

## 지황의 캘러스 유도과 현탁배양에서 체세포배 발생

채영암, 박상언\*

### Callus Induction and Somatic Embryogenesis in Suspension Culture of *Rehmannia glutinosa*.

Young-Am Chae and Sang-Un Park\*

**ABSTRACT** : This study was carried out to investigate the appropriate medium and constitution of growth regulators for somatic embryogenesis for development of rapid mass propagation system via somatic embryogenesis in *Rehmannia glutinosa*.

Embryogenic callus formation from leaf explant was more effective when 4mg / ℓ BA with 0.5mg / ℓ NAA than that of treated with only auxins or cytokinins. LS medium was suitable for embryogenic callus formation. LS medium with 4mg / ℓ BA and 0.5mg / ℓ NAA was effective for the maintenance and proliferation of embryogenic callus. In suspension culture, addition of 1mg / ℓ BA to LS medium was proper for somatic embryogenesis. The highest rate of shoot development form cotyledon stage embryo was obtained in 1 / 2 LS medium and plantlet survived by 75% after transplanted to the soil. after 4 weeks.

#### 序 言

지황(*Rehmannia glutinosa* Liboschitz)은 현삼과에 속하는 다년생 초본식물로 우리나라에서는 오래전부터 뿌리를 한약재로 이용하였다. 지황은 iridoid, catalpol, leonuride 등과 당류인 stachyose, raffinose, sucrose, mannitol, amino acid 등을 함유(Oshio 등, 1989; Hasegawa 등, 1982)하고 있으며 한방에서는 補血, 強壯, 解熱, 緩下 등의 처방에 사용된다(한 등, 1992). 지황의 번식은 분근(分根) 또는 어린뿌리로 이루어지기 때문에 번식력이 약하고, 번식용 뿌리(종근)를 저장하는 동안 병원균에 의한 오염 등 많은 어려움이 집약 재배의 장애요인으로 등장하고 있다. 지황 염색 조직에서 multiple shoot 유기를 통한 대량증식(Matsumoto 등, 1986)과 莖頂배양에 의한 무병주 생산에 관한 연구(Nishioka, 1988)가 보고되었지만 대량번식의 체계는 확립하지 못하였다. 그러므

로 무병 상태이면서 지황의 번식율을 높이기 위한 인공종자 생산의 기초연구를 수행하기 위해 현탁 배양을 통한 체세포배 생산 가능성을 알아보고자 하였다.

#### 材料 및 方法

##### 1. Callus 유도과 embryogenic callus 형성

막 전개한 잎조직을 채취하여 0.25% sodium hypochlorite에 15분 동안 흔들여 표면살균 후 1cm × 1cm 크기로 절단하여 auxin과 cytokinin이 처리된 Mruashige-Skoog(MS) 기본배지(agar 0.8%, sucrose 3%)에 치상하여 8주간 배양하였다. 배양조건은 형광등을 광원으로 사용하여 1000lux, 16시간 일장과 25℃에서 배양하였다. 유도된 embryogenic callus를 유지하기 위해 BA와 NAA가 처리된 MS 기본배지(agar 0.8%, sucrose 3%)에 계대배양 하였다.

\* 서울대학교 농학과-농업생물신소재연구센터(Agronomy Department and Research Center for New Biomaterials in Agriculture of Seoul National University, Suwon 441-744, Korea) < '93. 7. 12 接受 >

## 結果 및 考察

### 2. 현탁배양에 의한 체세포배 생산

Embryogenic callus를 잘게 부수어 60mesh의 체를 통과시켜 현탁배양 시료로 사용하였고, 100ml 삼각플라스크에 배양액(auxin과 cytokinin이 처리된 LS 기본배지) 20ml과 시료 3ml(약 0.01g)씩 가하여 배양하였다. 교반속도는 100rpm으로 하였고, 배양조건은 형광등을 광원으로 사용하여 1000lux, 16시간 일장과 25℃에서 배양하였다. 7일 간격으로 새로운 배지로 계대배양하였다.

