



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

碩士學位論文

무궁화 품종 ‘난파’ 의 효율적인 조직배양체계 확립
Establishment of efficient regeneration system of
Hibiscus syriacus ‘Nanpa’

濟州大學校 大學院

生命工學科

손 지 희

2020年 2月




무궁화 품종 ‘난파’ 의 효율적인 조직배양체계 확립
Establishment of efficient regeneration system of
Hibiscus syriacus ‘Nanpa’

指導教授 李 孝 淵

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2020年 2月

손지희의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長	선 현 진	
委 員	이 훈 연	
委 員	강 홍 규	

濟州大學校 大學院

2020年 2月

목 차

요약	4
표 차례	5
그림 차례	6
약어	7
I. 서론	8
II. 재료 및 방법	11
1. 실험재료 및 소독	11
2. 배지 조건	12
3. 캘러스유도	13
4. 식물체의 재분화	14
III. 결과 및 고찰	18
1. 잎 절편으로부터 캘러스 유도	18
2. 재분화에 영향을 주는 캘러스 조건	19
3. 재분화 과정에서의 형태발생과 체세포 변이관찰	20
IV 종합고찰	30
V. 참고문헌	31

요 약

Hibiscus syriacus L., the national flower of Korea, is a commonly grown ornamental species found in parks, gardens and along roadsides in Korea. This study sought to establish a plant regeneration system of *H. syriacus* 'Nanpa' using mature leaves as an explant. Sterilized mature leaf explants were cultured on modified MS medium with combinations of NAA and BAP at various concentrations for 6 weeks. Among the various media evaluated, modified MS media containing 0.46 mg/L NAA and 0.5 mg/L BAP (CI-1) or 0.92 mg/L NAA and 1 mg/L BAP (CI-4) were the most effective for callus formation. Whitish-yellow calluses were observed on CI-1 medium, while green calluses formed on CI-4 medium. The whitish-yellow callus derived from CI-1 medium showed a higher frequency of shoot induction than the green callus derived from CI-4 on modified MS medium containing 0.5 mg/L BAP. Among the various media evaluated in this study, modified MS medium containing 0.46 mg/L NAA and 0.5 mg/L BAP was the most optimal for shoot-forming callus production. Our findings show that mature leaves of *H. syriacus* 'Nanpa' can be used for in vitro plant regeneration, and the regeneration system described here may be a powerful tool for molecular breeding of *H. syriacus* 'Nanpa' in the future.

표 차례

Table 1. Difference between MS medium and modified MS medium used in this study

Table 2. Composition of the medium used for callus induction (CI), adventitious shoot regeneration (RE) for tissue culture of *H. syriacus* 'Nanpa'

Table 3. Effects of different concentrations of NAA and BAP on callus induction frequency.

Table 4. Effect of callus induction medium supplemented with different concentrations of growth regulators on shoot regeneration efficiencies.

Table 5. Relationship between split of callus derived from CI-2 and Shoot regeneration.

그림 차례

Fig. 1 Plant tissue culture process

Fig. 2 *Hibiscus syriacus* 'Nanpa' grown in Subtropical Horticulture Research Institute in Jeju National University

Fig. 3 Effects of different concentrations of growth regulators on callus induction

Fig. 4 Morphology of callus induced from on different callus induction medium

Fig. 5 Effect of callus induction medium supplemented with different concentrations of growth regulators on shoot regeneration

Fig. 6 Morphology of callus induced from same callus induction medium (CI-4)

Fig. 7 Shoot regeneration of callus derived from *Hibiscus syriacus* 'Nanpa' leaf explants

Fig. 8 Morphological variation in shoots regeneration from mature leaves of *Hibiscus syriacus* 'Nanpa'

약어

BAP	6-Benzylaminopurine
°C	Celsius
CaCl ₂	Calcium chloride
CI	Callus induction
cm	Centi meter
Fe	Iron
Fe-EDTA	Ferric ethylenediaminetetraacetic acid
FeSO ₄ sulfate	Iron(II)
GA ₃	Gibberellin
h	Hour
HCl	Hydrochloric acid
IAA	Indole-3-acetic acid
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
min	Minute
mg	Milligram
MS medium	Murashige & Skoog medium
NAA	1-Naphthaleneacetic acid
NaClO	Sodium hypochlorite
Na ₂ -EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate
pH	Hydrogen ion concentration in units of moles per liter solution
RE	Adventitious shoot regeneration
Tween-20	Polyethylene glycol sorbitan monolaurate
μM	Micromole
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

I. 서론

아욱과에 속하는 무궁화는 낙엽 활엽 관목 식물로 정원, 공원, 도로변 등에 관상용 식물로 이용되고 있다. 무궁화의 어린잎과 꽃은 식용 가능하며(Anaka 1976; Hedrick 1972; Hu 2005; Kunkel 1984) 모든 부위는 약용으로도 사용되고 있다. 무궁화의 전통적 약용식물로서의 효과는 매우 광범위하다. 꽃은 이뇨제, 위 보호제로서 잎은 이뇨제, 거담제로 뿌리껍질은 항염증제, 진통제, 피부연화제, 해열제, 지혈제 뿐 만 아니라 설사, 이질, 복통, 생리통, 무좀 치료제 등으로 널리 이용되고 있다. 이외에도 무궁화 추출물은 유방암 세포의 생존능력 저하기능(Hsu et al. 2015), 폐암세포 증식억제(Cheng et al. 2008), 피부상처 치유(di Martino et al. 2017), 항산화효과, 콜라겐 합성효과(Kim et al. 2018) 등이 있다고 보고되었고 음료 첨가제로도 이용(Hotta et al. 1989)되고 있다. 이와 같이 무궁화는 관상용 이외에 의약품과 화장품의 원료로도 사용되는 경제적 가치가 높은 식물 자원이다.

무궁화는 전 세계적으로 약 200 여 품종이 있고 그 중 국내에서 개발된 품종은 약 70 여 품종이다. 국립산림과학원에서는 국내에서 개발된 품종 중 선덕, 원화, 개량단심, 고주몽, 난과, 칠보, 불새, 칠보아사달 등 8 개 품종을 선정하여 우량 품종으로 보급하고 있다. 무궁화는 종자 또는 영양번식이 가능하지만 타가수정작물이므로 실생묘의 경우에는 양친의 유전적 형질에 따라 유전변이가 발생하게 되어 후대가 모본의 우수한 특성을 그대로 가지지 못하는 경우가 많다. 따라서 무궁화의 번식에는 개체의 균일성을 유지하기 위해 삽목이나 접목을 통한 영양번식법이 주로 이용되고 있다. 그러나 삽목이나 접목을 통한 번식은

증식효율이 낮은 단점이 있다(Lee et al. 1998). 따라서 우량 형질을 가진 부모세대와 유전적으로 동일하면서 무궁화를 효율적으로 증식할 수 있는 조직배양 방법의 개발이 필요하다.

