 비해 옥신과 시토키닌류를 적절히 혼합함으로써 체세포배의 형성을 가속화 시켜주는 것으로 보였다. 한편, NAA를 BA와 함께 처리할 경우 2,4-D를 처리할 때에 비해

**Table 3.** Effect of plant growth regulators on adventitious roots formation in *C. japonica* L.

IBA (mg/l)	No. of explants incubated	Roots formation (%)
0	30	38
0.5	30	-
1.0	30	-
2.0	30	-

\* Explants were cultured on MS medium containing 3% sucrose (pH 5.8).

부정아의 형성이 현저히 낮았으며 캘러스가 유기되었다. 자엽절편으로부터 형성된 캘러스는 두가지 형태로 구분되어 나타났다. 표면이 부드럽고 물기가 많은 것과 단단하고 세포질이 충밀하게 보이는 캘러스 형태로 성장률에 있어서 다소 차이를 보여 좁은 물론 식물성장조절물질에 대한 반응도 다르게 나타났다 (자료 미제시). 자엽절편으로부터 형성된 유묘로부터 발근을 유도하기 위한 실험에서 식물성장조절물질을 첨가하지 않은 배지조건이 IBA를 농도별로 처리할 경우에 비해 효과적임이 확인 되었다 (Table 3). 일반적으로 재분화 유묘로부터 발근의 유도를 위해서 소량의 옥신을 첨가한다 (Schween & Schwenkel, 2002). 그렇지만 본 연구에서처럼 식물성장조절물질을 처리하지 않아도 발근이 이루어지는 경우가 오히려 재분화 식물체 유도에 효과적이라고 볼 수 있다.

Li 등 (1996)은 agrobacterium을 이용한 형질전환 연구에서 자엽절편을 이용할 경우 다른 조직에 비해 상처치유반응이 정상적으로 일어날 수 있다는 점과 재분화능력을 갖는 세포군이 상처부위에 근접해 있다는 사실을 장점으로 보았다. 본 연구에서 얻어진 동백나무 자엽 조직절편으로부터 식물체의 재분화 조건은 형질전환이 어려운 목본류인 동백나무 수종에 대한 연구에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 적 요

기내배양을 통해 동백종자의 자엽절편으로부터 직접 체세포분화를 통하여 식물체를 재분화 시켰다. 종피를 제거한 후 표면살균 처리한 자엽절편을 2,4-D, NAA 및 BA가 단독 또는 조합 첨가된 MS 고체배지에 치상하였다. 원배체 형성을 통한 부정아 형성은 0.1 mg/l 2,4-D와 1 mg/l BA가 첨가된 처리구에서 이루어졌다. 부정아는 주로 자엽절편체의 배측에 가까운 기저부위에서 캘러스의 형성없이 직접 형성되었으며, 이로부터 형성된 유묘는 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 기본배지에서 정상적인 개체로 발달 하였다. 이와같은 연구결과는 앞으로 동백나무의 육종과 산업적 이용에 필요한 형질전환 연구에 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 산업자원부의 지역전략산업 석박사 연구인력 양성 사업의 연구결과로 수행되었음.

LITERATURE CITED

- Akula A, Becker D, Bateson M** (2000) High-yielding repetitive somatic embryogenesis and plant recovery in a selected tea clone, 'TRI-2025', by temporary immersion. *Plant Cell Reports* 19:1140-1145.
- Ficcadenti N, Rotino GL** (1995) Genotype and medium affect shoot regeneration of melon. *Plant Cell, Tissue and Org. Culture*. 40:293-295.
- Gambley RL, Dodd WA** (1990) An in vitro technique for the production de novo of multiple shoots in cotyledon explants of *Cucumis sativa* L.. *Plant Cell, Tissue and Org. Culture* 20:177-183.
- Kato Y** (1974) Bud formation on excised Heloniopsis leaf fragment: Effects of leaf age and the midrib. *Plant Cell Physiol.* 15:363-372.
- Koh JG, Park YC, Yang DY, Kim ES, Oh MY, Koh SC** (1997) Plant regeneration and somatic embryogenesis from zygotic embryo-derived callus of native *Prunus yedoensis* in Mt. Halla. *Korean J. Plant Tissue Culture* 24(6):345-349.
- Li HQ, Sautter C, Potrykus I, Puonti-Kaerlas J** (1996) Genetic transformation of *Manihot esculenta* Crantz.. *Nat. Biotechnol.* 14:736-740.
- Loh CS, Ingram DS, Hanke DE** (1983) Cytokinins and the regeneration of plantlets from secondary embryoids of winter oilseed rape, *Brassica napus* spp. oleifera. *New Phytol.* 95:349-358.
- Mondal TK, Bhattacharya A, Sood A, Ahuja PS** (1998) Micropropagation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) using Thidiazuron. *Plant Growth Regulation* 26:57-61.
- Mondal TK, Bhattacharya A, Ahuja PS, Chand PS** (2001) Transgenic tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze cv. Kangra Jat] plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. *Plant Cell Reports* 20:712-720.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue. *Physil. Plant* 15:473-497.
- Pedroso MC, Pais MS** (1994) Early detection of embryogenic competence and polarity in *Camellia japonica* L. by electron probe X-ray microanalysis. *Plant Science* 96:189-201.
- Ponsamuel J, Samson NP, Ganeshan PS, Sathyaprakash V, Abrsham GC** (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration from the immature cotyledonary tissues of cultivated tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Plant Cell Reports* 16:210-214.
- Sandal I, Bhattacharya A, Ahuja PS** (2001) An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 65:75-80.
- Schween G, Schwenkel HG** (2002) *In vitro* regeneration in *Primula* ssp. via organogenesis. *Plant Cell Rep.* 20:1006-1010.
- Tsushida T, Takeo T** (1984) Occurrence of tanine in *Camellia japonica* and *Camellia sasanqua*. *Agri. Biol. Chem.* 48(11):2861-2862.
- Vieitez AM, Barciela J** (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryonic tissue of *Camellia japonica* L. *Plant Cell Tissue, & Organ Culture* 21:267-274.