### 3. 식물체 재생 및 이식

현탁배양에서 형성된 체세포배를 식물생장조절제를 첨가하지 않은 LS기본배지에 치상하여 4주간 배양하여 식물체를 재생시켰고 재생된 식물체를 포트에 이식하였다.

### 1. Embryogenic callus 유도 및 유지

Embryogenic callus 유도에 관한 결과는 표 1, 2, 3에 나타내었다. 표 1에서 보면 auxin류를 단독 처리하였을 경우 callus 형성이 불량하고, 기간도 8주 정도로 길었다. IAA처리는 callus 형성에 효과가 없었으며, NAA와 2, 4-D 처리에서는 각 농도 별로 약간의 callus가 형성되었지만 callus양이 0.5g 미만으로 소량이었고 non-embryogenic한 형태였다. Matsumoto 등(1986)은 2, 4-D와 NAA처리에서 캘러스 유도가 잘 되었고, IAA처리에서는 효과가 없었다고 하였다.

Cytokinin류를 단독 처리하였을 경우는 표 2와 같이 auxin류 단독처리 처럼 callus 형성이 불량하

Table 1. Effect of auxins on callus induction from leaf segments of *Rehmannia glutinosa* after 8 weeks.

Auxins (mg/l)	Fresh weight (g/test tube)	Callus Induction rate (%)	Frequency of embryogenic callus(%)	
IAA	0.5	-	-	
	1.0	-	-	
	2.0	-	-	
	4.0	0.16±0.04	25	5
NAA	0.5	0.15±0.03	20	5
	1.0	0.37±0.07	40	5
	2.0	0.28±0.06	35	5
	4.0	0.13±0.03	20	5
2,4-D	0.5	0.14±0.05	30	5
	1.0	0.31±0.09	45	5
	2.0	0.15±0.04	25	5
	4.0	0.10±0.03	20	5

- : Not Callusing

Table 2. Effect of cytokinins on callus induction from leaf segments of *Rehmannia glutinosa* after 8 weeks.

Cytokinin (mg/l)	Fresh weight (g/test tube)	Callus Induction rate (%)	Frequency of embryogenic callus(%)	
BA	0.5	0.48±0.14	20	45
	1.0	1.34±0.39	45	55
	2.0	0.82±0.23	30	50
	4.0	0.64±0.18	15	55
Kinetin	0.5	0.39±0.12	15	30
	1.0	0.46±0.16	35	45
	2.0	0.29±0.09	20	50
	4.0	0.15±0.04	10	40

Table 3. Effect of combination of BA, Kinetin and NAA on callus induction from leaf segments of *Rehmannia glutinosa* after 6 weeks.

Groth regulator (mg /l)	Fresh weight (g /test tube)	Callus Induction rate (%)	Frequency of embryogenic callus(%)
BA 1+NAA 0.5	1.37±0.32	75	45
	1	1.55±0.39	80
BA 2+NAA 0.5	1.94±0.42	80	50
	1	2.13±0.45	85
BA 4+NAA 0.5	2.33±0.58	90	60
	1	2.54±0.51	90
Kinetin 1+NAA 0.5	0.95±0.16	60	40
	1	1.38±0.21	75
Kinetin 2+NAA 0.5	1.40±0.27	70	45
	1	1.68±0.22	80
Kinetin 4+NAA 0.5	1.69±0.46	80	50
	1	1.74±0.49	70

Table 4. Effect of media with 4mg/l BA and 0.5mg/l NAA on callus induction from leaf segments of *Rehmannia glutinosa* after 6 weeks.

