



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

석사학위논문

주걱비름(*Sedum tosaense* Makino)
잎절편으로부터의 식물체 재분화
및 대량증식

제주대학교 대학원

원예학과

고명석

2013년 2월

주걱비름(*Sedum tosaense* Makino)
잎절편으로부터의 식물체 재분화
및 대량증식

지도교수 소인섭

고명석

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함

2013년 2월

고명석의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장	<u>강 훈</u>
위 원	<u>송 관 정</u>
위 원	<u>소 인 섭</u>

제주대학교 대학원

2013년 2월

Regeneration and mass propagation from
leaf explants of *Sedum tosaense* Makino

Myoung-Suk Ko
(Supervised by professor In-Sup So)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the
degree of Master of Science in Horticulture

2013. 2.

Department of Horticultural Science

GRADUATE SCHOOL

JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

목 차	i
Abstract	iii
List of Tables	iv
List of Figures	vi
I. 서 언	1
II. 재료 및 방법	4
1. 식물재료	4
2. 잎절편으로부터의 식물체 재분화	4
3. 대량증식	6
4. 기내발근유도	6
5. 광독립배양에 의한 순화전처리	8
6. 무균배양묘의 토양순화	8
III. 결과 및 고찰	9
1. 잎절편으로부터의 식물체 재분화	9
2. 대량증식	17
3. 기내발근유도	20
4. 광독립배양에 의한 순화전처리	23
5. 무균배양묘의 토양순화	27

IV. 적	요	30
V. 참 고 문 헌		31
VI. 감 사 의 글		38

Abstract

The aim of this study was to establish plant regeneration from leaf explants of globally rare and endangered species *Sedum tosaense* Makino.

The leaf explants of *S. tosaense* were cultured on the MS medium supplemented with different concentration of BA and NAA for plant regeneration. Callus induction and weight obtained the highest (100%) on MS medium containing $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA. The highest number of shoots, weight of shoots, compactness of shoots were regeneration when callus were cultured on MS medium containing $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA. The axillary bud were cultured on the MS media supplemented with combination of BA and NAA for *in vitro* mass propagation of *S. tosaense*. MS medium supplemented with $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA was number of shoots 7.9, weight of shoots 66.9 mg by effective the best for mass propagation. For rooting, MS medium supplemented with and without $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ activated charcoal was tested. The optimal results were observed using MS medium supplemented with $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ activated charcoal, on which 85.7 (No. of root), length of root 4.6 cm. 1200 ppm CO₂ and 350 ppm CO₂ were supplied for make certain the effects of CO₂ on pre-acclimatization by photoautotrophic culture. Number of leaf, leaf width, leaf thickness, length of shoot, length of root, total weight and chlorophyll contents of 1200 ppm CO₂ treatment was estimated higher than 350 ppm CO₂ treatment. The survival rate was 100% in soil acclimatization of regenerated plantlets were mixed culture soil with peat moss and perlite that was the highest culture condition and the greatest growth.

List of Tables

Table 1. Hormonal combination for plant regeneration from leaf explants of <i>Sedum tosaense</i> Makino.	5
Table 2. Hormonal combination for shoot multiplication from axillary bud culture of <i>S. tosaense</i>	7
Table 3. Effects of BA and NAA on callus induction from leaf explants of <i>S. tosaense</i> in MS medium supplemented with 30 g·L ⁻¹ sucrose and 7.0 g·L ⁻¹ agar after 5 weeks of culture.	11
Table 4. Effect of BA and NAA on shoot induction from leaf explant of <i>S. tosaense</i> in MS medium supplemented with 30 g·L ⁻¹ sucrose and 7.0 g·L ⁻¹ agar after 16 weeks of culture.	12
Table 5. Effect of BA and NAA on shoot multiplication from axillary bud culture of <i>S. tosaense</i> on MS medium supplemented with 30 g·L ⁻¹ sucrose and 7.0 g·L ⁻¹ agar after 9 weeks of culture.	18
Table 6. Effect of activated charcoal containing on root induction from plantlet of <i>S. tosaense</i> on MS medium supplemented with 30 g·L ⁻¹ sucrose and 7.0 g·L ⁻¹ agar after 9 weeks of	

culture.	21
Table 7. Effect of carbon dioxide concentrations on photoautotrophic culture from plantlets of <i>S. tosaense</i> after 8 weeks of culture.	24
Table 8. Effect of carbon dioxide concentrations on chlorophyll contents in <i>S. tosaense</i>	25
Table 9. Effect several soil of the growth and survival of plantlets of <i>S. tosaense</i> to soil pot after 12 weeks of culture.	28

List of Figures

- Fig. 1. Plant regeneration from leaf explant of *S. tosaense*. A, control; B, medium containing 0.0 mg·L⁻¹ BA and 1.0 mg·L⁻¹ NAA; C, medium containing 0.0 mg·L⁻¹ BA and 2.0 mg·L⁻¹ NAA; D, medium containing 0.0 mg·L⁻¹ BA and 5.0 mg·L⁻¹ NAA; E, medium containing 0.0 mg·L⁻¹ BA and 10.0 mg·L⁻¹ NAA. Scale bar, 2cm. 13
- Fig. 2. Plant regeneration from leaf explant of *S. tosaense*. A, medium containing 1.0 mg·L⁻¹ BA and 0.0 mg·L⁻¹ NAA; B; medium containing 1.0 mg·L⁻¹ BA and 1.0 mg·L⁻¹ NAA; C, medium containing 1.0 mg·L⁻¹ BA and 2.0 mg·L⁻¹ NAA; D, medium containing 1.0 mg·L⁻¹ BA and 5.0 mg·L⁻¹ NAA; E, medium containing 1.0 mg·L⁻¹ BA and 10.0 mg·L⁻¹ NAA. Scale bar, 2cm. 13
- Fig. 3. Plant regeneration from leaf explant of *S. tosaense*. A, medium containing 2.0 mg·L⁻¹ BA and 0.0 mg·L⁻¹ NAA; B, medium containing 2.0 mg·L⁻¹ BA and 1.0 mg·L⁻¹ NAA; C, medium containing 2.0 mg·L⁻¹ BA and 2.0 mg·L⁻¹ NAA; D, medium containing 2.0 mg·L⁻¹ BA and 5.0 mg·L⁻¹ NAA; E, medium containing 2.0 mg·L⁻¹ BA and 10.0 mg·L⁻¹ NAA. Scale bar, 2cm. 14

Fig. 4. Plant regeneration from leaf explant of *S. tosaense*. A, medium containing 5.0 mg·L⁻¹ BA and 0.0 mg·L⁻¹ NAA; B, medium containing 5.0 mg·L⁻¹ BA and 1.0 mg·L⁻¹ NAA; C, medium containing 0.0 mg·L⁻¹ BA and 5.0 mg·L⁻¹ NAA; D, medium containing 5.0 mg·L⁻¹ BA and 5.0 mg·L⁻¹ NAA; E, medium containing 5.0 mg·L⁻¹ BA and 10.0 mg·L⁻¹ NAA. Scale bar, 2cm. 14

Fig. 5. Plant regeneration from leaf explant of *S. tosaense*. A, medium containing 10.0 mg·L⁻¹ BA and 0.0 mg·L⁻¹ NAA; B, medium containing 10.0 mg·L⁻¹ BA and 1.0 mg·L⁻¹ NAA; C, medium containing 10.0 mg·L⁻¹ BA and 2.0 mg·L⁻¹ NAA; D, medium containing 10.0 mg·L⁻¹ BA and 5.0 mg·L⁻¹ NAA; E, medium containing 10.0 mg·L⁻¹ BA and 10.0 mg·L⁻¹ NAA. Scale bar, 2cm. 15

Fig. 6. Callus induction from leaf explants of *S. tosaense* after 4 weeks of culture. A, control; B, medium containing 0.0 mg·L⁻¹ BA and 5.0 mg·L⁻¹ NAA; C, medium containing 1.0 mg·L⁻¹ BA and 0.0 mg·L⁻¹ NAA; D, induced callus were cultured on the medium containing 2.0 mg·L⁻¹ BA, 1.0 mg·L⁻¹ NAA. Scale bar, A, 50mm; B; C; D, 2mm. 16

Fig. 7. Shoot conversion from axillary bud culture of *S. tosaense*. A, plant regeneration according to hormone combination; B, MS medium with 2.0 mg·L⁻¹ BA and 1.0 mg·L⁻¹ NAA; C, MS

medium with $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; D, MS medium with $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; E, MS medium with $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA. Scale bar, 2cm. 19

Fig. 8. *In vitro* rooting of *S. tosaense*. A, MS medium with or without activated charcoal; B, plant growth on MS medium with or without activated charcoal after 9 weeks of culture. Scale bar, 3cm. 22

Fig. 9. Growth of plantlets of *S. tosaense* to hardening process after 8 weeks of culture. A; B, According to concentration of carbon dioxide the growth of plantlets. Scale bar, 3cm. 26

Fig. 10. The growth of plantlets of *S. tosaense* to soil pot after 12 weeks of culture. A, acclimatized plantlets in soil after 12 weeks of transplanting; B, *S. tosaense* steadily grown in mixtures of peat moss and perlite; C, new sprouts after transplantation. Scale bar, A; B, 3cm; C, 0.5cm. 29

I. 서 언

주걱비름(*Sedum tosaense* Makino)은 돌나물과(Crassulaceae) *Sedum*속에 속하는 식물로서, 숲 가장자리의 건조한 바위틈에 자라는 다육질의 다년초이다. 가지는 옆으로 뻗으며 분지하고, 로제트 모양으로 월동하며, 봄에 다수의 꽃이 맺히는 줄기가 발생한다. 잎은 단엽으로 탁엽과 엽병이 없으며, 주걱형이다. 꽃은 3~5월에 피며 황색을 띠고, 종자는 갈색 타원형으로 소립이다. 주걱비름은 지금까지는 일본과 중국에만 분포하는 것으로 알려져 있는데, 특히 일본의 경우 주로 고지, 도쿠시마 지방의 석회암지대 바위 위에서 자라며, 개체수가 400개체 이하로서 희귀 및 멸종위기식물로 보호하고 있을 만큼 희소한 것으로 보고되고 있다(Anonymous, 2000; Song et al., 2004). 우리나라의 경우 국내 분포가 학술적으로 알려지지 않았으나, 2002년 제주도 북제주군 조천읍 해발 438m에 위치한 산굼부리 분화구 내에서 처음 발견되었으며, 우리나라 이름은 잎이 주걱모양이라는 점을 고려하여 ‘주걱비름’이라 명명하였다(Song et al., 2004).