‘난파’는 화색이 붉은 자주색으로서 적색이 강한 꽃으로 국내에서 육성된 품종이다. 국립산림과학원에 따르면 ‘난파’는 심한 추위에도 상해가 없는 무궁화 품종 ‘불새’와 유연관계가 가장 가깝다고 보고되었다(Shim et al. 1999). 무궁화는 내한성이 비교적 약하여 대부분의 품종은 높은 고도에서 월동하지 못한다. 생육지역이 북한계선 남한지역에 국한되므로 국내에서 재배하는 부분에 있어서는 큰 문제점이 없으나, 한반도가 통일되는 시점에 국내 전 지역에 무궁화를 재배하기 위해서는 내한성 품종의 개발 등 대비가 필요하다(Lee et al. 1997; Shim et al. 1999). 기존의 품종 개량 방법 중 내한성 품종의 개발에 가장 적합할 것으로 판단되는 방법은 식물형질전환을 통한 분자육종이며, 분자육종기술을 적용하기 위해서는 사용 품종의 조직배양체계가 확립되어야 한다.

무궁화의 기내 증식을 위한 조직배양 재료로는 신초정단부(Kim et al. 1998; Kumari 2011; Yoo et al. 1996), 주심조직(Kim and Park 2000), 액아(Jeon et al. 2009), 어린 잎(Lee et al. 2011), 원형질체(Zhao et al. 1991), 접합배(Song and Park 1998), 잎자루, 뿌리(Seo et al. 2017) 등이 이용되어 왔으나 비교적 재료의 확보가 용이한 무궁화의 성숙한 잎을 재료로 한 기내 증식 시도는 거의 없는 실정이다. 신초정단부, 원형질체, 접합배 등의 경우에는 재분화 효율이 낮고 재료의 지속적인 확보가 어려운 단점이 있고, 액아나 어린 잎도 재료를 얻을 수 있는 시기가 제한적이다. 또한 잎자루와 뿌리는 실험을 수행하기 위한 양을 확보하는데 어려움이 있다. 온실에서 재배하고 있는 무궁화로부터 성숙한 잎

재료를 확보하는 것은 시기적인 제한이 적고 한번에 많은 양의 절편을 얻을 수 있는 장점이 있다.

식물의 조직배양에서 각 식물조직을 이용한 식물의 재분화 과정으로는 1) 캘러스 형성 단계 없이 잎 조직으로부터 바로 신초가 형성되는 과정과 2) 식물 조직 절편으로부터 캘러스를 형성한 다음 캘러스에서 신초가 유도되는 과정이 있다. 캘러스 형성 과정이 없는 것은 상처 난 잎 절편 부위로부터 직접 신초가 형성되는 것으로 direct organogenesis(Niranjan 2009; Li Q et al. 2013) 또는 direct embryogenesis 를 통해(Kim et al. 2007) 신초가 형성된다. 캘러스 형성 단계가 있는 과정은 식물 조직 절편으로부터 indirect organogenesis 를 통한 organogenic calli 로 탈분화시켜 신초를 유도하는 방법(Hsia et al. 1996; Huang et al. 2014; Deepak et al. 2019) 또는 indirect embryogenesis 를 통한 embryogenic calli(Deepak et al. 2019)를 유도하여 embryo 를 형성하여 완전한 식물체를 얻는 방법이 있다(Fig. 1).

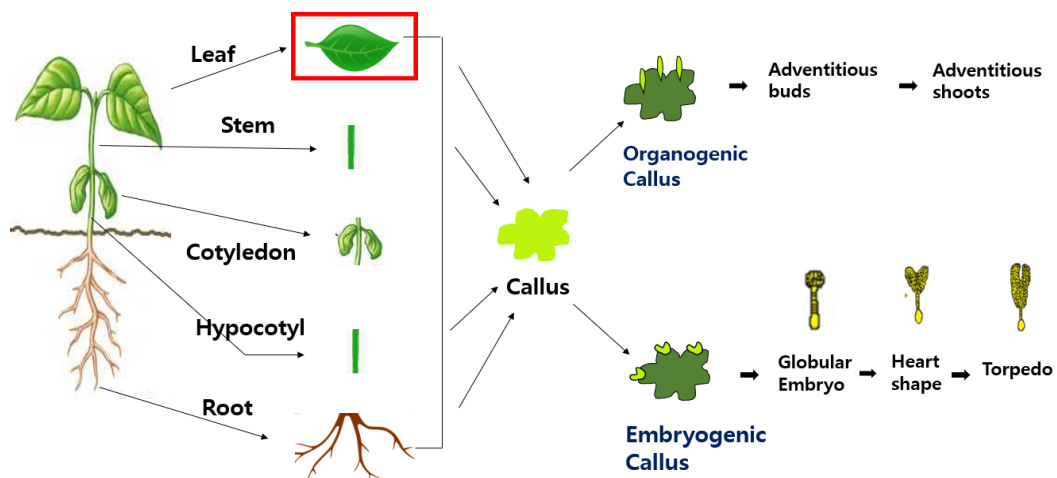


Fig 1. Plant tissue culture process

식물 조직으로부터 organogenic callus 또는 embryogenic callus 를 유도하는 과정은 호르몬에 의존하고(Verma et al. 2010) 식물마다 요구하는 호르몬 조성이 다양하다. 캘러스로부터의 신초 형성이 organogenesis 과정을 통한 것인지 embryogenesis 과정을 통한 것인지는 somatic globular embryo 구조에서 신초분열 조직과 뿌리분열조직이 연결(bipolar structure)되어 있는지 또는 이 2 개 분열조직의 유무로 판단할 수 있다(Kumari et al. 2017).

본 연구에서는 무궁화의 대량증식의 한계점을 극복하기 위하여 제주대학교 아열대원예산업연구소의 온실에서 재배하고 있는 무궁화 우량 품종 ‘난파’의 성숙한 잎을 이용한 효율적인 조직배양 방법을 확립하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물재료

본 실험에서는 제주대학교 아열대원예산업연구소의 온실에서 재배중인 무궁화 품종 ‘난파’의 잎을 식물재료로 사용하였다(Fig. 2). 포장에서 재배한 무궁화를 2017 년 겨울 온실로 옮겨 심은 후 개엽은 2018 년 3 월 초에 시작되었다. 개엽 후 3 개월 이상 성장한 잎을 실험에 사용하였고, 온실에서는 시기에 관계없이 식물재료의 안정적인 확보가 가능하였다. 채취한 잎은 알코올로 소독된 가위를 이용해 잎자루를 포함한 잎을 자른 후 바로 멸균수가 담겨진 50 mL 튜브에 넣었다. 잎 조직의 표면소독 전에 잎 표면에 붙어있는 오염원을 제거하기 위해 멸균수로 3 회 세척하였고, 75% 에탄올에서 1 min 처리한 후 다시 멸균수로 3 회 세척하였다. 처음 무궁화 잎 조직의 표면살균은 차아염소산나트륨 3% 용액을 이용하였으나 잎 표면이 구멍이 생긴 것처럼 보이는 표백 현상이 나타나 차아염소산나트륨의 농도를 1.5% (0.03% Tween 20 첨가)로 낮추어 표면살균을 수행하였다. 표면살균용 용액에서 20 min 간 처리하면서 5 min 간격으로 잘 흔들어 주었고 처리 후에는 멸균수로 3 회 세척하였다. 표면살균한 무궁화의 잎은 클린벤치 안에서 수 분간 건조한 다음 가위로 잘라 절편을 준비하였다. 잘 멸균된 핀셋으로 무궁화의 잎자루 부분을 잡고 우선 잎 한가운데에 있는 관다발을 지나는 주 엽맥(주맥)을 자르고 이어서 양 옆을 균등하게 잘랐다. 조직배양용 절편은 주맥의 직각방향으로 잎 절편의 크기가 0.5 cm x 0.5 cm 가 되도록 준비하였고 최종적으로 잎자루는 잘라서 제거하였다.