Media	Fresh weight (g /test tube)	Callus Induction rate (%)	Frequency of embryogenic callus(%)
B5(Gambrog et al)	1.48±0.41	75	45
LS(Linsmaier-Skoog)	2.45±0.63	90	65
MS(Murashige-Skoog)	2.33±0.58	90	60
White	0.86±0.26	65	35

고, 기간도 8주정도로 길었다. BA 1-4mg /l처리에서 embryogenic한 형태를 취하였으나 약 1g 정도의 소량에 callus가 형성되었다. Kinetin 단독처리는 callus 형성에 별다른 효과가 없었다. 그러나 embryogenic callus의 빈도는 옥신류에서 보다 상대적으로 높았다.

표 3에서 보면 BA와 NAA 혼합처리에서 전반적으로 callus 형성이 양호하고, 기간은 6주 정도였다. BA 4mg /l과 NAA 0.5mg /l 처리에서 2g 이상의 callus가 형성되었고 embryogenic한 형태를 취하였다. Kinetin과 NAA 혼합처리에서는 BA와 NAA 혼합처리보다 그 효과가 떨어졌다.

Murashige(1965), Rao(1973), Bengochea(1986) 등은 shoot의 유도에 있어서는 cytokinin / auxin 비율이 상대적으로 높은 것이 좋고 캘러스의 유도는 auxin의 함량이 cytokinin보다 상대적으로 많은 것에서 유리하다고 하였지만 지황은 이 경우와 다른 경향을 보였다. 배지 종류별로 BA 4mg /l와 NAA 0.5mg /l 처리하여 캘러스를 유도한 결과는 표 4에서 처럼 MS배지보다 LS배지가 embryogenic 캘러스 유도와 유도량이 가장 많

았다. B5배지와 White 배지는 embryogenic 캘러스 유도와 유도된 양이 적은 편이었다. 따라서 embryogenic callus 유도는 MS배지 보다 LS배지가 더 적합하다고 판단되었다.

표 5는 유도된 embryogenic callus를 유지하기

Table 5. Effect of BA and NAA on embryogenic callus frequency from *Rehmannia glutinosa* callus on LS medium after 4 weeks.

Growth regulator (mg /l)	Fresh weight (g /test tube)	Frequency of embryogenic callus(%)
BA 1	0.59±0.10	50
BA 1+NAA 0.5	1.73±0.31	55
	1	1.89±0.37
BA 2	1.48±0.12	50
BA 2+NAA 0.5	2.06±0.37	55
	1	2.21±0.42
BA 4	0.61±0.17	50
BA 4+NAA 0.5	2.42±0.53	60
	1	2.57±0.49

Table 6. Effect of subcultures on frequency of embryogenic callus in *Rehmannia glutinosa* on LS medium containing 4 mg/l BA and 0.5mg/l NAA.

Subcultures (every 4 wks)	Fresh weight (g/test tube)	Frequency of embryogenic callus(%)
1 st	2.42±0.42	60
2 nd	2.67±0.39	55
3 rd	2.79±0.43	50
4 th	2.98±0.53	45
5 th	3.28±0.42	40

위해 BA와 NAA를 처리조합에 계대배양한 결과이다. BA단독 처리는 callus 생육이 NAA와 혼합 처리한 조합보다 저조하였으며, NAA 1mg/l이 처리된 조합은 non-embryogenic한 형태였다. Embryogenic callus 유도과 마찬가지로 유지에서도 BA 4mg/l과 NAA 0.5mg/l 처리에서 callus 생장이 왕성하였고 embryogenic한 형태를 취하였다. 따라서 embryogenic callus 유지도 유도와 동일한 조합이 가장 적합하다고 판단되었다.

Embryogenic 캘러스를 BA 4mg/l과 NAA 0.5mg/l를 처리한 LS배지에 4주 간격으로 계대배양한 결과는 표 6과 같다. 계대배양 회수가 증가할수록 캘러스 성장량은 조금씩 증가하였지만 embryogenic 캘러스 빈도는 감소되는 경향을 보였다. 이 결과로 보아 가능하면 무균 식물체를 유지하면서 항상 신선한 캘러스를 유도하여 사용하는 것이 바람직하다고 생각된다.