돌나물과는 1년생 또는 다년생 초본이 대부분인데 다육성의 잎을 가지며, 학자에 따라 25~33속에 900~1300종으로 구성되어 있는 것으로 보고 있고, 대부분이 다음의 3개의 속, 즉 기린초속(*Sedum* L.: 300여종), *Crassula* L.(250여종), *Kalanchoe* Adans.(120여종)에 속한다(Cronquist, 1981; Lawrence, 1963). 우리나라에 분포하는 돌나물과 식물은 바위솔속(*Orostachys* Fisch. ex A. Berger), 낙지다리속(*Penthorum* L.), 돌꽃속(*Rhodiola* L.), 기린초속, 대구돌나물속(*Tillaea* L.) 등 5속으로 구성되어 있는데(Lee et al., 2003), 우리나라에 자생하고 있는 돌나물과의 *Sedum*속에는 돌나물(*Sedum sarmentosum*), 애기기린초(*Sedum middendorffianum*), 태백기린초(*Sedum latiovalifolium*), 썩의비름(*Sedum drythrostichum*), 땅채송화(*Sedum oryzifolium*), 둥근잎썩의비름(*Sedum rotundifolium*), 세잎돌나물(*Sedum sieboldii*) 등이 있다(Kwon and Jeong, 1999).

최근 돌나물과 식물들의 기능성 성분에 대해 많은 연구가 수행되어 그 효능이 증명 되고 있다. 홍경천(*Rhodiola sachalinensis*)은 항산화 효과(Park et al.,

2005)와 멜라닌 합성 저해효과(Choi et al., 2004)가 있는 것으로 알려져 있으며, 암 예방 및 암세포 증식억제 효과가 있는 것으로 나타났다(Bae, 2005). 그리고 기린초추출물은 우수한 항산화 효과를 나타냈으며(Lee, 2011), 돌나물은 항산화 활성이 높고(Kim et al., 2006), HIV 및 간염 바이러스에도 억제효과가 있으며(He et al., 1998; Woo et al., 1997), 항암작용(Kang et al., 2000; Park et al., 2002) 및 항고혈압 작용(Oh et al., 2004), 멜라닌 생성 저해효과(Sim et al., 2008), 뿐만 아니라 폐경기 여성이 폐경으로 인한 장애를 감소시키기 위하여 복용하는 에스트로젠을 대체할 수 있는 phytoestrogen이라는 물질을 다량 함유하고 있는 것으로 알려졌다(Kim, 2003).

식물의 조직배양은 우량종묘 및 유용물질 생산, 형질전환을 통한 저항성 유전자 도입 등의 목적으로 널리 이용되고 있다(Choi et al., 2002; Kim et al., 2002; Seo et al., 2002). 식물의 조직배양은 희귀 및 멸종위기종 식물의 번식 수단으로 이용이 가능하며 국내에서도 조직배양의 방법을 통하여 희귀종에 대한 현지의 보존을 위한 결과가 발표된 바 있다(Moon et al., 1997; Moon et al., 1999; Yoon, 1997). 식물조직배양의 효율은 식물 종에 따라 큰 차이를 보이며, 동일종에서도 품종 및 배양조직에 따라 성장조절물질의 요구도가 다르다. 이는 배양식물체내의 내생호르몬 양과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다(Lisowska and Wysokinska, 2000; Koroch et al., 2002). 대상식물의 배양부위에 따라서 외부에서 공급하는 성장조절물질에 다양하게 반응하기 때문에 배지내의 적정 성장조절물질의 종류와 농도를 결정하는 일이 매우 중요하다. 엽육이 두꺼운 다육성 식물인 주걱비름도 배양조직에 따라 성장조절물질의 요구도 다른 것으로 보인다. 하지만 아직까지 주걱비름의 조직배양에 관한 연구가 없으며, 같은 돌나물과 *Sedum*속 식물에서 평의비름의 잎과 줄기 절편으로부터 식물체의 재분화에 관한 연구(Yoon, 1997)와 돌나물 잎으로부터 식물체 재분화에 관한 연구(Ahn, 2004), 둥근잎평의비름의 식물체 재분화 연구(Kwon and Yoon, 2010) 외에는 거의 없는 실정이다.

식물체가 기내에서도 에너지 소스로 당의 첨가 없이 스스로 광합성에 의해 생장할 수 있게 하는 배양방법을 광독립배양(photoautotrophic culture)이라 한다(Kozai, 1991). 광독립배양의 장점은 강제환기에 의한 낮은 상대습도를 유지하

고 배지 내 sucrose와 같은 당원을 첨가하지 않아 오염률이 현저히 낮다는 점이다. 또한 이렇게 광독립배양 하에서 생산된 식물체는 이미 낮은 습도에서 스스로 광합성을 통하여 탄소원을 공급하므로써 토양식재 시 별도로 순화단계가 필요가 없다는 장점이 있다(Kozai, 1991; Ziv, 1995; Lian et al., 2002; Zobayed et al., 2004). 그러나 이러한 장점에도 불구하고 아직까지 광독립배양에 대한 많은 연구가 수행되지 못한 실정이다.

따라서 본 연구는 세계적 희귀 및 멸종위기식물인 주걱비름의 유전자원을 확보하기 위해 제주도 산굼부리에서 자생하고 있는 주걱비름 종자발아체의 잎절편을 식물조직배양기술을 이용하여 식물체재분화조건을 확립하고자 하였으며, 광독립배양을 통해 주걱비름 조직배양식물체의 적용성과 효율성을 확인하고자 하였다. 이러한 연구는 주걱비름과 같은 희귀 및 멸종위기식물의 유전자원을 확보할 수 있는 방안을 제시하고 앞으로 주걱비름이 보유한 다양한 기능성물질의 확보 및 효능연구에 중요한 원천소재를 제공할 것으로 기대한다.

II. 재료 및 방법

2.1. 식물재료

주걱비름(*Sedum tosaense* Makino) 종자를 제주도 서거문오름 곳자왈에서 2010년 6월에 종자를 채집하였다. 채집한 종자는 자연 건조하여 정선 후 멸균된 증류수로 세척한 다음 70% ethanol에 1분간 표면살균하였다. 멸균된 증류수로 5회 수세한 후 1% NaOCl 용액에 침지하여 10분간 흔들어 주었다. 다시 멸균된 증류수로 5회 수세한 후 멸균된 filter-paper 위에 올려놓고 물기를 제거하여 기내 파종하였다. 발아하여 생장한 주걱비름 종자발아체의 잎을 식물체 재분화 실험에 사용하였다.

2.2. 잎절편으로 부터의 식물체 재분화

주걱비름의 종자발아체로부터 식물체 재분화를 위해 잎을 0.5×0.5 cm의 크기로 절단하였다. 0.0, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA(Benzyl adenine)와 0.0, 1.0, 2.0, 50, 10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA(Naphthalene acetic acid)를 단용 혹은 혼용 처리한(Table 1) MS(Murashige and Skoog, 1962)배지($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose, $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ agar, pH 5.7)를 실험관(15 cm \times 2 cm)에 10 mL씩 분주하였다. 121 $^{\circ}\text{C}$, 1.5 기압으로 20분 간 배지를 고온·고압멸균 후 각각 실험관에 잎절편 1개씩 20반복 처리로 치상하였다. 5주 후 형성된 캘러스의 수와 캘러스의 무게를 조사하였고, 4개월 후 캘러스에서 유도된 싹의 수와 무게, 배양상태의 견고도를 조사하였다. 배양은 온도 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 광주기 16/8시간, 광도 1600 Lux의 조건에서 배양하였다.

Table 1. Hormonal combination for plant regeneration from leaf explants of *Sedum tosaense* Makino.

Treatment (mg·L ⁻¹)	
BA	NAA
0.0	0.0
	1.0
	2.0
	5.0
	10.0
1.0	0.0
	1.0
	2.0
	5.0
	10.0
2.0	0.0
	1.0
	2.0
	5.0
	10.0
5.0	0.0
	1.0
	2.0
	5.0
	10.0
10.0	0.0
	1.0
	2.0
	5.0
	10.0

2.3. 대량증식

주걱비름의 대량증식을 위해 캘러스 유도 시 효과가 좋았던 상위 4가지 호르몬 조합(Table 2)을 선정하였다. MS배지($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose, $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ agar, pH 5.7)에 호르몬을 첨가하여 1 L 배양병(17 cm, Φ 10 cm)에 각각 200 mL씩 분주하고 121°C , 1.5기압으로 20분 간 고온·고압 멸균하여 배지를 제조하였다. 캘러스에서 유도된 주걱비름의 줄기에서 액아를 포함하는 마디를 1 cm의 길이로 절단하여 각 처리구당 3개씩 5반복으로 치상하여 9주간 배양 후 신탄의 수와 무게, 배양상태의 견고도를 조사하였다. 배양은 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 광주기 16/8시간, 광도 1600 Lux의 조건에서 배양하였다.

2.4. 기내발근유도

기내발근을 위해 기내증식된 주걱비름의 줄기에서 마디를 1 cm의 길이로 절단하고 MS발근배지($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose, $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ agar, pH 5.7)에 치상하였다. Activated charcoal이 기내발근에 미치는 영향을 알아보기 위해 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ activated charcoal를 함유한 MS발근배지와 activated charcoal 무첨가한 MS발근배지를 1L 배양병에 각각 200 mL씩 분주하고 121°C , 1.5기압으로 20분 간 고온·고압 멸균하여 배지를 제조하였다. 각 처리구당 3개씩 5반복 치상하고 9주간 배양하여 뿌리를 유도한 후 뿌리의 수와 뿌리의 길이를 조사하였다. 배양은 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 광주기 16/8시간, 광도 1600 Lux의 조건에서 배양하였다.

Table 2. Hormonal combination for shoot multiplication from axillary bud culture of *S. tosaense*.

