

## 黃芩의 葉組織 培養에 의한 植物體 再分化와 主要 成分

李萬相\* · 金貴鎬\* · 吳基洪\*\*

### Plant Regeneration from Leaf Tissue Culture and Some Effective Substances in *Scutellaria baicalensis* G.

Man-Sang Lee\*, Kui-Ho Kim\* and Ki-Hong O\*\*

**ABSTRACT** : Present experiments were carried out to examine the effect of plant growth regulators for callus induction and plantlet regeneration through leaf tissue culture of *Scutellaria baicalensis* GEORGI. The results indicated that Callus was induced well on MS medium supplemented with 0.5mg/L NAA or 0.5mg/L NAA plus 0.5mg/L zeatin. MS medium supplemented with 1.0mg/L BAP plus 0.5mg/L NAA or 1.0mg/L zeatin plus 0.5mg/L NAA and 1.0mg/L NAA were the most effective for plant regeneration. Thin layer chromatogram of baicalin component(Rf 0.39) was observed from callus cultured on MS medium containing 0.5mg/L NAA plus 0.5mg/L zeatin.

黃芩(*Scutellaria baicalensis* G.)은 꿀풀科에 속하는 多年生 宿根草로 中國이 原產地이다. 草長은 60cm內外로 全體에 털이있으며 7-8월에 紫色의 꽃을 開花하는 短日性 植物로 實生繁殖을 하나 發芽力이 낮다. 全國에서 栽培가 可能하며 용도는 주로 藥用으로 사용되며 觀賞用 및 食用으로 利用되기도 한다.

藥用으로는 구근을 이용하며 解熱, 利膽, 利尿, 消炎, 消腫등에 效果가 있다.<sup>13)</sup> 주성분으로는 baicalin, wogonin, wogonin glucuronide 등이 알려져 있다.<sup>9,14)</sup>

國民所得 向上과 더불어 健康에 대한 關心이 높아지면서 漢藥材의 消費도 꾸준히 늘어나고 있다. 이러한 추세에 따라 藥用作物의 組織培養에 관한 研究가 활발해지고 있으며 實生 또는 營養繁殖이 곤란한 作物에서는 組織培養技術을 利用하여 未熟種苗의 大量生産 및 캘러스 또는 體細胞胚 狀態에서 직접 이차대사산물의 利用 可能性도 研究되고

있다.<sup>1)</sup>

최근 바위솔(*Orostachys japonicus*)의 조직배양을 통해 성분변화를 분석해본 결과 Fatty acids에서 palmitic acid와 linoleic acid의 함량은 완전개체보다 캘러스 형태에서 높다고 보고하였으며<sup>30)</sup> 또한 많은 방법의 개발에 의한 식물체에서보다 높은 농도의 2차대사산물을 생산하였다는 보고가 있다.

본 연구는 황금의 엽조직을 배양하여 식물체를 재분화시키고 유기된 캘러스내에 황금의 고유성분이 존재되어 있는지를 확인코져 실시하였다.

### 材料 및 方法

1. 葉組織으로부터 캘러스誘起에 미치는 植物生長調節劑의 影響.

供試 材料는 圓光大學校 藥用作物 포장에서 자라고 있는 黃芩(*Scutellaria baicalensis*)의 어린 잎을 6月 中旬에 採取하여 培養 材料로 利用하였다.

\* : 원광대학교 농학과(Department of Agronomy, Wonkwang Univ, Iri, Korea)

\*\* : 김제농업고등학교(Kimje Agriculture High School, Kimje, Korea) <1992. 12. 30. 接受>

葉長 2-3cm 크기의 어린 잎을採取하여 1% sodium hypochlorite solution에 10分間 表面殺菌後 滅菌水로 3-4回 水洗한 다음 가로와 세로를 0.5-1cm로 切斷하여 시험관당 2개의 切片을 置床하였다.

培地는 MS(Murashige and Skoog, 1962) agar 0.8%培地를 사용하였으며, pH는 高壓殺菌前 5.8로 調節한後 105℃에서 10分間 agar(0.8%)를 녹여 시험관당 10ml씩 분주하였다. 분주가 끝난 시험관은 aluminum foil로 막아 121℃에서 15分間 滅菌하여 實驗에 사용하였으며 캘러스 誘起를 위하여 培地에 添加된 植物生長調節劑의 種類와 濃度는 NAA, 2,4-D, IAA로 각각 0.5mg/ℓ - 3.0 mg/ℓ를 單獨 또는 混合處理하였다.

