

藥用植物의 組織培養에 關한 研究(II)

이태리甘草의 組織培養

劉承兆·金聖順

성균관대학교 약학대학

Studies on tissue culture of medicinal plants (II)

Tissue cultures of *Glycyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera* REG. et HERDER

Sung Cho Yoo and Sung Soon Kim

College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Seoul, Korea

The callus formation of *Glycyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera* REG. et HERD. in tissue culture was promoted on Murashige and Skoog's basal solution supplemented with 40g/l of sucrose, 1mg/l of kinetin and 5mg/l of 2, 4-D.

The fresh and dry weights of callus and glycyrrhizin contents in callus of the *Glycyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera* REG. et. HERD. were determined monthly up to 12 months and obtained the results as follows:

1. The fresh weight of formed callus was increased rapidly from 2 to 4 months but growing rate of callus was slow from 4 to 6 months. This indicates that the cell division of callus was most active during the first 2~3 months.
2. Glycyrrhizin contents in callus were also increased but the contents were not related to the increased weight of callus.

서론

甘草(*Glycyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera* REG. et HERD. 이하 이태리甘草라고 칭함)의 組織培養에 關하여 callus 誘起에 따른 條件(部位, 培地 등)과 培地組成에 따른 Glycyrrhizin의 消長에 關하여 報告한 바 있었으나^{1,2,3)} 培養時日에 關한 研究가 없었기 때문에 이태리甘草의 組織培養月齡에 따른 callus의 重量變遷과 callus의 glycyrrhizin 含量의 消長등을 檢討한바, 組織培養月齡이 經過함에 따라 形成된 callus의 生重量, 乾燥重量 및 callus中의 Glycyrrhizin 含量이 점차 增加함을 알 수 있었다.

실험재료 및 방법

實驗材料

實驗材料는 1974年 및 1975年 4月 國立保健研究院에서 實驗栽培中인 *Glycyrrhiza glabra* L. var. *glandulifera*

REG. et HERD.²⁰⁾ (이태리甘草)의 살아있는 근경(stolon)을 분양받아 모래에 심어 약 10~15일 후에 나오는 싹(shoot)의 선단부분 약 1~2cm를 잘라내어 7% calcium hypochloride 수용액으로 15분간 소독한 후 멸균수로 수회 세척하여 대략 一定한 크기(0.3mm×1mm×3mm)와 一定한 무게(4~5mg)로 갈라서 자료(explant)로 使用하였다.

實驗方法

1. 培地組成; 이태리甘草의 callus 형성에 最적인 M.S. medium液에 kinetin 1mg/l, 2,4-D 5mg/l 및 4% sucrose를 添加하여 培地로 선정하였다(Table I).

2. 培養條件; 위의 培地에 6gm/l(겨울), 8gm/l(여름)의 agar를 넣어 고형 배지로 만들어 pH 5.0으로 調節하여 25±1°C에서 암소 培養하였다.

3. 培養過程; 1차 滅菌한 Erlenmeyer flask(100ml)에 培地(約 40ml)를 넣고 다시 2차 滅菌한 후에 無菌상자속에서 explant 5-6個씩을 培地에 심어 20日 후에

이식하여 다시 20日間 계대 배양하였다. 이때 사용한 배지도 먼저 것과 같다.

이리하여 형성된 callus를 중량과 glycyrrhizin을定量하였다.

4. Callus의 重量; callus의 生重量은 M.S medium에서 callus를 떼어내어 explant를 分離 除去한 후 蒸溜 水로 씻은 후 秤量하였고, 新鮮한 callus를 실온(18~20°C)에서 約 20時間 乾燥시킨 후 秤量하여 乾燥 重量으로 하였다.

5. Callus中の glycyrrhizin 定量; Callus가 形成되었다 하더라도 微量이기 때문에 glycyrrhizin 秤量법을 검토한 결과 Kurono and Sasaki의 T.L.C에 의한 glycyrrhizin의 미량秤량법²¹⁾이 가장 適合하여 이 方法을 擇하였다.

위의 培養過程에서 形成된 callus를 explant로부터 分離하여 실온(18-20°C)에서 約 20시간 乾燥시킨 후 분말로 하여 正確히 50mg을 달아 秤량시료로 하였고 秤量법은 Kurono and Sasaki의 方法과 同一하게 하였고 흡광도 測定에는 Hitachi(Perkin-Elmer 139) Spectrophotometer를 使用하였다.