2. 배지 조성

무궁화 ‘난파’의 잎으로부터 캘러스 및 신초 재분화를 유도하기 위한 배지로는 MS 배지에서 철, 엽화칼슘 및 비타민의 농도가 변형된 MS 배지(Christensen et al. 2008)를 기본으로 사용하였다. 변형된 MS 배지에는 1161.38 mg/L (7.9 μ M), Fe-EDTA 17.53 mg/L, Nicotic acid 1mg/L, Thiamin-HCl 10 mg/L, Pyridocine 1 mg/L 가 포함되어 있고, 여기에 Sucrose 20 g/L 및 Gelrite 3 g/L 그리고 pH 를 안정화시키기 위한 MES 0.46 g/L 를 첨가하였으며 pH 는 5.7 로 조정하였다. 변형된 MS 배지는 기본 MS 배지보다 엽화칼슘의 농도가 약 3 배 높고 철의 농도는 낮으며 비타민 농도가 높은 특징을 가진다. 특히 티아민은 기본 MS 배지에 비해 100 배 높은 특징을 가지고 있다. 캘러스 유도 및 재분화에 사용된 모든 배지는 변형된 MS 배지를 기본으로 제조하였다(Table 1). 식물의 생장조절제로 사용한 NAA, BAP, IAA 는 1M 의 NaOH 용액에 잘 녹여 1000 ppm 의 Stock solution 을 만든 후 고온고압 멸균하였고, GA₃ 는 높은 온도와 압력에 활성을 잃기 때문에 1 M 의 NaOH 용액에 녹인 후 1000 ppm 용액으로 만든 다음 0.45 μ m 필터를 이용하여 필터 멸균하였다. 이들 식물생장조절제는 높은 염기성을 가진 NaOH 용액에 용해하였기 때문에 배지의 최종 pH 에 영향을 줄 우려가 있어 배지에 호르몬을 첨가한 후 최종 배지의 pH 는 5.7 로 재조정하였다.

3. 캘러스 유도 및 증식

캘러스의 유도에는 변형된 MS 배지에 식물생장조절호르몬 NAA (Naphthalene acetic acid, Duchefa, Haarlem, The Netherlands)와 BAP (6-benzylaminopurine, Duchefa, Haarlem, The Netherlands)를 각각 다른 농도로 조합한 4 종류의 배지를 사용하였다(Table 2). 표면 살균한 잎을 클린벤치 안에서 수 분 간 자연건조 시킨 다음 모든 잎을 크기가 0.5 cm x 0.5 cm 로 잘라 멸균된 필터페이퍼 위에 올려 준비하였다. 잎 절편은 생장조절제 NAA (Naphthalene acetic acid, Duchefa, Haarlem, The Netherlands)와 BAP (6-benzylaminopurine, Duchefa, Haarlem, The Netherlands)를 농도별로 조합한 4 종류의 캘러스 유도배지(Callus induction)가 포함된 페트리디쉬(SPL, Korea)에 치상하였다. 잎 절편을 치상 한 후 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 암조건 하에서 6 주간 배양하여 캘러스를 유도하였다. 배양 중에 식물재료의 오염 여부는 3 일 간격으로 첫 2 주 동안 확인하였다. 암조건 하에서 6 주간 배양한 다음, 각 캘러스 유도배지에서 유도된 캘러스의 유도율, 색깔, 성장정도 및 형태적 특성을 조사하였다. 잎 절편은 한개의 페트리디쉬 당 10 개씩 치상하였고 실험은 3 반복으로 수행하였다. 캘러스의 형태는 OLYMPUS 사의 C-5060 Wide ZOCM 를 이용하여 관찰하였고 작은 크기인 adventitious bud 와 shoot 및 embryo 는 실체현미경으로 관찰하였다.

4. 식물체의 재분화

각 캘러스 유도배지에서 유도된 캘러스를 변형된 MS 배지에 BAP 0.5 mg/L 를 첨가한 재분화배지(Table 2)에 치상하고 3 주간 배양하였다. 이 때 하나의 잎 절편으로부터 형성된 캘러스 덩어리는 여러 조각으로 분할하지 않고 통째로 재분화배지에 옮겨 배양 3 주 후에 싹 형성율을 조사하였고, 캘러스에 싹이 1 개 이상인 것을 조사하였으며 하나의 캘러스에 복수의 싹이 형성된 것도 하나로 간주하였다. 또한 싹 형성 과정, 싹의 변이 여부 등을 관찰하였다. 형성된 싹은 생장을 촉진하기 위해 싹 부분을 캘러스에서 잘라내어 0.5 mg/L 로 첨가한 변형된 MS 배지에 옮겨 배양하였다. 그 후 싹 생육이 우수한 개체들은 변형된 MS 배지에 IAA (Indole amino acetic acid, Duchefa, Haarlem, The Netherlands) 0 mg/L 또는 0.5 mg/L 를 첨가한 배지에 옮겨 발근을 유도하였다. 재분화를 위한 모든 실험은 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 16 시간 광주기에서 수행하였다.



Fig. 2 *Hibiscus syriacus* 'Nanpa' grown in Subtropical Horticulture Research Institute in Jeju National University

Table 1 Difference between MS medium and modified MS medium used in this study

Ingredients		MS basal medium	Modified MS medium
<i>CaCl</i> ₂		332.2 mg/L	1161.38 mg/l
Fe		FeSO ₄ 27.8 mg/L Na ₂ EDTA 37.3 mg/L	Fe-EDTA 17.53 mg/L
Vitamins	Nicotinic acid	0.5 mg/L	1 mg/L
	Thiamine-HCl	0.1 mg/L	10 mg/L
	Pyridoxine-HCl	0.5 mg/L	1 mg/L

Table 2 Composition of the medium used for callus induction(CI), adventitious shoot regeneration (RE) for tissue culture of *H. syriacus* 'Nanpa'

Medium	Composition
CI	
1	Modified MS, 0.46 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP
2	Modified MS, 0.92 mg/L NAA, 0.5 mg/L BAP
3	Modified MS, 0.46 mg/L NAA, 1 mg/L BAP
4	Modified MS, 0.92 mg/L NAA, 1 mg/L BAP
RE	Modified MS, 0.5 mg/L BAP

III. 결과 및 고찰

1. 잎 절편으로 부터의 캘러스 유도

무궁화 ‘난파’의 성숙한 잎을 이용하여 캘러스를 유도하기 위해 잎 절편을 잘라 0.46 mg/L NAA 와 0.5 mg/L BAP(CI-1), 0.92 mg/L NAA 와 0.5 mg/L BAP(CI-2), 0.46 mg/L NAA 와 1mg/L BAP(CI-3), 0.92 mg/L NAA 와 1 mg/L BAP(CI-4)를 각각 조합한 캘러스 유도배지(Callus induction, CI)에 치상하고 암조건 하에서 배양하였다.