培養條件은 캘러스誘起를 위해 25℃에서 暗狀態를 유지하였다.

### 2. 植物體 再分化에 미치는 植物生長調節劑의 影響

캘러스에서 植物體 再分化에 미치는 適定 植物生長調節劑의 種類 및 濃度를 究明하기 위하여 BAP, ABA, Zeatin을 각각 0.01-5.0mg/L를 單獨 및 混合處理 하였다. pH는 0.8% agar를 넣기 전 5.8로 調節하였고 培養條件은 25℃에서 2000 Lux로 16時間/日 照明하였으며 培養 10週 後 캘러스로부터 植物體 分化率을 調査하였다.

### 3. 캘러스 및 再分化 植物體內 Flavonoid系 物質의 定性分析

葉으로부터 誘起된 캘러스 內에 含有되어 있는 Flavonoid系 物質을 定性 分析하였다. 柳<sup>10)</sup>의 方法을 利用하여(Fig. 1)과 같이 Flavonoid의 分析은 캘러스의 生體重 500mg에 ethanol 10ml를 넣어 잠시 끓인 후 濾過한 濾液에 소량의 금속 마그네슘과 염산을 가하여 程色反應을 觀察하였다. Wogonin의 경우는 캘러스의 生體重 500mg에 ether 20ml를 넣고 환류냉각기를 달아 수조상에서 5분간 끓인 다음 濾過한 濾液을 蒸發시키고 殘留物에 ethanol 10ml를 넣어 녹인 溶液 3ml에 묽은 염화 제2철시액 1-2방울을 넣어 程色反應을 觀察하였다. Baicalin의 경우는 캘러스 生體重 500mg에 蒸溜水 5ml를 넣고 수조상에서 10分間 가운한 후 濾過한 濾液 1ml에 초산연 溶液 2-3방울을 넣어 沈澱物 및 程色反應을 觀察하였다.

등적색의 침전물이 생성되는 것을 확인후 다시 TLC法에 의한 baicalin 검정을 실시하였다. TLC

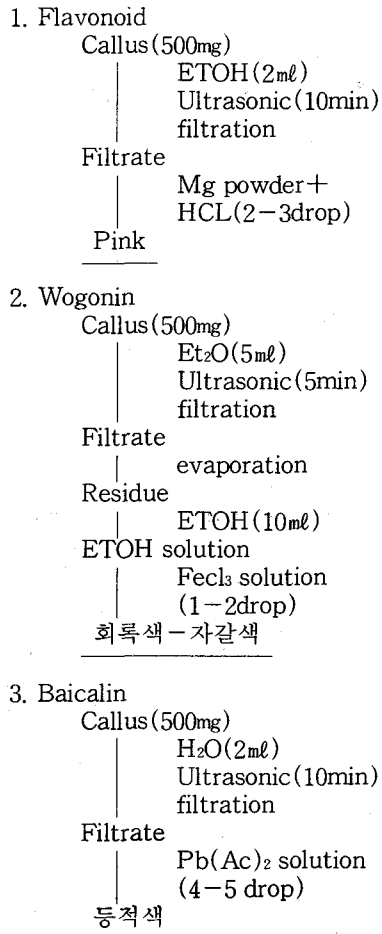


Fig 1. Analysis of component in Callus

검액으로는 캘러스를 Meoh, Etoh, H<sub>2</sub>O 可溶部와 Wako社의 baicalin 標品을 사용하였으며 plate는 Silica gel 60 F<sub>254</sub>를 사용했고 展開溶媒는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>-MEOH-ACOH-H<sub>2</sub>O를 20-10-3-2로 했으며 發色劑로는 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 葉組織으로부터 캘러스誘起에 미치는 植物生長調節劑의 影響

黃芩의 器內 大量增殖을 위하여 NAA, 2,4-D, IAA를 각각 濃度별로 處理한 MS培地에서 幼葉切片을 培養하여 캘러스 形成率을 調査한 結果는 표1과 같다.

培養 1週日이 경과되면서부터 置床葉이 약간 갈

Table 1. Effect of plant growth regulators on MS medium on callus induction from leaf tissue of *Scutellaria baicalensis* Georgi cultured for 8 weeks.