Treatment	
BA (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)
1.0	1.0
	2.0
2.0	1.0
	2.0

2.5. 광독립배양에 의한 순화전처리

광독립배양에 의한 순화전처리를 위해 기내에서 배양 중인 주걱비름 유식물체를 꺼내 증류수로 세척하여 뿌리에 묻은 배지를 제거하였다. 사각 plastic 배양병(SPL, Korea)에 질석 25 g과 sucrose를 첨가하지 않은 MS액체배지 80 mL을 첨가하여 배지를 제조하였다. 광독립배양 시 이산화탄소가 미치는 영향을 알아보기 위해 한 처리구는 이산화탄소농도가 1200 ± 100 ppm인 광독립배양실(온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 광주기 16/8, 광도 1600 Lux)에서 배양하였고, 또 다른 처리구는 이산화탄소농도가 350 ± 100 ppm인 일반배양실(온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 광주기 16/8시간, 광도 1600 Lux)에서 배양하였다. 처리구당 2개체씩 16반복하여 이식하였다. 두 처리구 모두 배양병의 뚜껑을 닫지 않고 배양되었으며, 2주 간격으로 sucrose가 첨가되지 않은 MS액체배지를 보충하였다. 8주 후 성장한 주걱비름의 무게, 잎의 수와 두께, 뿌리의 수와 길이, 줄기의 길이, 엽록소함량을 조사하였다. 엽록소함량의 측정은 식물체 2 g을 잘게 절단하여 80% acetone용액에 침지하였다. 4°C 암조건에서 48시간 추출하고 chlorophyll a, b의 함량은 분광광도계(MQX 200R, Biotek, America)를 이용하여 흡광도 663 nm, 645 nm에서 측정하였다(Lichtenthaler, 1987).

2.6. 무균배양묘의 토양순화

기내배양묘의 토양순화를 위하여 기내에서 성장한 유식물체 중 초장이 1~2 cm, 근장 0.5~1 cm 내외로 유식물체를 선발하였다. 기외로 꺼내어 증류수로 뿌리에 묻은 배지를 깨끗이 세척한 후 사용하였다. 토양은 peat moss와 perlite를 1:1(v:v)로 배합한 혼합 배양토, vermiculite와 perlite를 1:1(v:v)로 배합한 혼합 배양토, perlite 단용 배양토로 조성하였다. 각 처리구당 20개체를 이식하였으며, 주 1회 관수하였다. 토양순화를 시작한지 12주 후 줄기와 뿌리의 길이, 토양활착률 및 생존율을 조사하였다. 유리온실 내 생육환경은 온도 $25 \pm 5^\circ\text{C}$, 차광 60%, 습도 50~60%로 조절하였다.

III. 결과 및 고찰

3.1. 잎절편으로 부터의 식물체 재분화

주걱비름 잎절편으로부터 식물체 재분화를 위해 성장조절물질 BA와 NAA의 혼합배지를 제조하여 실험한 결과, 배양 2주 후부터 잎절편이 비대하기 시작하였고, 배양 3주 후부터 잎절편에서 캘러스가 형성되기 시작하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6D). 대조구로 사용된 성장조절물질을 무첨가한 배지에서는 아무런 반응도 일어나지 않고 시간이 경과함에 따라 모두 고사하였다(Fig. 6A). NAA 단독 첨가 배지에서는 성장조절물질에 반응을 보였으나, 캘러스는 형성되지 않고 뿌리만 형성되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6B). 이런 현상은 둥근잎쑥의비름 (*S. rotundifolium*)을 옥신류 단독처리 시 캘러스의 분화 없이 뿌리가 발생한 결과와 같다(Kwon and Yoon, 2010). 그리고 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA를 단독 처리한 처리구에서는 캘러스뿐만 아니라 뿌리도 형성되지 않고 고사하였다(Fig. 1E). BA 단독 첨가 배지는 캘러스가 형성되기는 하였으나, 형성되더라도 잎절편의 한 쪽 부분에서만 형성되었다(Fig. 6C). 캘러스에서 재분화된 신초의 수와 무게도 BA와 NAA를 혼합첨가한 배지와 큰 차이가 나타났으며(Table 4), $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA 단독처리구를 제외하고는 나머지 BA 단독처리구들의 신초 성장상태는 불량하였다(Fig. 2A, 3A, 4A, 5A). 반면, BA와 NAA를 혼합 첨가하여 캘러스를 유도한 결과, $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA와 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA를 혼합 처리한 처리구가 가장 높은 캘러스 형성율을 보였고, 캘러스의 무게도 가장 무거웠다(Table 3). 그리고 신초의 형성수도 가장 많았으며, 진한 녹색을 띠며 건실히 성장하였다(Table 4 and Fig. 3B). 주걱비름의 잎절편에서 캘러스를 유도하였을 때 성장조절물질 BA, NAA를 단독으로 처리한 경우는 혼합처리구보다 캘러스 형성율 및 신초의 수, 신초의 성장상태가 현저히 낮은 결과를 보였다. BA와 NAA를 혼합하여 처리한 경우 성장조절물질을 각각 $1.0\sim 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 농도로 혼합하여 처리하였을 때 다른 혼합처리구들보다 캘러스 형성율 및 신초의 수, 신초의 성장상태 모두 우수하게 나타났다(Table 3 and 4).

주걱비름과 같은 *Sedum*속인 둥근잎평의비름은 $1.0\sim 2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA와 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA를 혼합하여 처리하였을 때 캘러스의 형성율이 가장 높았다고 보고하였다(Kwon and Yoon, 2010). 이는 주걱비름과 유사한 경향이다. 그러나 같은 *Sedum*속의 돌나물의 경우는 BA와 NAA를 혼합처리 하였을 때 캘러스 형성율 낮게 나타나 주걱비름의 결과와 상이한 차이를 보였다(Ahn and Lee, 2004). 이와 같이 배지에 첨가하는 생장조절물질의 종류와 농도에 따라 캘러스 형성 양상이 다르고(Ryu et al., 1992), 캘러스 형성 및 성장에는 세포의 성장과 분열을 촉진하는 옥신류의 첨가가 필수적이며, 사이토키닌을 함께 첨가하였을 때 상승적 촉진작용을 한다(Skoog et al., 1965). 또한 BA와 NAA의 농도가 높아질수록 캘러스 형성율과 캘러스의 무게, 신초의 수 및 성장상태가 농도에 반비례하여 낮아지는 경향을 보였다(Table 3 and 4). 이는 생장조절물질을 고농도로 처리할 경우 식물체의 재분화를 억제한다는 연구 보고와 일치하였다(Moon et al., 1999; Moon et al., 2002). 따라서 같은 과, 속에 속해있는 식물이더라도 각각 배양에 적합한 생장조절물질의 종류와 농도 및 조합비율이 다른 많은 연구결과에서 검증되고 있으며, 같은 식물종이라 할지라도 배양 대상조직이나 연령에 따라서도 차이를 가지기 때문에 정확한 생장조절물질의 농도를 제시할 수는 없지만 몇 종의 생장조절물질 조합을 제시할 수 있었다.

Table 3. Effects of BA and NAA on callus induction from leaf explants of *S. tosaense* in MS medium supplemented with 30 g·L⁻¹ sucrose and 7.0 g·L⁻¹ agar after 5 weeks of culture.

Treatment		Induction of callus (%)	Callus weight (mg)	
BA (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)			
0.0	0.0	0	— ^{z)}	
		1.0	—	
		2.0	—	
		5.0	—	
		10.0	—	
1.0	0.0	50	2.0 gh ^{y)}	
		1.0	2.5 b	
		2.0	2.4 c	
		5.0	2.3 d	
		10.0	2.0 g	
2.0	0.0	10	1.2 jk	
		1.0	2.7 a	
		2.0	95	2.5 b
		5.0	85	2.4 c
		10.0	60	2.1 ef
5.0	0.0	5	1.0 k	
		1.0	80	2.2 de
		2.0	75	2.2 de
		5.0	70	2.1 e
		10.0	55	2.1 ef
10.0	0.0	5	0.9 l	
		1.0	15	1.2 ij
		2.0	50	1.9 h
		5.0	35	1.9 h
		10.0	30	1.2 i

^{z)}—=not detected

^{y)}Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P < 0.05.

Table 4. Effect of BA and NAA on shoot induction from leaf explant of *S. tosaense* in MS medium supplemented with 30 g·L⁻¹ sucrose and 7.0 g·L⁻¹ agar after 16 weeks of culture.

Treatment		Number of shoots	Weight of shoots (mg)	Compactness of shoots
BA (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)			
0.0	0.0	- ^{z)}	-	-
	1.0	-	-	-
	2.0	-	-	-
	5.0	-	-	-
	10.0	-	-	-
1.0	0.0	10 j ^{y)}	75 f	+ ^{x)}
	1.0	26 c	786 c	+++
	2.0	22 de	698 d	+++
	5.0	21 de	68 g	++
	10.0	11 i	10 m	+
2.0	0.0	4 mn	4 p	+
	1.0	36 a	824 a	+++
	2.0	31 b	801 b	+++
	5.0	21 de	118 e	++
	10.0	15 fg	18 k	++
5.0	0.0	3 o	3 q	+
	1.0	17 f	37 h	++
	2.0	15 fg	34 i	++
	5.0	15 fg	26 j	++
	10.0	12 h	13 l	+
10.0	0.0	1 p	3 q	+
	1.0	3 mn	3 q	+
	2.0	8 k	5 n	+
	5.0	6 l	4 no	+
	10.0	4 m	2 r	+

^{z)}-=not detected.

^{y)}Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P < 0.05.

^{x)}+ =poor, ++ =moderate, +++ =good.