실험 결과 잎 절편 가장자리부터 캘러스가 형성되기 시작했고 사용한 모든 캘러스 유도배지에서 캘러스의 형성이 관찰되었다. 배양 6 주 후 관찰한 결과 각 배지에서의 캘러스 유도율에는 큰 차이가 없었으나 0.92 mg/L NAA 와 1 mg/L BAP(CI-4)가 조합된 배지에서 유도된 캘러스만 질은 녹색이었고 다른 배지에 비해 현저하게 캘러스 생장률이 높았다(Table 3). 나머지 캘러스 유도 배지 유래의 캘러스는 노란 빛이 도는 흰색을 띠었다(Fig. 3). NAA 와 BAP 비율이 같은 CI-1, CI-4 배지 유래의 캘러스 색깔이 서로 다른 결과에서 캘러스의 색은 호르몬의 비율보단 호르몬의 절대적 양에 더 영향을 받는 것으로 추정되었다. 유도된 모든 캘러스의 질감은 전체적으로 딱딱하고 쉽게 부워지지 않았다. 캘러스 유도배지 CI-1 과 CI-4 에서 유도된 캘러스에서는 캘러스의 증식과 함께 adventitious shoot(Fig. 4)도 형성되었다. 본 결과에서 NAA 와 BAP 의 비율이 약 1:1 인 경우에 성숙한 잎 절편으로부터 adventitious bud 가 잘 형성되는

callus 가 유도되는 것으로 보인다. 캘러스 유도율은 CI-1 배지와 CI-4 배지에서 100%로 가장 높은 효율을 나타내었다(Table 3). 본 결과는 ‘난과’ 성숙 잎 절편체로부터의 캘러스 유도에는 식물생장 호르몬 NAA 와 BAP 의 혼용처리가 적합함을 시사한다.

2. 캘러스 유도배지가 재분화에 미치는 영향

한 캘러스 당 많은 수의 싹을 얻기 위해 기본 MS 배지보다 높은 농도의 BAP 가 첨가된 배지(Christensen et al. 2008)를 이용하여 캘러스를 배양하였다. *Hibiscus*속 식물은 싹을 유도할 때 BAP 농도가 높으면 한 캘러스 당 생기는 슈트의 길이는 작지만 많은 수의 shoot 를 형성한다는 보고(Christensen et al. 2008)에 따라 본 실험에서는 변형된 MS 배지에 BAP 를 0.5 mg/L 농도로 단독 처리한 싹 재분화배지를 사용하였다. 캘러스 형성률이 낮은 CI-3 배지에서 자란 캘러스를 제외한 나머지 CI-1, CI-2, CI-4 배지에서 유도된 캘러스를 변형된 MS 배지에 0.5 mg/L BAP 가 첨가된 재분화배지에 치상하였다. 이 때 각각의 CI 배지에서 유도된 캘러스가 섞이지 않도록 하였고, 하나의 잎 절편에서 유도된 캘러스는 여러 조각으로 분할하지 않고 그대로 사용하였다. 실험은 16-h/8-h 광조건, $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 조건에서 3 주간 배양한 다음 싹 발생 빈도를 조사하였다. 한 개의 캘러스 덩어리에 여러 개의 싹이 형성된 경우에도 1 개의 싹이 형성된 것으로 간주하고 싹 형성율을 계산하였다. 암조건 하에서

형성되었던 CI-1, CI-4 유래의 adventitious shoot 는 더 크게 성장하며 신초를 형성하였고 동시에 캘러스도 더욱 비대해졌다(Fig. 5). CI-1 과 CI-4 에서 유도되었던 캘러스(CI-1, CI-4 유래)는 다른 2 종류의 배지에서 유도된 캘러스보다 높은 신초형성률을 보였고, 특히 CI-1 유래 캘러스에서는 100%의 신초형성률이 관찰되었다(Table 4). 그에 반해 CI-2 유래 캘러스는 다소 낮은 신초형성율을 나타냈다. CI-2 유래 캘러스의 신초형성율을 높일 수 있는지 확인하기 위해 신초가 형성되지 않은 캘러스를 여러 개로 분할하여 동일한 신초 재분화배지에 계대배양한 다음 10 일 후 신초형성 여부를 관찰하였다. 여러 개의 조각으로 분할된 CI-2 유래 캘러스는 신초를 형성하였고, 분할 후의 CI-2 유래 캘러스의 신초형성율은 67%로 증가하였다(Table 5). 이 결과는 캘러스의 크기가 크면 재분화 빈도가 낮다는 기존의 보고(Haque et al. 2015)와 같았고, 동일한 방법으로 CI-1 또는 CI-4 의 캘러스도 적절한 크기로 분할하여 배양하면 더 활발한 신초 형성을 할 수 있을 것으로 기대된다. CI-1 과 CI-4 유래 캘러스에서 신초의 크기가 큰 것과 작은 것을 모두 포함하면 하나의 캘러스 당 5 개 이상의 multiple shoot 이 관찰되었다. 신초의 형성률이 높으면서 mutiple shoot 가 형성되는 것에는 재분화 배지에서의 BAP 뿐만 아니라 캘러스 유도 배지의 호르몬 조성 및 비율도 영향을 미치는 것으로 사료된다.

3. 재분화 식물체의 형성과정과 체세포 변이

서로 다른 캘러스 유도 배지(CI-1, CI-2 및 CI-4)에서 유도한 캘러스의 신초 형성률 차이를 알아보기 위해 재분화 배지에서 배양 중인 CI-2 와 CI-4 유래 캘러스의 형태적 특성을 관찰하였다. CI-2 와 CI-4 유래 대부분의 캘러스에서는 adventitious bud 와 adventitious shoot 가 모두 관찰되었으나, CI-4 유래 캘러스가 CI-2 유래 캘러스보다 adventitious shoot 가 더 많이 형성됨이 관찰되었다. 이는 adventitious bud 에서 adventitious shoot 로의 발달에 CI-4 유래의 캘러스가 더 적합함을 시사한다. 또한, CI-2 와 CI-4 유래 캘러스에서는 재분화되지 않는 유사 globular stage embryos 가 관찰되었고, CI-4 유래 캘러스에서는 약간 재분화 능력이 있는 유사 globular stage embryo 도 극히 일부가 존재함이 관찰(Fig. 7)되었다. 재분화 능력이 거의 없는 것처럼 보이는 유사 globular embryos 는 짙은 녹색을 띠었고, 계대배양을 통해 배양시간을 연장해도 더 이상의 발생단계로 진행하지 않았다. 모든 캘러스 배지 유래의 재분화 능력이 있는 embryo 는 유사 globular stage embryo 보다 옅은 녹색을 띠었다.