Plant growth regulators (mg / ℓ )		No. of explants	Callus induction	
			No.	%
NAA	0.5	30	14	46.6
	1.0	40	15	37.5
	3.0	40	9	22.5
2,4-D	0.5	36	10	27.7
	1.0	40	7	17.5
	3.0	38	5	13.0
IAA	0.5	38	5	13.0
	1.0	38	6	15.7
	3.0	40	5	12.5

캘러스 形成에 미치는 NAA 效果는 0.5mg / ℓ 의 處理區에서 46.6%로 캘러스 誘起率이 가장 높았으며 이보다 높은 濃度에서는 캘러스 誘起率이 떨어짐을 알 수 있었다. 2,4-D의 경우도 0.5mg / ℓ 첨가 배지에서 양호했으며 농도가 높아질수록 캘러스 유기율은 낮아졌다. IAA의 效果는 1.0mg / ℓ 의 處理區가 良好했으나 NAA 나 2,4-D에 비해 13-16%의 낮은 캘러스 形成率을 나타내었다. (Table. 1)

또한 植物生長調節劑의 混合添加가 캘러스 誘起에 미치는 效果를 알기 위해 單獨處理에서 良好한 成績을 보였던 NAA, 2,4-D 각각 0.5, 1.0mg / ℓ 에 zeatin 0.5mg / ℓ 를 混合添加하여 얻은 結果는 표2와 같이 NAA, 2,4-D를 單獨處理한것 보다 캘러스 誘起率이 월등히 좋았다. 또한 단독 처리에서도 캘러스 유기율이 좋았던 NAA 處理區가 2,4-D 處理區보다 混合添加시에도 그 結果가 좋았음을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

칼란코에의 줄기 切片으로부터 캘러스 形成은 IAA와 BAP의 混合添加시 良好하다고 보고하였으며<sup>16)</sup> 상치의 葉組織으로부터 캘러스 形成에 있어 picloram 0.1mg / ℓ, NAA 2mg / ℓ, kinetin 0.5mg / ℓ 가 添加된 培地에서 良好하였다<sup>14)</sup>.

이러한 結果로 볼때 黃芩의 葉組織으로부터 캘러스 誘起에 미치는 植物生長調節劑의 影響은 옥신의 單獨處理보다 사이토키닌과의 混合處理가 보다 좋은 것으로 생각된다. 그러나 밀 조광 品種의 幼葉으로부터 캘러스를 誘起하는데 있어서 2,4-D를 單獨處理했을 때가 kinetin, BA와 混合處理했을 때 보다 좋았다고 보고했으며 植物體 再分化에는 NAA 0.05mg / ℓ 와 BA 0.5mg / ℓ 에서 良好하였다고 하였다<sup>5)</sup>. 또한 배추의 배측培養에서 kine-

Table 2. Effect of plant growth regulators on callus induction from leaf tissue of *Scutellaria baicalensis* cultured for 8 weeks on MS medium.

Plant growth regulators (mg / ℓ )		No. of explants	Callus induction		
			No.	%	
NAA	2,4-D	Zeatin			
0.5		0.5	38	25	65.7
1.0		0.5	40	20	50.0
	0.5	0.5	40	19	47.5
	1.0	0.5	40	18	45.0

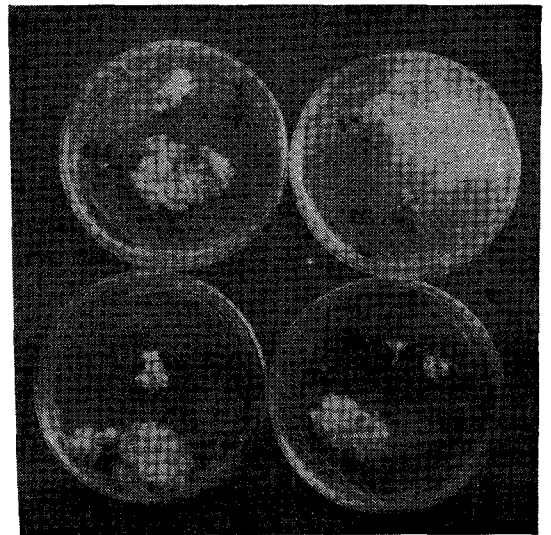


Fig. 2. Callus formation from leaf tissue cultured for 8 weeks on MS medium supplemented with 0.5mg / ℓ NAA plus 0.5mg / ℓ zeatin.

tin 0.1, 2.5mg / ℓ 에서 IBA나 NAA를 각각 10mg / ℓ 混合處理한 培地에서 캘러스 形成率이 좋았다는 보고가 있다<sup>4)</sup> Abe 등<sup>1)</sup>도 캘러스 形成은 品種間의 差異가 크며 또한 培地 組成에 따라 다르다고 하였다.