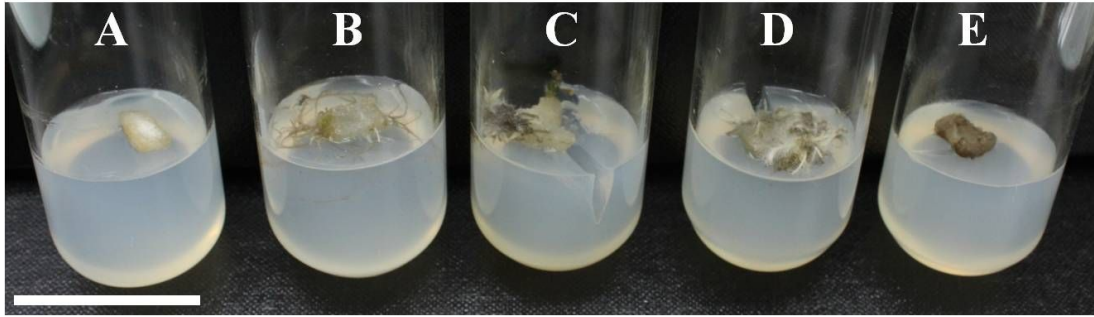


Fig. 1. Plant regeneration from leaf explant of *S. tosaense*. A, control; B, medium containing $0.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; C, medium containing $0.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; D, medium containing $0.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; E, medium containing $0.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA. Scale bar, 2cm.

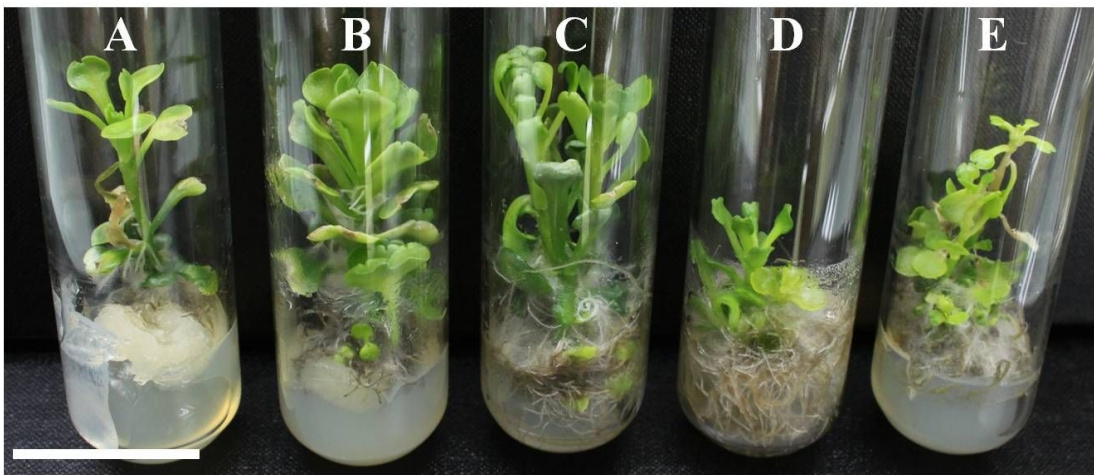


Fig. 2. Plant regeneration from leaf explant of *S. tosaense*. A, medium containing $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $0.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; B; medium containing $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; C, medium containing $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; D, medium containing $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; E, medium containing $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA. Scale bar, 2cm.

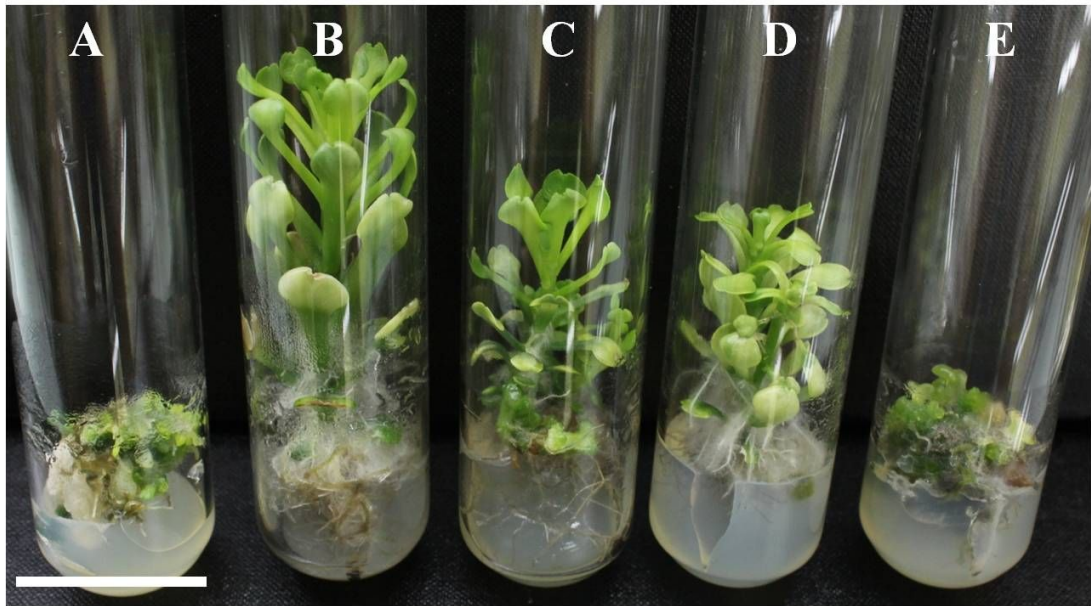


Fig. 3. Plant regeneration from leaf explant of *S. tosaense*. A, medium containing $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $0.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; B, medium containing $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; C, medium containing $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; D, medium containing $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; E, medium containing $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA. Scale bar, 2cm.

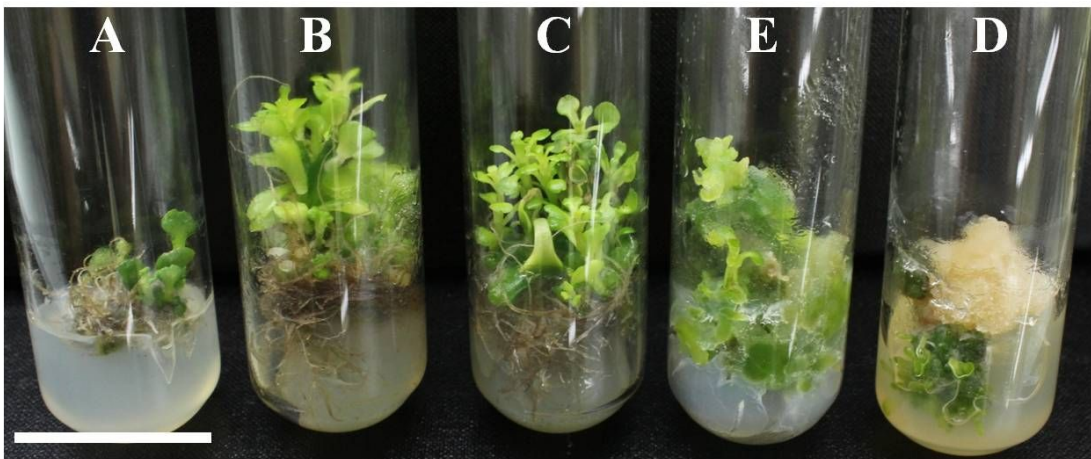


Fig. 4. Plant regeneration from leaf explant of *S. tosaense*. A, medium containing $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $0.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; B, medium containing 5.0

mg·L⁻¹ BA and 1.0 mg·L⁻¹ NAA; C, medium containing 0.0 mg·L⁻¹ BA and 5.0 mg·L⁻¹ NAA; D, medium containing 5.0 mg·L⁻¹ BA and 5.0 mg·L⁻¹ NAA; E, medium containing 5.0 mg·L⁻¹ BA and 10.0 mg·L⁻¹ NAA. Scale bar, 2cm.

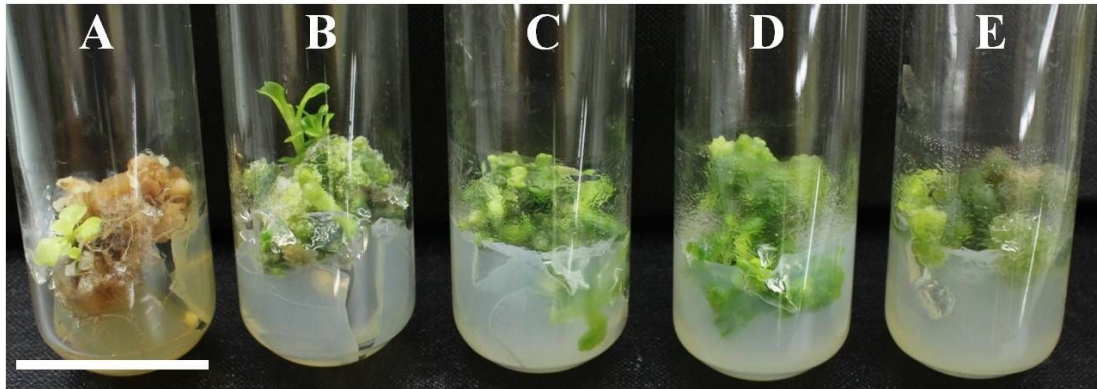


Fig. 5. Plant regeneration from leaf explant of *S. tosaense*. A, medium containing 10.0 mg·L⁻¹ BA and 0.0 mg·L⁻¹ NAA; B, medium containing 10.0 mg·L⁻¹ BA and 1.0 mg·L⁻¹ NAA; C, medium containing 10.0 mg·L⁻¹ BA and 2.0 mg·L⁻¹ NAA; D, medium containing 10.0 mg·L⁻¹ BA and 5.0 mg·L⁻¹ NAA; E, medium containing 10.0 mg·L⁻¹ BA and 10.0 mg·L⁻¹ NAA. Scale bar, 2cm.