## 2. 현탁배양에 의한 체세포배의 생산

Embryogenic callus를 잘게 부수어 60mesh의 체를 통과시켜 유리된 세포를 현탁배양한 결과는 표 7과 같다. BA 1mg/l 처리에서 체세포배 형성이 가장 왕성하였다. BA 각 농도와 NAA 0.1mg/l 혼합처리와 BA 2mg/l에서 체세포배가 제한적으로 형성되었고, 그 외의 조합에서는 체세포배가 형성되지 않았다. 표 8을 보면 Kinetin 1mg/l와 2mg/l처리 그리고 kinetin 2mg/l와 4mg/l에 NAA 0.1mg/l을 혼합처리하였을 때 체세포배가 제한적으로 형성되었고, 그외의 조합에서는 체세포배가 형성되지 않았다. 현탁배양에서 체세포배 형성은 kinetin보다 BA가 효과적이었으며 NAA와 혼합처리에서는 체세포배 형성이 억제되는 경향을 보였다. 그림 1은 액체현탁배양에서 체세포배 형성과정과 shoot로의 발육과정을 단

Table 7. Effect of BA and NAA on embryogenesis after 3 weeks in suspension culture of *Rehmannia glutinosa* callus.

Plant growth regulator (mg/l)		Embryogenesis*
BA	1	++
BA	1 + NAA 0.1	+
	0.5	-
	1	-
BA	2	+
BA	2 + NAA 0.1	+
	0.5	-
	1	-
BA	4	-
BA	4 + NAA 0.1	+
	0.5	-
	1	-

\* - : poor, + : fair, ++ : good

Table 8. Effect of Kinetin and NAA on embryogenesis after 3 weeks in suspension culture of *Rehmannia glutinosa* callus.

Plant growth regulator (mg/l)		Embryogenesis*
Kinetin	1	+
Kinetin	1 + NAA 0.1	-
	0.5	-
	1	-
Kinetin	2	+
Kinetin	2 + NAA 0.1	+
	0.5	-
	1	-
Kinetin	4	-
Kinetin	4 + NAA 0.1	+
	0.5	-
	1	-

\* - : poor, + : fair

계별로 보여주고 있다. 체세포배는 접합자배와 형태적으로 대단히 유사하며 발생초기부터 줄기와 뿌리로 분화될 부위가 결정되어 있는 양극성을 갖는다. 체세포배의 발달과정을 살펴보면 globular-heart-torpedo-germination의 단계를 거치면서 체세포배가 형성되었다. 체세포배를 크게 발달시킬수록 발아능력이나 활력도가 증가한다고 보고되었으므로(전 등, 1986; Kitto & Jules, 1985) 체세