무궁화의 잎 절편으로부터 유도된 CI-4 유래의 캘러스는 embryogenic 또는 organogenic callus 로 유도(Fig. 6)되었고(Pathi et al. 2013), 형성된 모든 adventitious bud 가 adventitious shoot 로 발달하지는 않았다(Yoo et al. 1996). 본 실험에서는 CI-1 과 CI-4 에서 유도된 캘러스가 adventitious bud 에서 adventitious shoot 로 발달하는 비율이 높았다. 또한, 본 연구에서는 embryogenic callus 유래의 신초보다 organogenic callus 유래의 신초가 훨씬 많은 것으로 관찰되었다. 이 결과는 잎의 절편으로부터 유래한 캘러스로부터

adventitious shoot 로의 재분화는 비교적 높은 농도의 사이토키닌(1 mg/L)과 높은 농도의 옥신(0.92mg/L)에서 가장 효과적이었다는 보고(Vermaet al. 2010)와 일치하였다. 그러나 본 연구에서 얻어진 무궁화 재분화 식물체가 organogenesis 를 통해 얻어진 것인지 embryogenesis 를 통해 얻어진 것인지는 보다 세밀한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

식물의 기내 배양을 통한 조직배양 환경 하에서는 배양 식물의 유전자형 또는 표현형에 돌연변이가 발생하는(Joyce et al. 2003; Sato et al. 2011) Somaclonal variation 이 유발된다(Krishna et al. 2015). 일반적으로 식물의 변이는 Somatic embryogenesis 과정에서 자엽의 형태적 변이(Soh et al. 2001)등 형태변형이 가장 흔하며 특히 2,4-D 가 첨가된 배지에서는 다양한 somaclonal variation 에 의한 형태적 변형(Shoemaker et al. 1991; Garcia et al. 2019)이 야기된다. 이와 같은 발생과정에서 획득된 변이는 유전적일 수 있다. Fig 8 에 제시한 것과 같이 CI-1 유래 캘러스에서 재분화된 식물체의 잎을 조사한 결과, 극히 일부에서 비정상적인 형태의 잎이 관찰되었으나 대부분은 모품종과 동일한 정상적인 잎 형태를 나타냈다.

본 연구를 통해 확립된 성숙한 잎을 이용한 무궁화의 재분화체계는 식물재료를 얻는데 시기적인 제한을 받지 않고 보다 적은 비용으로 많은 양의 잎 절편을 얻을 수 있는 장점이 있다. 또한 재분화 효율이 100%로 매우 높으므로 향후 우수 무궁화 품종의 대량증식 및 무궁화의 분자육종을 통한 신품종 개발에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Table 3 Effects of different concentrations of NAA and BAP on callus induction frequency (%). Callus induction frequency was estimated after 6 weeks of culture in the dark. Mature leaf explants of *Hibiscus syriacus* 'Nanpa' were used for the experiment.

callus induction (CI) medium	Growth regulator (mg/L)		Callus induction Frequency (%)	Callus growth ^a	Callus color
	NAA	BAP			
1	0.46	0.5	100±0.00	+++	Yellow + White
2	0.92	0.5	98±3.4	+++	Yellow + White
3	0.46	1	84.1±5.45	++	Yellow + White
4	0.92	1	100±0.00	++++	Green

a - : none, + : low, ++ : medium, +++ : high, ++++ : very high

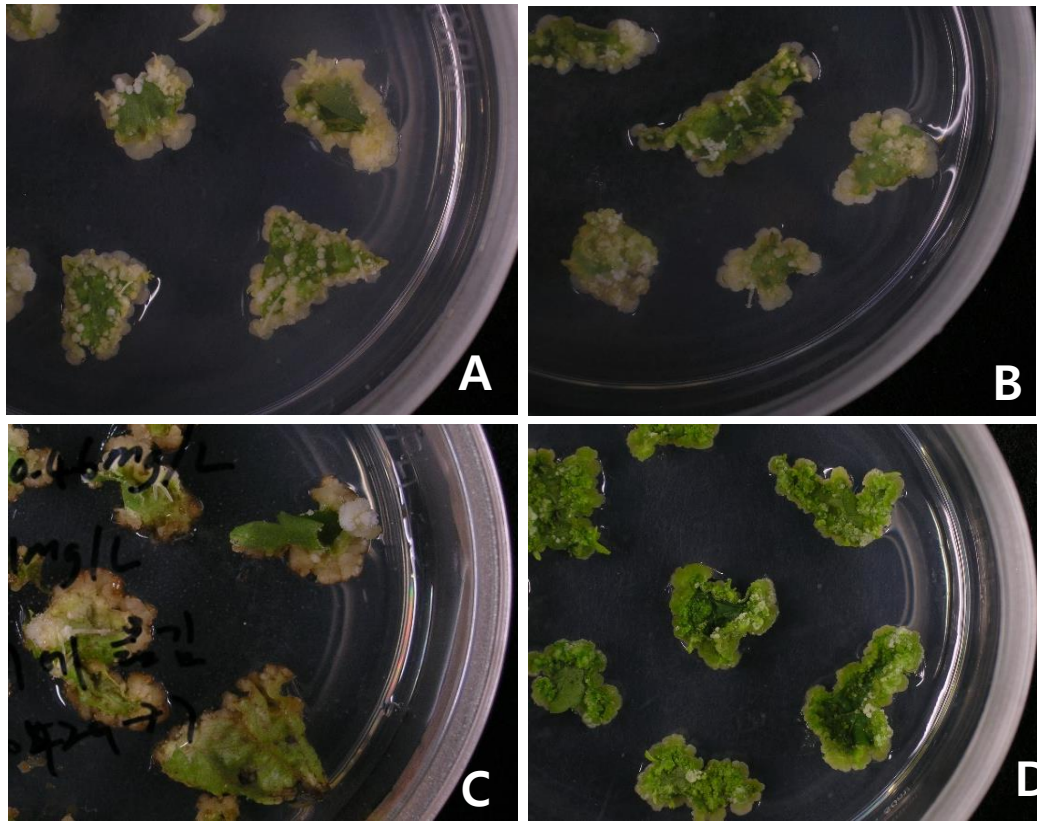


Fig. 3 Effects of different concentrations of growth regulators on callus induction. Callus was observed after 6 weeks. The callus cultured on CI-1(A), CI-2(B), CI-3(C), CI-4(D)

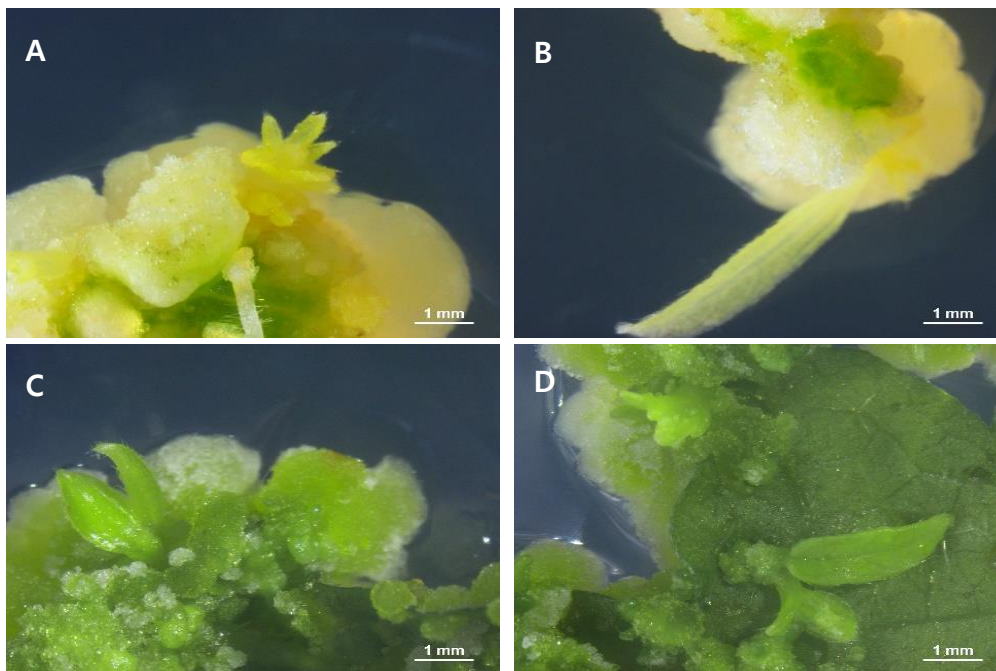


Fig. 4 Morphology of callus induced from on different callus induction medium. Adventitious shoots were observed on 6 weeks old callus. A and B, callus induced from CI-1 medium; C and D, callus induced from CI-4 medium.