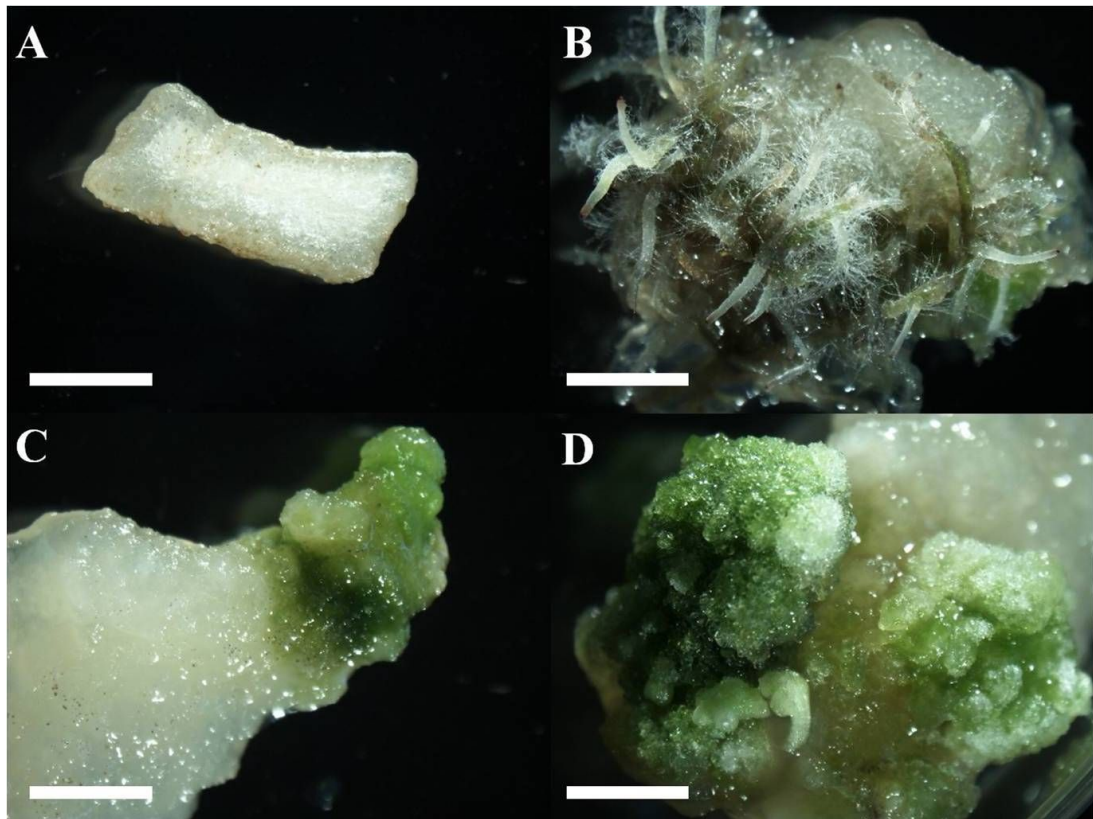


Fig. 6. Callus induction from leaf explants of *S. tosaense* after 4 weeks of culture. A, control; B, medium containing $0.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; C, medium containing $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA and $0.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA; D, induced callus were cultured on the medium containing $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA. Scale bar, A, 50mm; B; C; D, 2mm.

3.2 대량증식

주걱비름의 대량증식을 위해 Table 2와 같은 생장조절물질을 처리하여 배양 9주 후 확인한 결과, 분화한 신초수와 신초무게는 7.9개, 66.9 mg으로 2.0 mg·L⁻¹ BA와 1.0 mg·L⁻¹ NAA를 혼합한 처리구가 가장 높았으며, 1.0 mg·L⁻¹ BA와 2.0 mg·L⁻¹ NAA를 혼합한 처리구가 신초수 1.3개, 신초무게 10.0 mg으로 가장 낮았다. 분화한 신초의 영양상태 역시 2.0 mg·L⁻¹ BA와 1.0 mg·L⁻¹ NAA를 혼합한 처리구가 가장 좋았으며, 1.0 mg·L⁻¹ BA와 2.0 mg·L⁻¹ NAA를 혼합한 처리구가 가장 저조했다(Table 5 and Fig. 7). 이러한 결과는 앞선 식물체 재분화 연구와 같은 결과이다. 식물체 재분화 연구에서도 효과가 좋았던 상위 4가지 생장조절물질 조합 중 2.0 mg·L⁻¹ BA와 1.0 mg·L⁻¹ NAA를 혼합한 처리구가 캘러스유도율 및 재분화된 신초의 생장이 가장 좋았으며, 1.0 mg·L⁻¹ BA와 2.0 mg·L⁻¹ NAA를 혼합한 처리구가 가장 저조한 했던 결과를 확인한 바 있다(Table 3 and 4). 그러나 재분화된 신초의 수에서는 캘러스에서 재분화된 신초의 수와 차이를 보는데, Ryu et al. (1992)은 식물조직배양 시 배양에 이용되는 조직의 종류에 따라 분화 양상이 다르다고 보고하였다.

Table 5. Effect of BA and NAA on shoot multiplication from axillary bud culture of *S. tosaense* on MS medium supplemented with 30 g·L⁻¹ sucrose and 7.0 g·L⁻¹ agar after 9 weeks of culture.

Treatment		No. of shoot	Weight of shoot (mg)	Compactness of shoot
BA (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)			
1.0	1.0	2.0 c ²⁾	22.8 c	++ ^{y)}
	2.0	1.3 d	10.0 d	+
2.0	1.0	7.9 a	66.9 a	+++
	2.0	4.3 b	33.9 b	++

²⁾Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P < 0.05.

^{y)}+ =poor, ++ =moderate, +++ =good.

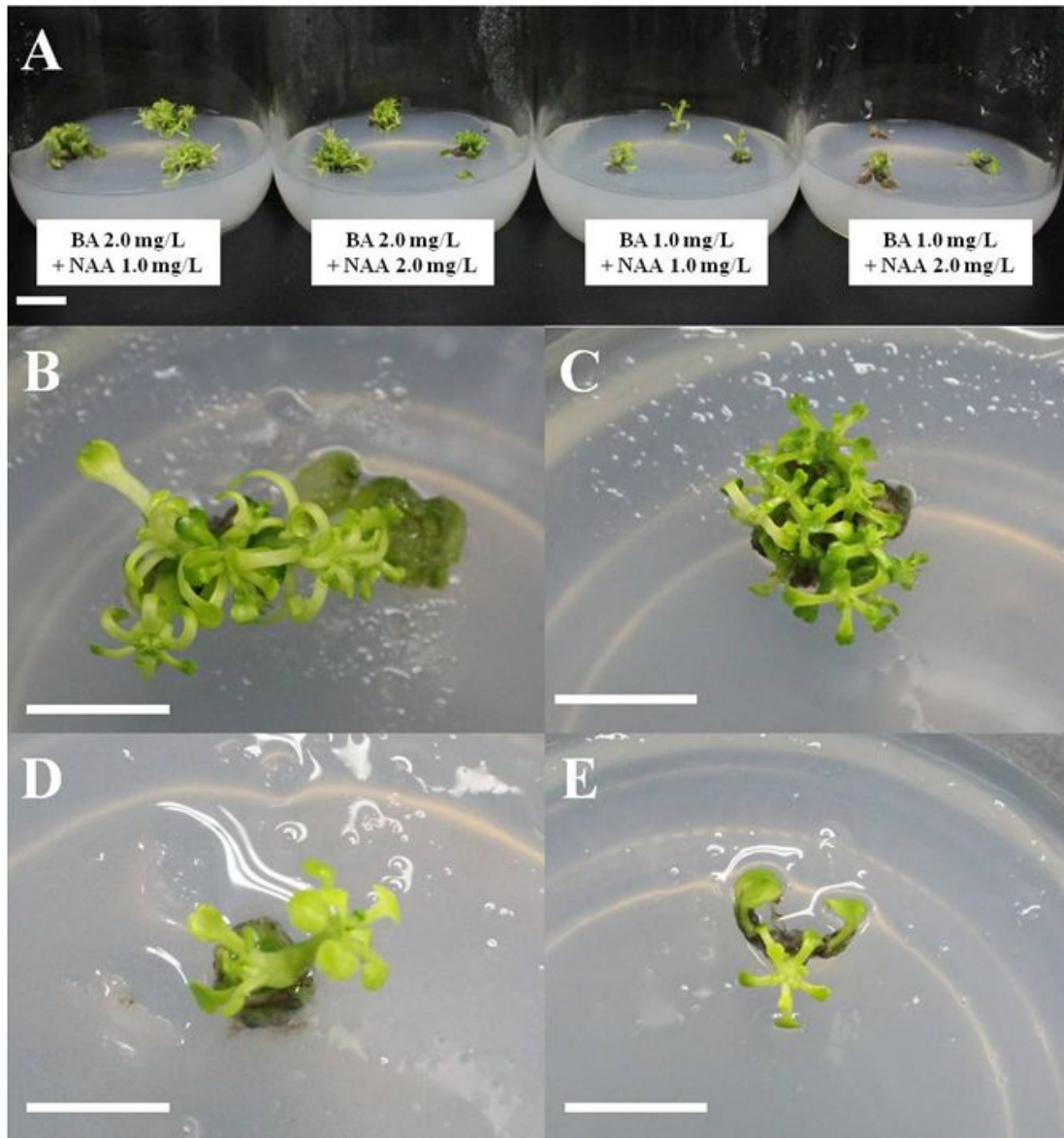


Fig. 7. Shoot conversion from axillary bud culture of *S. tosaense*. A, plant regeneration according to hormone combination; B, MS medium with 2.0 mg·L⁻¹ BA and 1.0 mg·L⁻¹ NAA; C, MS medium with 2.0 mg·L⁻¹ BA and 2.0 mg·L⁻¹ NAA; D, MS medium with 1.0 mg·L⁻¹ BA and 1.0 mg·L⁻¹ NAA; E, MS medium with 1.0 mg·L⁻¹ BA and 2.0 mg·L⁻¹ NAA. Scale bar, 2cm.

3.3. 기내발근유도

주걱비름의 기내발근을 위해 activated charcoal 무첨가MS배지와 2 g·L⁻¹ activated charcoal를 첨가한 MS배지에 배양하여 9주 후 발근된 뿌리의 수와 뿌리의 길이를 관찰한 결과, activated charcoal를 함유하지 않은 MS배지는 뿌리 수 37.7개, 뿌리길이 2.5 cm였으며, 2 g·L⁻¹ activated charcoal를 함유한 MS배지는 뿌리 수 85.7개, 뿌리길이 4.6cm였다(Table 6). Activated charcoal을 함유하는 배지에서 발근된 뿌리의 수, 뿌리의 길이 모두 우수한 결과를 나타낸 것으로 보아 기내발근 시 activated charcoal 첨가가 기내발근을 촉진시키는 것으로 사료된다. Lee et al. (2011)은 activated charcoal를 첨가함으로써 기내에서 솔나리의 뿌리 발달이 무첨가한 경우보다 더 우수하였다는 보고가 있으며, Yoon et al. (2010)의 연구에서도 activated charcoal 첨가가 기내발근에 효과가 있다고 보고하고 있다. activated charcoal의 첨가는 에틸렌을 흡착하여 식물체를 이식할 때 생긴 상처의 치유를 촉진시켜준다(Karasawa, 1966). 또한 고온·고압멸균 시 배지의 pH가 낮아지는 것을 방지하여 세포의 성장과 발달에 영향을 주어 뿌리 유도를 촉진한다(Eymar et al., 2000; Pan and Vanstaden, 1998; Dumas and Monteouis, 1995).