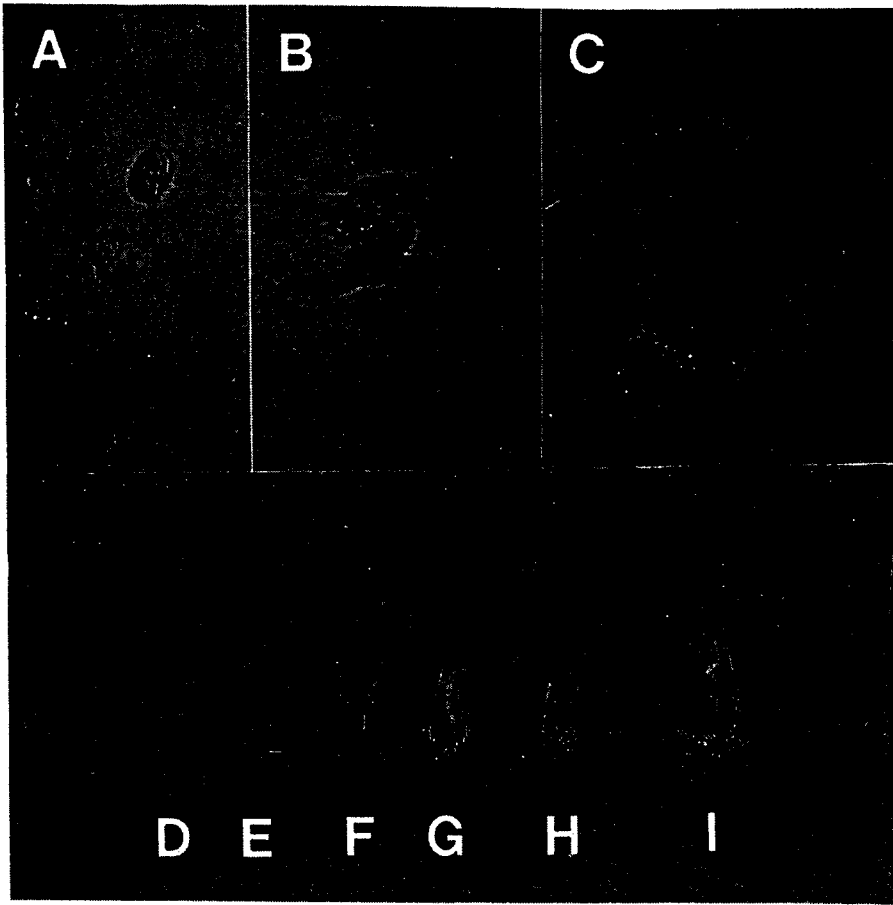


Fig. 1. Developmental stages of *Rehmannia glutinosa* somatic embryos during suspension culture. A) Callus cells after sieving; B) Dividing cells after 5 days culture; C) Cell clusters after 10 days culture; D) Globular stage; E) Heart stage; F) Early torpedo stage; G) Torpedo stage; H) Cotyledonary stage; I) Shoot

포배 발달이 왕성한 조건을 찾는 실험이 더 보충되어야겠다.

### 3. 식물체 분화 및 이식

식물체 분화는 cotyledonary stage의 체세포배를 식물 성장조절제가 처리되지 않은 LS기본배지의 농도를 조절하여 치상하였으며, 배양 4주 후 결과는 표 9와 같다. 체세포배에서 식물체 발육은 LS기본배지보다 오히려 영양분을 반으로 줄인 1/2 LS배지가 더 좋았다. 1/4, 1/8LS배지에서는 shoot 발육이 저조하였다. 그림 2는 체세포배를 1/2 LS배지에 치상하여 4주후 식물체로 발달한

것이다. 기내 분화 식물체를 온실로 옮겨 버브큐라이트에 이식한 결과 75%의 토양착륙을 보였다.

Table 9. Effect of medium strength on somatic embryo germination in *Rehmannia glutinosa* aft% 4 weeks.

Medium strength	Rate of germination (%)	Shoot length (cm)
1 LS	90	4.3±0.8
1/2 LS	90	5.4±1.2
1/4 LS	75	3.7±0.5
1/8 LS	60	2.8±0.3