Table 4 Effect of callus induction medium supplemented with different concentrations of growth regulators on shoot regeneration efficiencies. The callus induced from different callus induction medium was transferred to the adventitious shoot regeneration (RE) medium and the regeneration efficiency was calculated after 3 weeks of culture.

Medium used for callus induction	Shoot regeneration efficiency (%)
CI-1	100 ± 0.00
CI-2	40 ± 5.77
CI-4	83.7 ± 9.86

Table 5 Relationship between split of callus derived from CI-2 and shoot **regeneration**. The callus derived from CI-2 were split and transferred to the shoot regeneration medium, and the regeneration efficiency was calculated after 10 days culture. The transferred callus has no shoot.

Medium used for callus induction	Shoot regeneration efficiency (%)
CI-2	67.3 ± 8.31

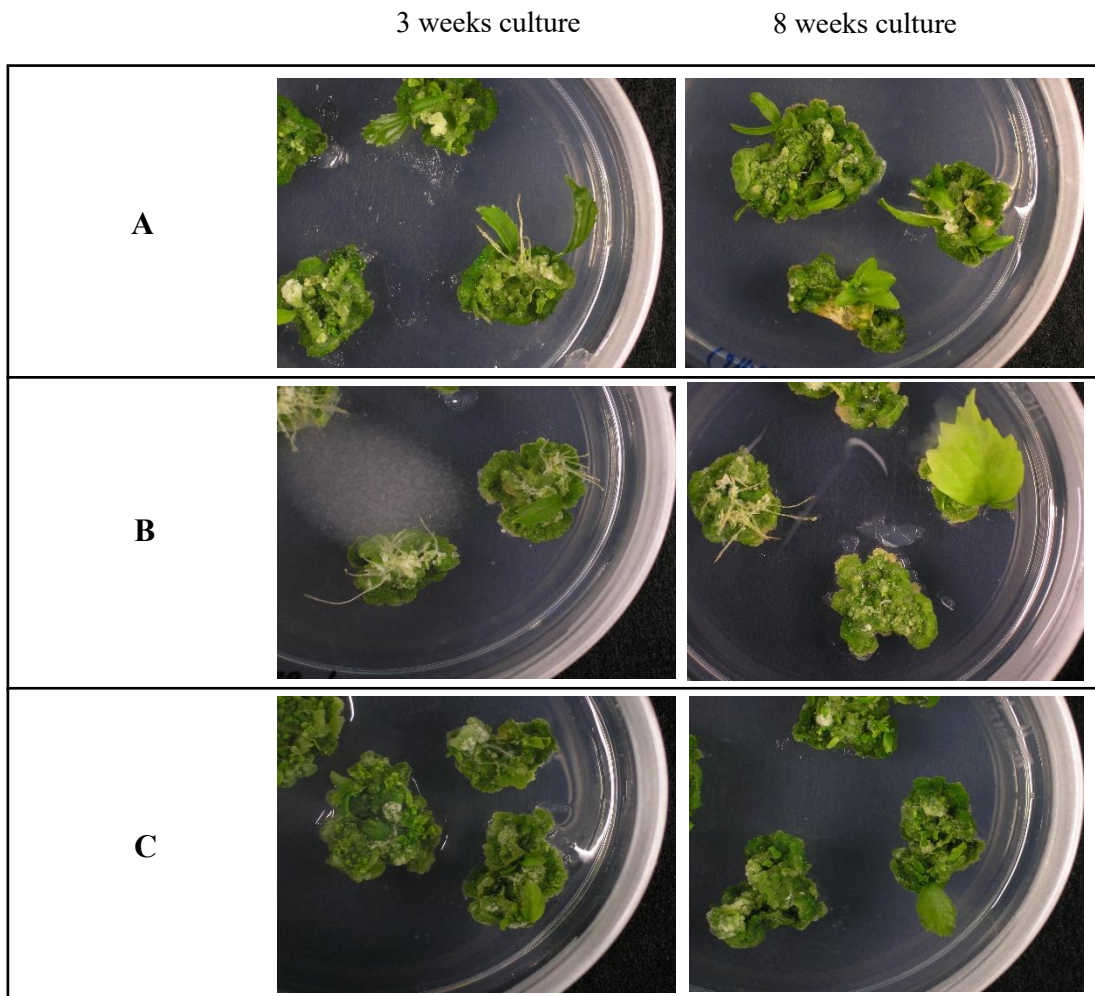


Fig. 5 Effect of callus induction medium supplemented with different concentrations of growth regulators on shoot regeneration. A, shoot regeneration derived from CI-1 callus; B, shoot regeneration derived from CI-2 callus; C, shoot regeneration derived from CI-4 callus.