Table I. The Medium Contents.

I) Basal medium(Murashige & Skoog's solution)

NH ₄ NO ₃	1650	mg/l
KNO ₃	1900	"
H ₃ BO ₃	6.2	"
KI	0.83	"
KH ₂ PO ₄	170	"
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	"
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	"
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	"
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	"
ZnSO ₄ ·H ₂ O	8.6	"
CuSO ₄ ·H ₂ O	0.025	"
Na ₂ -EDTA	37.35	"
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85	"
Thiamine HCl	0.1	"
Nicotinic acid	0.5	"
Pyridoxine HCl	0.5	"
Glycine	2	"

II) Addendum in basal medium

Sucrose	40mg/l
2,4-D	5mg/l
Kinetin	1mg/l
Agar	9mg/l

결과 및 고찰

1. 形成된 Callus의 重量의 變遷:

이태리 甘草의 살아있는 根莖을 모래에 심어 생긴 싹의 선단부분(shoot apex)을 培養하여 形成된 Callus를 1個月마다 分離하여 Callus 10個當의 生重量(平均值)과 乾燥重量을 測定한 結果는 Table II와 같다.

Table II. Fresh Weight and Dry Weight of Callus-per Month.

Cultivation month	Weight of callus	
	Fresh weight	Dry weight
1 month	133.10mg	27.58mg
2 month	865.55 "	164.4 "
3 "	3164.23 "	732.4 "
4 "	3392.85 "	810.7 "
5 "	3722.0 "	894.5 "
6 "	4350 "	1060.9 "
12 (After) month	17053 "	13350 "

Table II의 수치를 Fig. 1로 表示하여 比較하였다.

이상의 結果를 考察할 때 callus 生重量에 있어서 培養한 후 2,3個月 經過한 時期에서 急激하게 增加함을

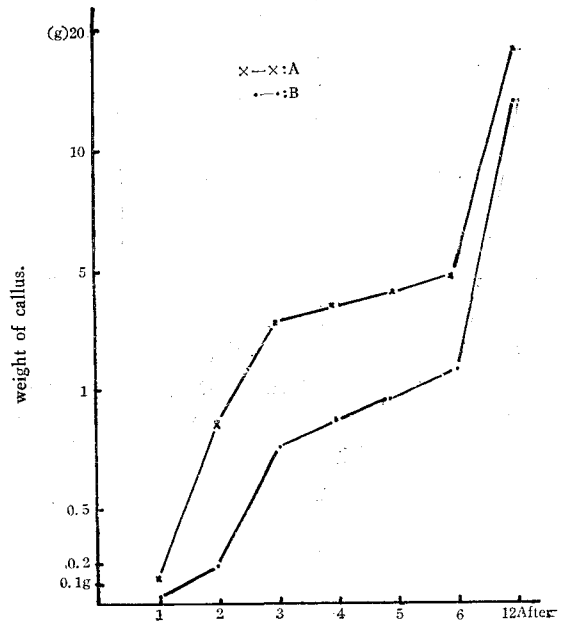


Fig. 1. Comparison of fresh and dry weight of callus per month.

A : fresh weight of callus
B : dry weight of callus

알 수 있고 4, 5, 6個月에서는 徐徐히 增大해짐을 알 수 있었다.

即 細胞分裂과 細胞의 크기가 2, 3個月에서 가장 活潑함을 알 수 있었다. 또한 乾燥증량의 變遷過程도 生重量과 거의 同調的이어서 callus의 組織이 점차 切밀하게 됨을 알 수 있었다.

2. Callus中에 含有된 glycyrrhizin량의 消長:

前報에서 이태리 甘草의 살아있는 근경을 모래에 심어 생긴 싹의 선단부분(shoot apex)을 培養하여 形成된 callus에 glycyrrhizin이 함유되고 있음을 Kurono and Sasaki method에 의한 T.L.C로 Glycyrrhizin 표준품과 同時에 展開시켜 確認할 수 있었다. 確認한 後에 이태리 甘草의 살아있는 근경을 모래에 심어서 생긴 싹의 선단 부분과 1, 2, 3, 4, 5, 6個月 및 12個月 이상된 callus와 이태리 甘草의 근경에 들어있는 glycyrrhizin 量을 測定하였다.