이러한 研究 報告들로 미루어 볼때 培養 組織으로부터 캘러스 形成은 植物의 種類와 培養부위에 따라 要求되는 植物生長調節劑의 差가 큰 것으로 생각된다.

## 2. 植物體 再分化에 미치는 植物生長調節劑의 影響

캘러스로부터 植物體 再分化를 위하여 MS 培地에 BAP, ABA, zeatin을 각각 0.01-5.0mg / ℓ 處理한 結果는 表3과 같다.

BAP의 경우는 0.01-3.0mg / ℓ 까지 植物體 再分化가 良好하게 일어났으며 培養 8週가 經過되면서부터 부분적으로 뿌리가 觀察되었다. ABA의 경우는 0.1과 3.0mg / ℓ 에서 약간의 結果를 얻었으며 植物生長調節劑의 濃도가 높거나(5.0mg / ℓ) 낮을 때(0.01mg / ℓ)는 結果를 얻을수가 없었다. ABA 역시 培養後 8週가 經過되면서부터 부분적으로 뿌

Table 3. Effect of plant growth regulators in MS medium on plant regeneration from callus cultured for 10 weeks in *Scutellaria baicalensis*.

Plant growth regulators	Shoot formation (mg / ℓ)	Root formation	
		4 weeks	10 weeks
BAP	0.01	+	++
	0.1	++	++
	1.0	++	+++
	3.0	++	++
	5.0	+	+
ABA	0.01	+	+
	0.1	++	++
	1.0	+	++
	3.0	-	+
	5.0	-	+
Zeatin	0.01	+	++
	0.1	+++	+++
	1.0	+++	+++
	3.0	++	+++
	5.0	+	+
Hormone free		++	+++

- : no response, + : slight, ++ : moderate, +++ : good

리가 觀察되었다.

Zeatin의 경우는 0.01-5.0mg / ℓ 의 모든 處理區에서 植物體 再分化를 얻을 수 있었으며 그 중 0.1-3.0mg / ℓ 의 處理區에서 매우 良好한 結果를 얻었다. 또한 新초가 形成된 後 2週가 經過되면서 뿌리가 形成되었는데 이는 BAP나 ABA의 경우보다 뿌리의 分化가 빠름을 볼 수 있었다. Hormone free의 處理區에서도 植物體 再分化는 좋았으나 다른 處理區에 비해 植物體가 아주 孱弱하였다.

이러한 結果들로 보아 植物體 再分化에 미치는 植物生長調節劑의 單獨處理에서는 BAP 1.0mg / ℓ 와 zeatin 0.1-3.0mg / ℓ 에서 가장 좋은 結果를 얻을 수 있었다. 또한 培養期間이 8週를 經過하면서 뿌리가 形成되었는데 이는 옥신류의 添加가 없어도 일정기간이 지나면서부터는 뿌리가 形成된다는 것을 알 수 있었다. 특히 zeatin의 경우 新초가 形成된 後 2週가 지나면서 뿌리가 發生되었는데 이는 黃芩의 경우 zeatin과 密接한 關係가 있음을 짐작케 한다.

植物生長調節劑의 混合添加는 植物體 再分化에 어떠한 影響을 미치는지를 알기위해 單獨處理에서 良好한 成績을 얻은 BAP 와 zeatin 0.1, 1.0mg / ℓ 에 NAA 0.5, 1.0mg / ℓ 를 각각 混合處理하여 實驗한 結果는 表4와 같다.

混合處理 역시 zeatin이 添加된 處理區에서 良好하였으며 zeatin 1.0mg / ℓ 에 NAA 0.5mg / ℓ 를 混合處理한 區에서 좋은 結果를 보였다. BAP의 경우도 1.0mg / ℓ 에 NAA 0.5mg / ℓ 를 混合한 處理區에서 좋은 結果를 보인것으로 보아 植物體 再分化에 미치는 植物生長調節劑의 種類와 濃도는

Table 4. Effect of plant growth regulators in MS medium on plant regeneration from callus cultured for 10 weeks in *Scutellaria baicalensis*.