Table 6. Effect of activated charcoal containing on root induction from plantlet of *S. tosaense* on MS medium supplemented with 30 g·L⁻¹ sucrose and 7.0 g·L⁻¹ agar after 9 weeks of culture.

Treatment	No. of roots	length of roots (cm)
Activated charcoal (g·L ⁻¹)		
0	37.7 b ^{z)}	2.5 b
2	85.7 a	4.6 a

^{z)}Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at P < 0.05.

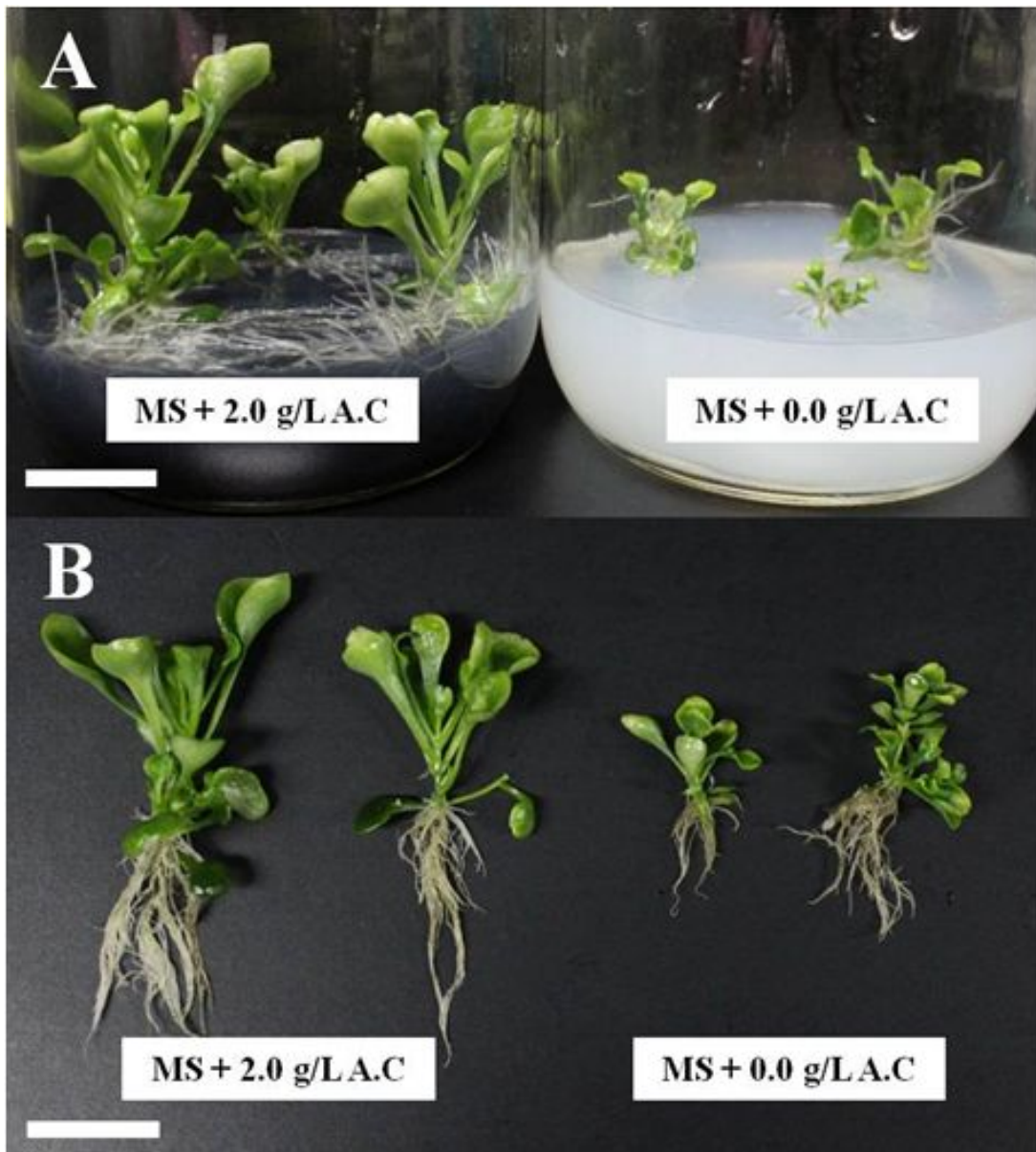


Fig. 8. *In vitro* rooting of *S. tosaense*. A, MS medium with or without activated charcoal; B, plant growth on MS medium with or without activated charcoal after 9 weeks of culture. Scale bar, 3cm.

3.4. 광독립배양에 의한 순화전처리

광독립배양에 의한 순화전처리 시 이산화탄소가 미치는 영향을 알아보기 위해 이산화탄소농도를 1200 ppm과 350 ppm으로 다르게 하였다. 8주간 배양 후 주걱비름의 잎수, 잎폭, 잎두께, 줄기길이, 뿌리길이, 생중량, 엽록소 함량을 측정하였다. 잎수와 잎폭, 잎두께는 이산화탄소 농도 1200 ppm에서 배양한 식물체가 잎수 18.92개, 잎폭 2.94 cm, 잎두께 0.97 cm로 350 ppm에서 배양한 식물체보다 우수하였다. 줄기와 뿌리의 길이도 7.09 cm, 7.99 cm로 1200 ppm에서 배양한 식물체가 생장이 우수하였다. 생중량에서는 1200 ppm에서 배양한 식물체의 무게가 2.76 g으로 350 ppm에서 배양한 식물체의 무게 0.74 g와 뚜렷한 차이를 보였다(Table 7 and Fig. 9). 광독립배양 시 이산화탄소가 미치는 영향을 생리적 성장지표라 할 수 있는 엽록소 함량을 측정한 결과, 이산화탄소 농도 1200 ppm에서 배양한 식물체가 1.46 mg/g로 350 ppm에서 배양한 식물체보다 엽록소 함량이 높은 것으로 나타났다(Table 8). 음나무(*Kalopanax septemlobus*) 광독립배양에서도 이산화탄소를 공급해줄 경우가 생장이 우수하다는 연구결과가 보고되었으며(Park et al., 2011), 카네이션(*Dianthus caryophyllus*)과 스타티스(*Limonum* spp.) 광독립배양 시 이산화탄소 농도가 높을수록 식물체의 생장이 좋았으며, 1000 ppm에서 배양된 식물체가 엽록소 함량이 가장 높은 것으로 보고된 바가 있다(Jeong et al., 1996). 광독립배양이 거베라(*Gerbera jamesonii*) 생육에 미치는 영향에 대한 연구에서는 이산화탄소 1000 ppm 처리구가 다른 처리구들에 비해 엽수, 엽장, 근장, 생체중, 엽록소 함량 등이 우수하다고 보고하고 있다(Shon et al., 1997). 이는 광독립배양 시 고농도의 이산화탄소 공급이 식물체가 스스로 광합성을 더욱 원활하게 할 수 있도록 하여 성장을 촉진시키는 것으로 사료된다.

Table 7. Effect of carbon dioxide concentrations on photoautotrophic culture from plantlets of *S. tosaense* after 8 weeks of culture.

CO ₂ (ppm)	No. of leaf	Leaf width (cm)	Leaf thickness (mm)	Length of shoot (cm)	Length of root (cm)	Plant weight (g)
350	14.92 b ²⁾	1.21 b	0.83 b	3.57 b	4.85 b	0.74 b
1200	18.92 a	2.94 a	0.97 a	7.09 a	7.99 a	2.76 a

²⁾Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at $P < 0.05$.

Table 8. Effect of carbon dioxide concentrations on chlorophyll contents in *S. tosaense*.

Concentration		Chlorophyll contents (mg/g)		
CO ₂ (ppm)	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll	
350	0.91 b ²⁾	0.38 b	1.30 b	
1200	1.04 a	0.42 a	1.46 a	

²⁾Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at $P < 0.05$.