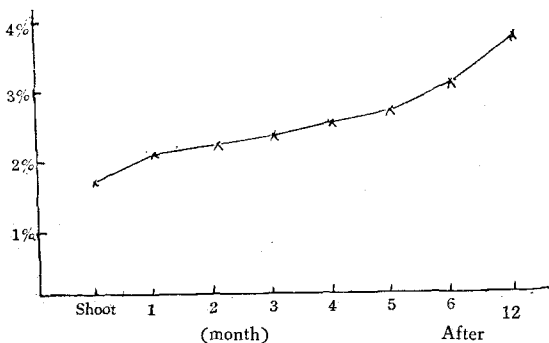
그 결과 위와 같이 분리한 glycyrrhizin 量의 消長을 Kurono and Sasaki method에 의한 計算法으로 %로 表示하여 보면 Table III과 같다. 이것을 Fig. 2로 表示하였다.

이와 같은 結果를 미루어 볼 때 callus 生重量 및 乾

Table III. Contents of Glycyrrhizin in Dry Callus per Month.

Cultivation per month	Contents of Glycyrrhizin (%)
Shoot apex	1.7
1 month	2.2
2 "	2.3
3 "	2.5
4 "	2.6
5 "	2.8
6 "	3.3
12 after month	3.9
Stolon of Glycyrrhiza	9.6

Fig. 2. Contents of glycyrrhizin in callus per month.



燥重量의 變遷과는 반드시 同調的이 아니나 培養時期가 經過함에 따라서 glycyrrhizin 量도 完滿하게 增加함을 알 수 있었다.

결 론

이태리 甘草의 組織培養 月齡이 經過함에 따라서

1. 형성된 callus의 生重量은 2, 3個月에서 急激히 增大되었고, 4, 5, 6個月에서는 서서히 增大되었다.

즉 細胞分裂이 2, 3個月에서 가장 活潑함을 알 수 있었다.

2. Callus의 生重量 및 乾燥重量의 變遷과는 반드시 同調的은 아니나 培養時期가 經過함에 따라서 callus 中의 glycyrrhizin 量도 完滿하게 점차 增加하였다.

<1976. 3. 2 접수>

문 헌

- 1) 朴商佑: 成均館大學校 碩士論文(1974).
- 2) 李載斗, 劉承兆: 科學技術研究(成均館大學校) 3, 13 (1975).
- 3) 劉承兆: 成均館大學校論文集(自然系), 20, 114 (1975).
- 4) 木島, 田端, 山本, 平岡: 生藥學雜誌(日本), 21, 108 (1967).
- 5) 木島, 田端, 山本, 平岡: 生藥學雜誌(日本), 21, 108 (1967).
- 6) Dawson: *Amer. Sci.*, 48, 321 (1960).
- 7) Speak and McCloskey: *Nature*, 201, 614 (1964).
- 8) Furuya, Kojima and Syonoy: *Chem. Pharm. Bull.*, 14, 1189 (1966).
- 9) Furuya, Kojima and Syonoy: *Ibid.*, 15, 901 (1967).
- 10) Furuya: *Phytochemistry.*, 10, 1529 (1971).
- 11) Mitra, Kaul: *Indian J. Exp. Biol.*, 2, 49 (1964).
- 12) Furuya: *Experientia*, 28, 236 (1972).
- 13) Kaul, Staba.: *Lloydia.*, 31, 171 (1968).
- 14) Tomita, Vomori and Minato: *Phytochemistry.*, 9, 111 (1970).
- 15) Furuya, Kojima and Syono Ishii.: *Chem. Pharm. Bull.*, 18, 2371 (1970).
- 16) Furuya: *Ibid.*, 21, 98 (1973).
- 17) 李載斗: 生藥학회지, 3, 65 (1972).
- 18) Kim, J.Y. and Staba, Ihan: 9, 253 (1974).
- 19) Furuya, Matsumoto and Hikichi: *Tetrahedron Letter.*, 27, 2567 (1971).
- 20) 朴在柱, 金鐘源: 生藥학회지, 1, 33 (1970).
- 21) Karono, Sasaki: *Yakogaku Zasshi.*, 90, 497 (1970).