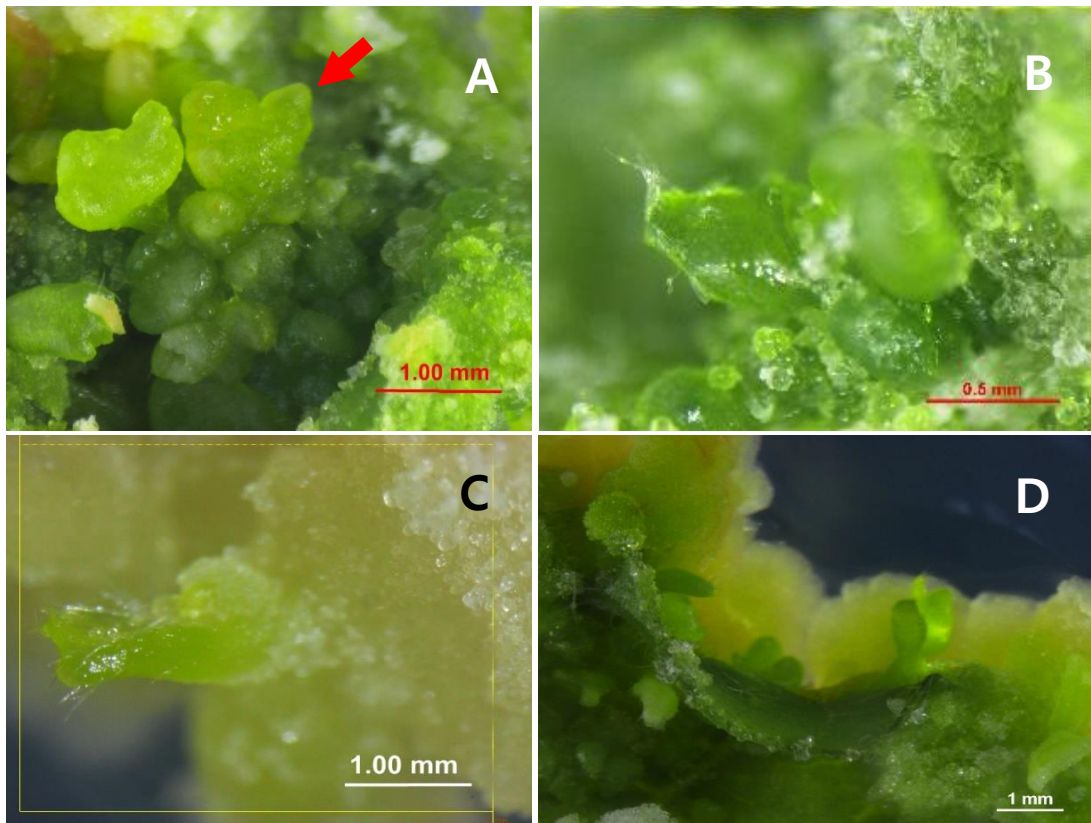


Fig. 6 Morphology of callus induced from same callus induction medium (CI-4). (A) and (C), predicted heart shaped stage embryo from embryogenic like callus via indirect somatic embryogenesis; (B) and (D), adventitious bud (B) to develop the shoot(D) from organogenic like callus via organogenesis.

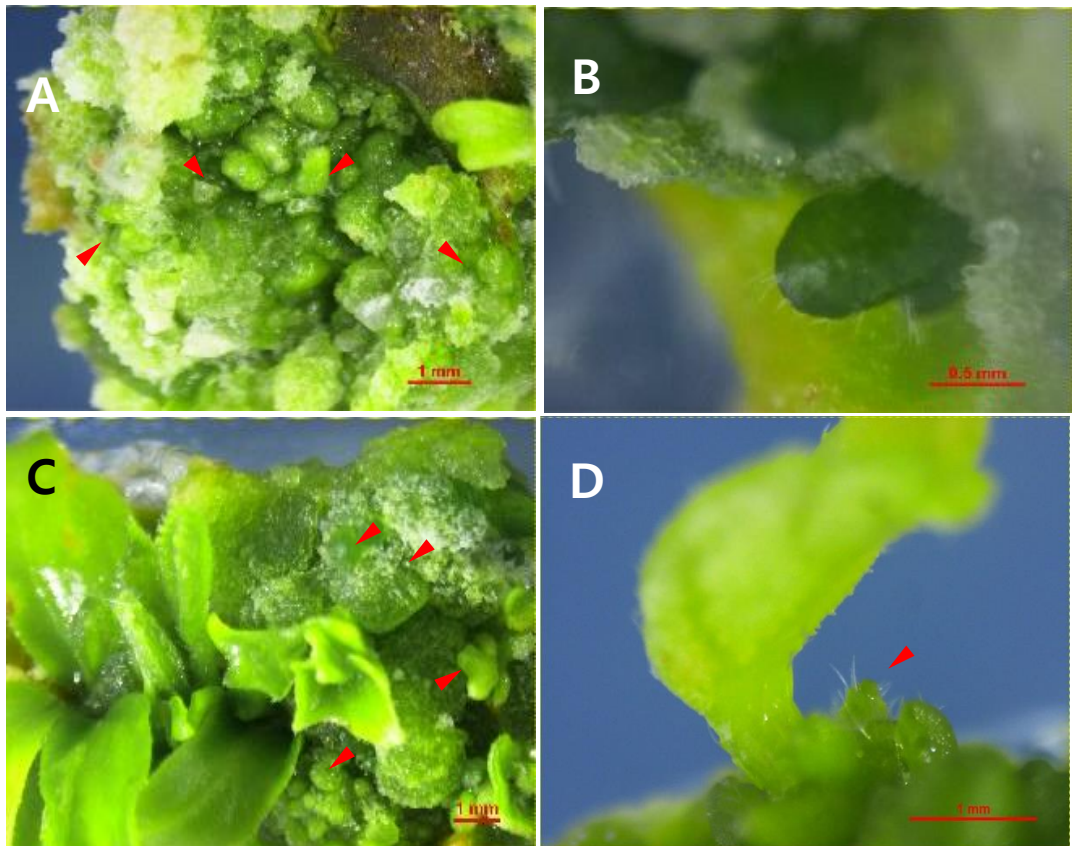


Fig. 7 Shoot regeneration of callus derived from *Hibiscus syriacus* 'Nanpa' leaf explants. A and B, green callus derived from CI-2 medium on shoot regeneration medium; C and D, green callus derived from CI-4 medium on shoot regeneration medium.



Fig. 8 Morphological variation in shoots regeneration from mature leaves of *Hibiscus syriacus* 'Nanpa'. (A), (B) leaf of normal shape; (C) Modified shape of leaf.

IV. 종합고찰

무궁화는 우리나라를 상징하는 나라꽃으로 공원, 정원, 도로변 등에 관상용으로 널리 이용되고 있다. 본 연구는 무궁화 품종 '난파'의 성숙 잎을 재료로 이용하여 재분화 체계를 확립하기 위하여 수행되었다. 표면 살균한 성숙 잎 절편을 각기 다른 농도로 조합 처리된 NAA 와 BAP 를 포함하는 변형된 MS 배지에서 배양하였다. 이들 배지 중 0.46 mg/L NAA 와 0.5 mg/L BAP 를 포함하는 변형된 MS 배지(CI-1)와 0.92 mg/L NAA 와 1 mg/L 의 BAP 를 포함하는 변형된 MS 배지(CI-4)가 캘러스 형성에 가장 효과적이었다. CI-1 배지에서는 흰색을 띤 노란색의 캘러스가 관찰되었고, CI-4 배지에서는 녹색의 캘러스가 형성되었다. BAP 를 0.5 mg/L 의 농도로 포함하는 변형된 MS 배지에서의 신초형성율은 CI-1 배지 유래의 캘러스가 CI-4 유래의 캘러스보다 높았다. 본 연구에서 사용된 배지 중 신초 형성능을 가진 캘러스의 생산에는 0.46 mg/L NAA 와 0.5 mg/L BAP 를 포함하는 변형된 MS 배지가 가장 적합하였다. 본 연구의 결과는 무궁화 품종 '난파'의 식물 재분화에 성숙 잎이 사용 가능함을 보여주고 있고, 본 연구에서 확립된 재분화 시스템은 향후 '난파' 품종의 분자육종에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

V. 참고문헌

- Anaka T (1976) Tanaka's cyclopaedia of edible plants of the world. Keigaku Publishing, Tokyo, 924 pp Cheng YL, Lee SC, Harn HJ, Huang HC, Chang WL (2008) The extract of *Hibiscus syriacus* inducing apoptosis by activating p53 and AIF in human lung cancer cells. Am J Chin Med 36:171-184
- Christensen B, Sriskandarajah S, Serek M, Muller R (2008) In vitro culture of *Hibiscus rosa-sinensis* L.: Influence of iron, calcium and BAP on establishment and multiplication. Plant Cell Tiss Organ Cult 93:151-161
- Deepak KV, Johnny subakar ivin J, Narayanan GS, Prakash M, Murugan S, Anandan R (2019) Efficient plant regeneration and histological evaluations of regenerants through organogenesis and somatic embryogenesis in *Spermacoce hispida* L.—An underutilized medicinally important plant. Industrial Crops & Products 134: 292-302
- di Martino O, Tito A., De Lucia A, Cimmino A, Cicotti A, Apone F, Colucci G, and Calabrò V (2017) *Hibiscus syriacus* extract from an established cell culture stimulates skin wound healing. BioMed Res Int 2017, 7932019