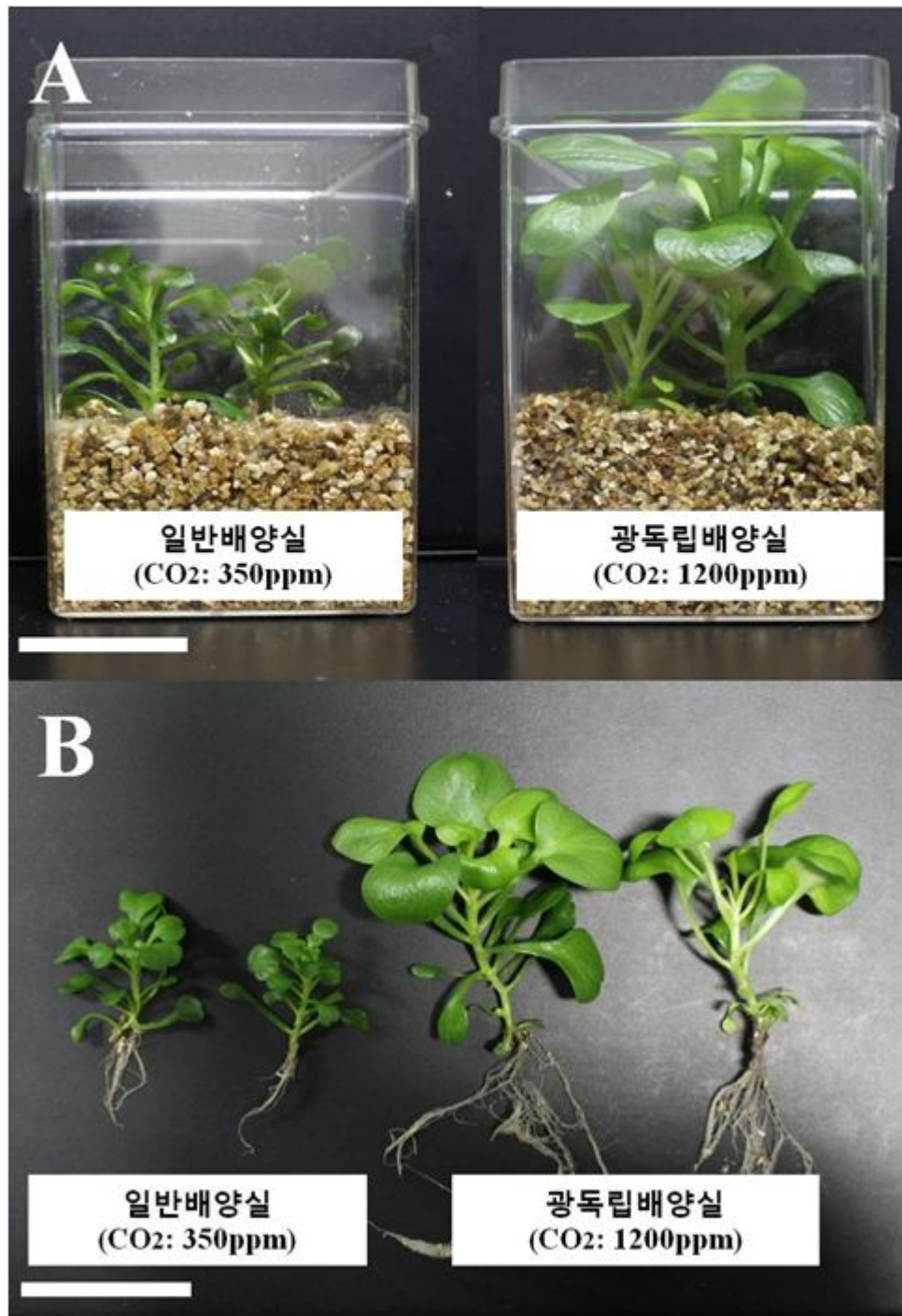


Fig. 9. Growth of plantlets of *S. tosaense* to hardening process after 8 weeks of culture. A; B, According to concentration of carbon dioxide the growth of plantlets. Scale bar, 3cm.

3.5. 무균배양묘의 토양순화

기내에서 성장한 주걱비름의 토양순화 시 적정 토양의 종류를 알아보고자 실행하였다. peat moss와 perlite를 1:1 (v:v)로 혼합한 배양토 및 vermiculite와 perlite를 1:1 (v:v)로 혼합한 배양토, perlite 단용 배양토에 20개체씩 유묘를 이식하고 12주 후 생존율과 줄기의 길이, 뿌리의 길이, 생중량을 측정하였다. 토양순화 결과 peat moss와 perlite 혼합 배양토에서는 생존율이 100%로 이식한 모든 유묘가 토양에 적응하였으며, vermiculite와 perlite 혼합배양토에서는 85%로 비교적 높은 생존율을 보였다. 그러나 perlite 단용 배양토는 생존율이 65%로 다른 배양토에 비해 낮은 생존율을 보였는데(Table 9), 이는 다른 혼합배양토보다 perlite 단용 배양토가 배수가 잘되어 식물체가 필요한 수분을 충분히 저장할 수 없기 때문인 것으로 사료된다. 난과의 솔나리 토양순화의 경우도 perlite 단용 배양토의 생존율이 51.9%로 80%이상의 다른 배양토들보다 순화율이 가장 낮았다는 연구보고가 있다(Kim et al., 2001). 줄기와 뿌리의 길이, 생중량도 생존율 결과와 같이 peat moss와 perlite 혼합 배양토가 가장 높은 결과로 나타나 이식 후 유묘의 성장도 가장 좋았으며(Table 9 and Fig. 10C), 배양 10주 후부터 새로운 신초가 발생됨을 관찰하였다(Fig. 10D). 반면 perlite 단용 배양토의 경우 순화 후 고사하지 않고 생존하더라도 줄기 및 뿌리의 길이, 생중량이 가장 저조하였는데(Table 9), 이 역시 관수를 하더라도 배수가 잘되어 기내에서 기외로 이식한 유묘가 환경에 적응하여 성장하는데 다른 배양토보다 오랜 시간이 필요한 것으로 사료된다. 같은 돌나물과의 홍경천의 경우 peat moss와 perlite 혼합 배양토와 perlite 단용 배양토 간의 이식 후 유묘의 생장이 큰 차이가 없었다고 보고하였다(Bae et al., 2012). 이는 주걱비름과 반대되는 결과로 같은과의 식물이더라도 종에 따라 순화 조건이 다를 수 있다는 것을 보여주는 것이다.

Table 9. Effect several soil of the growth and survival of plantlets of *S. tosaense* to soil pot after 12 weeks of culture.

Ridging construct	Survival rate (%)	Length of shoot (cm)	Length of root (cm)	Plant weight (g)
Peat moss + Perlite (1:1)	100	5.80 a ²⁾	11.57 a	3.87 a
Vermiculite + Perlite (1:1)	85	4.15 b	6.52 b	1.96 b
Perlite	65	2.36 c	1.13 c	0.38 c

²⁾Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at $P < 0.05$.



Fig. 10. The growth of plantlets of *S. tosaense* to soil pot after 12 weeks of culture. A, acclimatized plantlets in soil after 12 weeks of transplanting; B, *S. tosaense* steadily grown in mixtures of peat moss and perlite; C, new sprouts after transplantation. Scale bar, A; B, 3cm; C, 0.5cm.

IV. 적 요

본 연구의 목적은 세계적 희귀 및 멸종위기식물인 주걱비름(*Sedum tosaense* Makino)의 잎절편으로부터 식물체 재분화 조건을 확립하고자 하였다. 성장조절제인 BA와 NAA를 조합한 MS배지에 주걱비름 기내발아 식물체의 잎절편을 배양하였다. $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA와 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA를 혼합하여 처리한 배지가 캘러스 형성율이 100%로 가장 높았으며, 캘러스의 무게도 가장 무거웠다. 또한, 캘러스에서 분화된 신초의 수, 신초의 무게, 배양상태의 견고도에서도 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA와 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA를 혼합하여 처리한 배지가 가장 우수하였다. 주걱비름의 대량 증식을 위해 BA와 NAA를 혼합조합한 MS배지에 액아를 포함하는 마디를 배양하였다. 그 결과, $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA와 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA 혼합한 배지가 신초의 수 7.9개, 신초무게 66.9 mg으로 신초분화에 가장 효과적이었다. 기내발근을 위해 MS배지에 activated charcoal 무첨가배지와 $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ activated charcoal 첨가배지에 배양하였다. 그 결과, 뿌리의 수 85.7개, 뿌리의 길이 4.6cm로 $2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ activated charcoal을 첨가한 배지가 더 효과적이었다. 광독립배양에 의한 순화 전처리 시 이산화탄소의 영향을 알아보기 위해 1200ppm과 350ppm으로 공급하였다. 그 결과, 1200 ppm CO₂를 공급해준 처리구가 잎수, 잎폭, 잎두께, 줄기의 길이, 뿌리의 길이, 식물체무게와 엽록소함량이 350ppm보다 모두 높게 나타났다. 기내에서 재분화된 유식물체의 토양순화는 peat moss와 perlite 혼합배양토에서 생존율이 100%로 가장 높았으며, 가장 양호한 성장을 보였다.

V. 참고문헌

Ahn, J.H. and S.Y. Lee. 2004. Effects of growth regulators on callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Sedum sarmentosum*. J. Plant Biotechnol. 31:25-29.

Anonymus. 2000. Threatened wildlife of Japan -Red data book (2nd ed.)-. Japan Wildlife research center, environment agency of Japan, Tokyo.

Bae, K.H., M.S. Ko, N.Y. Kim, J.M. Song, and G.P. Song. 2012. *In vitro* propagation and multiple shoot induction of *Rhodiola rosea* L. by axillary bud culture. J. Plant Biotechnol. 39:114-120.

Bae, S.J. 2005. Anticarcinogenic and antioxidant effects of *Rhodiola sachalinensis*. Kor. Food Sci. Nutr. 34:1302-1307.

Choi, H.K., J.S. Son, G.H. Na, S.S. Hong, Y.S. Park, and J.Y. Song. 2002. Mass production of paclitaxel by plant cell culture. Kor. J. Plant Biotech. 29:59-62.

Choi, Y.C., S.Y. Ahn, S.G. Lee, J.S. Han, E.C. Kim, H.B. Lee, J.H. Shin, E.K. Kim, and K.H. Row. 2004. Separation and performance test of whitening agent in *Rhodiola sachalinensis*. Kor. J. Biotechnol. Bioeng. 19:169-173.

Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press, New York.

Dumas, E., and O. Monteuis. 1995. *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants influence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue and Org. Cult.* 40:231-235.

Eymar, E., J. Alegre, M. Toribio, and D. Lopez-vela. 2000. Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63:57-65.

He, A.M., M.S. Wang, H.Y. Hao, D.C. Zang, and K.H. Lee. 1998. Hepatoprotective triterpenes from *Sedum sarmentosum*. *Phytochemistry* 49:2607-2610.

Jeong, B.R., E.J. Lee, and H.K. Chin. 1996. Photoautotrophic growth of *Dianthus caryophyllus* and *Limonium* spp. *in vitro* as affected by CO₂ concentration and air exchange rate. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 14:414-415. (Abstr.)

Kang, T.H., H.o. Pae, J.C. Yoo, N.Y. Kim, Y.C. Kim, G.I. Ko, and H.T. Chung. 2000. Antiproliferative effects of alkaloids effects from *Sedum sarmentosum* on murine and human hepatoma cell line. *J. Ethnopharmacol.* 70:177-182.

Karasawa, K. 1966. On the media with banana and honey added for seed germination and subsequent growth of orchid. *The Orchid Review.* 32:313-318.

Kim, C.Y., M.Y. Lee, and I.S. Park. 2006. Antioxidant activities of fractions from *Sedum sarmentosum*. *J. Food Sci. Nutr.* 11:6-9.