Plant growth regulators	Shoot formation (mg / ℓ)	Root formation	
		4 weeks	10 weeks
BAP 0.1+NAA 0.5	+	++	++
BAP 0.1+NAA 1.0	++	++	++
BAP 1.0+NAA 0.5	++	+++	++
BAP 1.0+NAA 1.0	+	++	++
ZEA 0.1+NAA 0.5	++	++	++
ZEA 0.1+NAA 1.0	++	++	++
ZEA 1.0+NAA 0.5	+++	+++	+++
ZEA 1.0+NAA 1.0	++	+++	+++

+ : slight, ++ : moderate, +++ : good



Fig 3. Shoot formation from callus subcultured for 6 weeks on MS medium supplemented with 1.0mg/ℓ Zeatin plus 0.5mg/ℓ NAA.

zeatin, BAP 각각 1.0mg/ℓ 에 NAA 0.5mg/ℓ 가 적격임을 알 수 있었다 (Fig. 3)

그러나 zeatin 과 BAP의 농도보다 NAA의 농도가 높을 때에는 培養期間이 길어짐에 關係없이 植物體 分化率은 向上되지 않았으나 위의 適定 濃度에서는 培養期間이 持續되면서 分化率도 向上된다는 것을 알았다.

특히 混合處理區에서는 植物體分化에서 新초와 新근이 동시에 分化되어 新근 發生을 위해 培地組成을 달리할 필요가 없었다.

### 3. 캘러스 및 再分化 植物體內 Flavonoid系 物質의 定性分析

黃芩의 組織培養에 의한 캘러스 및 再分化 植物體內의 Flavonoid系 有無를 檢定한 結果는 (Fig. 4)와 같다.

程色反應 結果 flavonoid는 pink 색으로 反應을 나타냈으며 wogonin은 회록색에서 자갈색으로, bacalin은 등적색의 沈澱을 형성하는 캘러스內의 藥效成分은 陽性反應을 나타냈다. Baicalin의 存在를 TLC法에 의해 비교한 結果는 RF值 0.39의 同一 spot가 觀察되었다(Fig. 5).

이는 상록(*Phytolaccae radix*)의 組織培養에 의한 callus 內의 藥效成分이 TLC法에 의해 觀察되었고 자소 葉의 callus 增殖을 통한 精油生成도 확인되었다.<sup>13)</sup> 신<sup>14)</sup>에 의하면 光線이 紫蘇의 callus生長은 억제시키나 callus 단위중량에 대한 精油生成率은 增加시킨다는 것을 밝혀 callus의 增殖과 精油生成을 동시에 增加시킬 目的으로 callus를 暗所

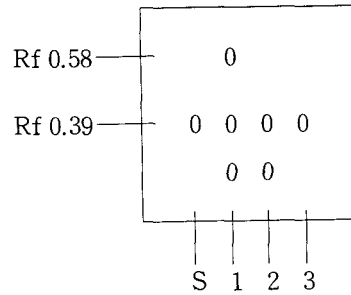


Fig 4. Thin layer chromatogram of baicalin components in callus

- S : Standard(WAKO 社)
- 1 : Callus의 MEOH 可溶部
- 2 : Callus의 EtOH 可溶部
- 3 : Callus의 H<sub>2</sub>O 可溶部

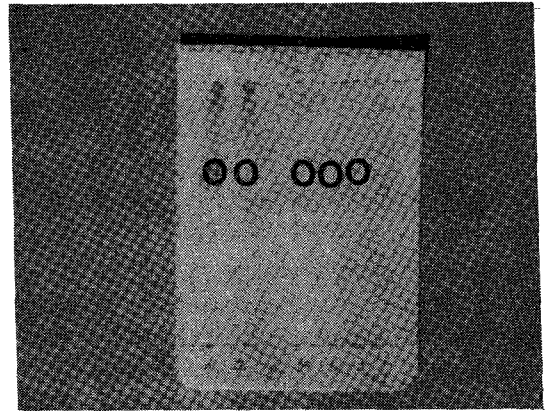


Fig. 5. Analysis of baicalin by means of TLC (1. natural root, 2. natural leaf, 3. cultured root, 4. cultured leaf, S. standard)

에서 3 週培養 後 1週間 光線照射하는 Two stage culture system에 培養한 callus가 더 큰 重量增加를 보였으며 배양시 照射되는 光線의 種類에 따라 2次代謝產物의 組成이 變化한다는 것을 察안, ture light lamp를 사용하여 精油의 成分을 增加시켰다. 본 실험에서도 callus內의 藥效成分이 확인되었으나 앞으로 callus 內의 藥效成分이 定量的으로 얼마나 含有되어 있는지, callus內의 藥效成分의 增進을 위한 培養條件등에 關係는 持續적으로 研究되어야 할 것이다.