Garcia C, Almeida AA, Costa M, Britto D, Valle R, Royaert S, Marelli JP (2019)
Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2,4-D: an overview.
Plant Cell Tissue and Organ Culture 137:193–212

Haque M, Islam SMS (2015) Callus age and size of barley (*Hodrdeum vulare*
L.) improves regeneration efficiency. Not Sci Biol 7:189–191

Hedrick UP (1972) Sturtevant's edible plants of the world. Dover Publications.
New York. pp 686

Hotta M, Ogata K, Nitta A, Hosikawa K, Yanagi M, Yamazaki K (1989) Useful
plants of the world. p. 1499. Heibonsha, Tokyo, Japan

Hsia C, Korban SS (1996) Organogenesis and somatic embryogenesis in callus
cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis minima*. Plant Cell, Tissue and
Organ Culture 44: 1–6

Hsu RJ, Hsu YC, Chen SP, Fu CL, Yu JC, Chang FW, Chen YH, Liu JM, Ho JY,
Yu CP (2015) The triterpenoids of *Hibiscus syriacus* induce apoptosis and

inhibit cell migration in breast cancer cells. BMC Complement Altern Med
15:65

Hu SY (2005) Food plants of China. The Chinese University Press, Hong Kong,
pp 844

Huang H, Li J, Yang KO, Zhao X, Li P, Liao BY, Chen XY (2014) Direct
adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledon
explants in *Neolamarckia cadamba*. Plant Biotechnology 31:115–121

Jeon SB, Kang SW, Kim WS, Lee GP, Kim SH, Seo SG (2009) In vitro plant
regeneration from axillary buds of *Hibiscus syriacus* L . J Plant Biotechnol
36: 174–178

Kumari A, Baskaran P, Van Staden J (2017) In vitro propagation via
organogenesis and embryogenesis of *Cyrtanthus mackenii*: a valuable
threatened medicinal plant. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 131: 407–415

Kim JH, Park SM (2000). In vitro regeneration system from nucellus of

fertilized ovules in *Hibiscus syriacus* L. J Plant Biotechnol 11: 28-38

Kim TD, Lee BS, Kim TS, Choi YE (2007) Developmental plasticity of glandular trichomes into somatic embryogenesis in *Tilia amurensis*. Ann. Bot. 100: 177-183

Kim EK, Yoo YK, Kim KS (1998) Thidiazuron-induced shoot formation of *Hibiscus syriacus* L. 'Honghwarang' by suspension culture. Kor J Hort Sci Technol 16:525-527

Kim M, Kim YJ, Park SY (2018) Effects of white *Hibiscus syriacus* L. root extracts as functional cosmetic materials. Asian J Beauty Cosmetol 16: 477-486

Krishna H, Alizadeh M, Singh D, Singh U, Chauhan N, Eftekhari M, Sadh K (2015) Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. 3 Biotech 6: 54.

Kumari S, Pandey RK (2011) In vitro plant regeneration from shoot tip explants

of *Hibiscus syriacus* L. Int Q J Life Sci 6:647-648

Kunkel G (1984) Plants for human consumption: an annotated checklist of the edible phanerogams and ferns. Koeltz Scientific Books, Koenigstein, pp 393

Joyce SM, Cassells AC, Jain SM (2003) Stress and aberrant phenotypes *in vitro* culture, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 103-121

Lee HS, Lee JS, Kwack BH (1997) Cold hardness of *Hibiscus syriacus* cultivars and evaluation of assay methods in determination of cold hardness. J Kor Soc Hort Sci 38: 541-545

Lee HS, Lee JS, Kwack BH (1998) Characteristics of rooting and shoot growth influenced by cultivar and flower types in *Hibiscus syriacus* hardwood cutting. Kor J Hort Sci & Tech 16:528-530

Lee JY, Kang EJ, Kim SH, Kim DS, Kim JB, Ha BK, Kang SY (2011) The effect of plant growth regulators on callus induction and shoot regeneration from the dwarf type variety, *Hibiscus syriacus* L.var. Ggoma. J Radiat Ind 5:231-236

Li Q, Deng M, Zhang J, Zhao W, Song Y, Li Q, Huang Q (2013) Shoot Organogenesis and Plant Regeneration from Leaf Explants of *Lysionotus serratus* D. Don. The Scientific World Journal. 280384

Mao JQ, Zaidi MB, Arnason JT, Altosaar I (2006) In vitro regeneration of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. cv. Blackeye cowpea via shoot organogenesis. Plant Cell Tiss Organ Cult. 87:121-125

Niranjan MH and Sudarshan MS (2009) Histological studies of in vitro regeneration induced in leaf explants of *Nymphoides cristatum* (Roxb) O.Kuntze – An aquatic medicinal plant. Int J Life Sci 3 : 14-17

Pathi KM, Tula S, Huda KMK, Srivastava VK, Tuteja N (2013) An efficient and rapid regeneration via multiple shoot induction from mature seed derived embryogenic and organogenic callus of Indian maize (*Zea mays* L.). Plant Signaling & Behavior 8:e25891

Sato M, Hosokawa M, Doi M (2011) Somaclonal variation is induced *De Novo* via the tissue culture process: A study quantifying mutated cells in

Saintpauli. PLoS ONE 6:e23541

Seo SG, Ryu SH, Zhou Y, Kim SH (2017) Development of an efficient protocol for high-frequency regeneration system in *Hibiscus syriacus* L. J Plant Biotech 44:164-170

Shoemaker R, Amberger L, Palmer R, Oglesby L, Ranch J (1991) Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentration on somatic embryogenesis and heritable variation in soybean [*Glycine max* (L) merr.]. In vitro cell dev biol 27:84-88

Soh WY, Choi PS, Cho DY, Liu JR (2001) plant regeneration from somatic embryos with anomalous cotyledons formed in cell cultures of *Codonopsis lanceolata*. Phytomorphology Golden Jubilee Issue 327-336.

Song KH, Park HG (1998) High frequency plant regeneration through suspension culture in *Hibiscus syriacus*. J Kor Soc Hort Sci 39: 843-848

Shim KK, Kim KH, Seo BK (1999) Top growth, flowering, cold hardiness, and aphids resistance of *Hibiscus syriacus* cultivars. J Kor Soc Hort Sci 40:99-

Yoo EH, Yoo YK, Kim KS (1996) Effects of growth regulators, sucrose, light, and medium on callus and shoot formation in shoot-tip culture of *Hibiscus syriacus* L. 'Honghwarang'. J Kor Soc Hort Sci 37:317-323

Verma SK, Yücesan BB, Gürel S, Gürel E (2010) Indirect somatic embryogenesis and shoot organogenesis from cotyledonary leaf segments of *Digitalis lamarckii* Ivan., an endemic medicinal species. Turk J Biol 35:743-750

Zhao YX, Yao DY, Harris PJC (1991) Isolation and culture of protoplasts from callus tissue of *Hibiscus syriacus* L. Plant Cell Tiss Organ Cult 25:17-19