Kim, H.K., J.D. Lim, T.K. Hyun, H.Y. Lee, J.H. Lee, and C.Y. Yu. 2001. *In*

in vitro culture and acclimatization of regenerated plants of *Lilium cernuum* Komarow. Kor. J. Medicinal Crop Sci. 9:310-317.

Kim, M.Y. 2003. The effects of *Sedum sarmentosum* Bunge on collagen content of connective tissues in ovariectomized rats. Kor. Food Sci. Nutr. 32:1114-1119.

Kim, O.T., M.Y. Kim, Y.J. Park, M.H. Hong, J.C. Ahn, M.H. Oh, and B. Hwang. 2002. Production of triterpene glycosides from whole plant cultures of *Celltella asiatica* (L.) Urban. Kor. J. Plant Biotech. 29:282-285.

Koroch, A., H.R. Juliani, J. Kapteyn, and J.E. Simon. 2002. *In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* from leaf explants. Plant Cell, Tissue and Org. Cult. 69:79-83.

Kwon, H.K. and E.S. Yoon. 2010. Effect of plant growth regulators on plant regeneration from the *Sedum rotundifolium* D. Lee. J. Plant Biotechnol. 37:84-88.

Kwon, S.T. and J.H. Jeong. 1999. Genetic relationship among *Sedum* species based on morphological characteristics and RAPD analysis. Kor. J. Hort. Technol. 17:490-494.

Kozai, T. 1991. Photoautotrophic micropropagation. *in vitro* cellular and developmental. Biology-Plant. 27:47-51.

Lawrence G.H.M. 1963. Taxonomic of vascular plants. The Macmillan Company. New York.

Lee, K.B., Y.G. Yoo, and K.R. Park. 2003. Morphological relationships of

Korean species of *Sedum* L. subgenus *Aizoon* (Crassulaceae). Kor. J. Plant Taxon. 33:1-15.

Lawrence G.H.M. 1963. Taxonomy of vascular plants. Macmillan Company, New York.

Lee, S.H., S.G. Lee, and H.D. Kang. 2011. Conservation of an endangered species of *Lilium cernuum* Komarvo. through *in vitro* mass-propagation. Kor. J. Medicina Crop Sci. 19:9-15.

Lee, Y.M., H.B. Bae, H.Y. Jung, J.H. Kim, and D.S. Park. 2011. Antioxidant activity in water and methanol extract from Korean edible wild plants. J. Food. Sci. Nutr. 40:29-36.

Lian, M.L., H.N. Murthy, and K.Y. Paek. 2002. Culture method and photosynthetic photo flux affect photosynthesis, growth and survival of *Limonium* 'Misty Blue' *in vitro*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 95:239-249.

Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Meth. Enzymol. 148:350-382.

Lisowska, K. and H. Wysokinska. 2000. *In vitro* propagation of *Catalpa ovata* G. Don. Plant Cell, Tissue and Org. Cult. 60:171-176.

Moon, H.K., G.Y. Suk, and S.C. Kim. 1997. Micropropagation of a rare species, *Forsythia saxatilis* N. through tissue culture. J. Kor. For. Soc. 86:430-434.

Moon, H.K., E.W. Noh, Y.M. Ha, and K.K. Shim. 2002. Micropropagation of

juvenile and mature tree of *Corylopsis coreana* by axillary bud culture. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 29:117-121.

Moon, H.K., G.Y. Suk, Y.J. Kwon, and S.H. Son. 1999. Micropropagation of a rare species, *Abeliophyllum disticchum* Nakai. via axillary bud culture. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 26:133-136.

Murashige, T. and Skoog. F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-479.

Oh, H., D.G. Kang, J.W. Kwon, T.O. Kwon, S.Y. Lee, D.B. Lee, and H.S. Lee. 2004. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory flavonoids from *Sedum sarmentosum*. Biol. Pharm. Bull. 27:2035-2037.

Park, K.U., J.H. Yoon, J.Y. Kim, C.H. Jeong, C.K. Park, W.S. Song, and K.I. Seo. 2005. Biological activity of the fractions extracted from *Rhodiola dumulosa*. J. Kor. Food Preserv. 12:496-500.

Park, S.Y., H.K. Moon, and Y.W. Kim. 2011. The photoautotrophic culture system promotes photosynthesis and growth of somatic embryo-derived plantlets of *Kalopanax septemlobus*. J. Kor For. Soc. 100:212-217.

Park, Y.J., M.H. Kim, and S.J. Bae. 2002. Enhancement of anticarcinogenic effect by combination of *Sedum sarmentosum* Bunge with *Platycodon grandiflorum* A. extracts. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 31:136-142.

Pan, M.J. and J. Van Staden. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture—a review. Plant Growth Regulator 26:155-163.

Ryu, J.H., H.S. Doo, and T.H. Kwon. 1992. Induction of haploid plants by anther culture in sesame (*Sesamum indicum* L.). Kor. J. Plant Tiss. Cult. 19:171-177.

Seo, M.S., C.H. Bae, D.O. Choi, S.L. Rhim, S.C. Seo, P.S. Song, and H.Y. Lee. 2002. Investigation of transformation efficiency of rice using *agrobacterium tumefaciens* and high transformation of GPAT(glycerol-3-phosphate acyltransferase) gene relative to chilling tolerance. Kor. J. Plant Biotech. 29:85-92.

Shon, Y.G., S.R. Kim, and J.C. Park. 1997. Photoautotrophic growth of *Gerbera jamesonii* *in vitro* as affected by PPF, CO₂ and sucrose concentration. Kor. J. Hort. Sci. 15:640-642.

Sim, K.S., J.H. Kim, B.C. Lee, D.H. Lee, G.S. Lee, and H.B. Pyo. 2008. Inhibitory effects on melanin production in B16 melanoma cells of *Sedum sarmentosum*. Yakhak Hoeji. 52:165-171.

Song, G.P., Song, K.H. Song, H.J. Hyun, C.S. Kim, and M.H. Kim. 2004. An unrecorded species in Korean flora: *Sedum tosaense* Makino (Crassulaceae). Kor. J. Pl. Taxon. 34:365-370.

Skoog, F., F.M. Strong, and C.O. Miller. 1965. Cytokinins. Science 148:532-533.

Woo, E.R., S.H. Yoon, J.H. Kwak, H.J. Kim, and H. Park. 1997. Inhibition of gp 120-CD4 interaction by various plant extracts. Phytomedicine 4:53-58.

Yoon, E.S. 1997. Effect of plant growth regulators on plant regeneration from leaf and stem explant culture of *Sedum erythrostichum* Miq. Kor. J. Plant Biotech. 24:285-289.

Yoon, J.Y., Y.K. Nam, J.S. Lee, and H.J. Kim. 2010. Effects of media and temperatures on micro stem cutting of *Dendrobium nobile* 'Hamana lake dream' X 'No. 55' *in vitro*. Journal of Agriculture & Life Science. 44:23-30.

Ziv, M. 1995. *In vitro* acclimatization. In: J. Aitken-Christie, T. Kozai, M. Lila Smith (eds.), Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, P. 493-516, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Zobayed, S.M.A., F. Afreen, Y. Xiao, and T. Kozai. 2004. Recent advancement in research on photoautotrophic micropropagation using large culture vessels with forced ventilation. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 40:450-458.

VI. 감사의 글

끝날 것 같지 않던 2년여의 석사과정의 이제 마칠 시간이 되었습니다. 돌아보면 힘들기도 한 길이었지만, 나 자신을 한층 더 발전시킬 수 있었던 소중한 시간이었습니다.

항상 많은 조언과 가르침을 주셨던 소인섭 교수님 정말 감사드립니다. 교수님께서 주신 가르침으로 제가 이렇게 성장할 수 있었습니다. 또한 바쁘신 와중에도 꼼꼼히 저의 논문을 수정해 주시고 심사해주셨던 강훈 교수님과 송관정 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 대학원과정 동안 많은 가르침을 주셨던 한상헌 교수님, 조영열 교수님께도 감사의 말씀드립니다.

대학원 생활동안 많은 도움을 줬던 고성욱 선배님, 선희, 성우, 은석이에게 이 글을 빌어 감사의 말을 전합니다.

저에게 식물을 처음 접하게 해주시고 가르쳐 주셨던 송관필 박사님 감사드립니다. 항상 저에게 모든 것을 아낌없이 주시는 나의 멘토 기화 형 미안하고 감사합니다.

제가 연구소에서 일하면서 대학원을 졸업할 수 있도록 배려해주신 정용환 소장님, 박수영 부장님, 김동삼 박사님, 고미희 박사님께 감사합니다. 또한 저에게 많은 조언과 격려를 해주신 원종이 형, 경식이 형, 경후 형, 영순 형님, 대경이 형에게도 감사드립니다. 연구소에서 힘든 일, 즐거운 일을 함께 나누며 힘이 되어준 우철이, 시택이, 영종이, 지현이, 용균이, 소현이, 아람이, 상목이 그리고 다른 곳에 있는 유미와 선아에게도 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

우정이란 이름으로 항상 저의 곁을 지켜준 경록, 호준, 창현, 영준, 형훈, 행범, 병우, 미정, 혁기, 성원, 현우, 윤혁, 경진, 동한이, 진송이 고맙다. 그리고 오래된 나의 친구들 성훈, 형남, 태건이에게도 고마운 마음을 전합니다. 친형 같이 나를 따라주는 내 동생 강현민 군에게도 고맙다고 말하고 싶습니다. 많은 것을 해주지 못해 미안하지만 언제나 내 곁에서 응원해주고 안식이 되어준 수경에게 감사한 마음을 전합니다.

생각만으로도 든든한 우리 형과 형수님, 그리고 저의 후원인이 되어주는 착한

우리 누나와 매형 감사합니다. 눈에 넣어도 아프지 않은 나의 조카 민선이, 연우, 은혜, 선우 항상 건강하게 올바르게 자라고 사랑한다. 까칠하고 무뚝뚝한 막내아들을 믿고 지켜봐주시는 사랑하는 부모님 항상 미안하고 사랑하는 마음을 전하며, 이 논문을 저의 부모님께 받칩니다.

2011년 12월

저를 아껴주시는 모든 분들께 감사드립니다.

고 명 석 올림