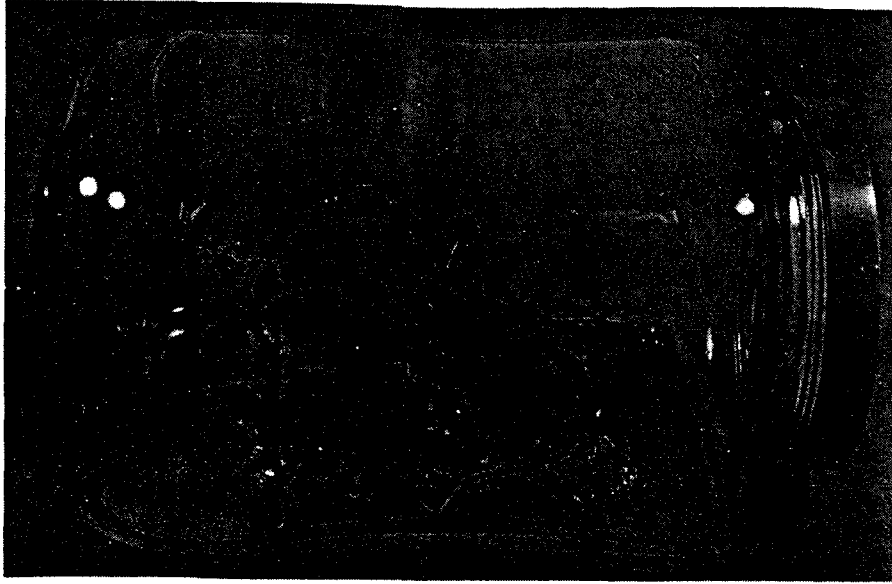


Fig. 2. Regenerated plantlets from *Rehmannia glutinosa* somatic embryos.

## 摘 要

1. 지황의 잎 조직에서 캘러스 유도는 옥신류와 사이토키닌류의 단독처리보다는 BA와 NAA를 혼합처리하는 경우에 캘러스 유도가 잘 되었다.
2. 옥신류의 embryogenic 캘러스 유도는 5% 정도로 극히 낮았으나 사이토키닌류를 처리한 경우는 40~55%로 높아졌다.
3. BA 4mg/1 NAA 0.5mg/1 처리에서 embryogenic 캘러스 유도가 가장 양호하였다.
4. 배지 종류별로는 Linsmaier-Skoog배지가 embryogenic 캘러스 유도와 유도량이 가장 많았다.
5. Embryogenic 캘러스 유지도 BA 4mg/1과 NAA 0.5mg/1 처리에서 가장 효과적이었다.
6. 계대배양 회수가 증가할수록 캘러스 성장량은 증가하였지만 embryogenic 캘러스 빈도는 감소되는 경향을 보였다.
7. 현탁배양시 체세포배 생산은 BA 1mg/1처리에서 가장 많았다.
8. 체세포배에서 식물체 분화는 식물 성장조절제가 처리되지 않은 1/2 LS기본배지에서 가장 잘 되었으며 토양활착율은 75% 정도이었다.

## 引用文獻

1. Bengochea, TJH Dodds. 1986. In plant protoplast(ed. WJ Brammar & M Edidin) Chapman & Hall Ltd, New York. P28.
2. 한대석. 1992. '지황' 생약학(四版). 동명사. P. 229-230.
3. Hasegawa T, K Koike, S Takahashi, U Ariyoshi 1982 Constituents of leaves and roots of Kaikei Jio(*Rehmannia glutinosa* Libosch. *formahueichingensis* Hsiao) Shoyakugaku Zasshi. 36 : 1-5.
4. 전재홍, 유장열, 양승균, 이행순, 정혁, 한문희. 1986. 인공종자 생산의 모델 시스템 개발. I. 체세포배의 알진산의 의한 encapsulation. Korean J. Plant Tissue Culture. 13 : 119-128.
5. Kitto SL and Jules J. 1985. Hardening treatments increase survival of synthetically-coated asexual embryo of carrot. J. Amer. Soc. Hort. Sic. 110 : 283-286.
6. Matsumoto M, M Nakano, Y Shoyama, I Nishioka 1986. New vegetative propagation method of *Rehmannia glutinosa*.

- Shoyakugaku Zasshi 40 : 193-197.
7. Murashige T, Nakano R. 1965. Morphogenetic behaviour of tobacco tissue culture and implication of plant senescence. *Amer. J. Bot.* 52 : 819-827.
  8. Nishioka I, 1988. Clonal multiplication of medical plant by tissue culture. *Shoyakugaku Zasshi* 42 : 1-11.
  9. Oshio H, Y Naruse, H Inouye. 1981. Quantitative analysis of iridoid glycosides of *Rehmanniae radix*. *Shoyakugaku Zasshi*. 35 : 291-294.
  10. Rao PS, W Handro, H Harada. 1973. Hormonal control of differentiation of shoots, roots and embryos in leaf and stem cultures of *Petunia inflata* and *Petunia hybrida*. *Physiol. Plant.* 28 : 458-463.