## 摘 要

黃芩(*Scutellaria baicalensis*)의 葉組織을 培養하여 器內 種苗를 大量增殖시키고 誘起된 callus 內의 藥效成分을 檢定하여 2次 產物의 效率의인 利用을 도모하기 위하여 植物生長調節劑가 캘러스유기 및 기관분화에 미치는 영향을 調査하였다.

葉으로부터 캘러스 誘起는 NAA 0.5mg/ℓ의 單獨處理에서 良好했으며, 混合處理에서는 NAA 0.5mg/ℓ와 zeatin 0.5mg/ℓ의 處理區에서 良好하였다. 캘러스로부터 植物體 再分화를 위해서는 BAP 1.0mg/ℓ + NAA 0.5mg/ℓ와 zeatin 1.0mg/ℓ + NAA 0.5, 1.0mg/L 混合處理區에서 가장 效果의이었다.

2次 產物의 利用을 위해 캘러스를 TLC法에 의해 成分分析한 結果 baicalin의 存在를 확인하였다.

## 引用文獻

1. Abe, T. and Y. Futsuhara. 1986. Genotypic variability for callus formation and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. App. Genet.* 72 : 3-10
2. 백기엽, 정중구, 이왕영, 이충우, 1987. 배추의 組織培養으로부터 캘러스 形成과 生長에 미치는 生長調節劑 및 몇가지 添加物質의 效果. 韓國植物組織培養學會誌. 14(2) : 75-86.
3. Hara Y., T. Morimoto and Y. Fujita 1987. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Reports.* 6 : 8-11
4. Heyenga A. G., J. A. Lucas and P. M. Dewick 1990. Production of tumorinhibitory lignans in callus cultures of *Podophyllum hexandrum*. *Plant Cell Rep* 9:382-385.
5. 張琦源, 文康洙, 1989. 밀(*Triticum aestivum* L.)의 葉으로부터 캘러스의 誘起 및 植物體再分化. 韓國植物組織培養學會誌. 16(1) : 49-54.
6. 高本敬次郎 等. 1980. 和漢藥物學, 南山堂, 東京
7. 金圭元 等. 1990. 植物組織培養, 技術. PP. 14-23. 鄉文社, 서울
8. 金龍煥, 金虎一, 金萬壽, 韓昶烈. 1986. 상처의 캘러스 誘起, 植物體再分化 및 懸獨培養에 의한 器官分化. 韓國植物組織培養學會誌. 13(1) : 23-28
9. 李康燮, 蘇雄永. 1989. 칼란코에 줄기 切片의 器官分化에 미치는 生長調節物質의 影響. 韓國植物組織培養學會誌. 16(1) : 33-4016.
10. 柳庚洙 等. 1975. 한방용약에 관한 생약학적 조사연구(I). 韓國生藥學會誌. 6(4) : 219-250.
11. 李重浩, 韓昶烈, 李炳基, 李萬相. 1981. 마늘의 callus 誘起, 植物體再分化 및 callus의 利用에 관한 研究. 圓大農大論文. 4 : 3-32
12. 朴仁鉉 等. 1989. 藥草植物栽培. p. 226-227. 先進文化社, 서울.
13. 신순희, 1985. 紫蘇의 組織培養에 관한 研究 (I). 韓國生藥學會誌. 16(4) : 210-213
14. 신순희 1986. 紫蘇의 組織培養에 관한 研究 (II). 韓國生藥學會誌. 17(1) : 7-11
15. Staba, E. J. 1980. *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*, p. 134 CRC Press.
16. Staba, E. J. 1980. *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*, P. 182, CRC Press.
17. Tabata M. 1977. Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures. In *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application*, ed. W. Barz, E. Reinhard and M.H.Zenk. Springer-Verlag. pp3-5
18. 梁敏錫, 崔相旭. 1992. 培養中인 바위솔의 成分變化. *Korean J. Plant Tissue Culture* Vol. 19, No. 4, 209-212