

龍膽의 器內變異株 誘導와 變異株의 Gentiopicroside 含量

성낙술* · 박충현* · 김관수* · 이승택* · 장영희*

In vitro Variant Induction and Its Content of Gentiopicroside of *Gentiana scabra* BUNGE.

Nak-Sul Seong*, Chung-Heon Park*, Kwan-Su Kim*,
Seoung-Tack Lee* and Yeong-Hee Chang*

ABSTRACT : This study was aimed to mutant induction in *Gentiana scabra* BUNGE through the tissue culture techniques and comparison of gentiopicroside content in each mutant plants derived from tissue culture.

In order to induce the mutants of *Gentiana scabra*, seed, apical and lateral bud were soaked in NaN_3 , EMS and MNU solutions and cultured on MS basal medium containing 0.5mg/ℓ NAA, BA. NaN_3 , MNU-treated buds survived about 50% but not survived in EMS treatment. Seed germination rate was extremely low in EMS and MNU treatments but various types of mutant plantlets were obtained by those treatments.

63% of elongated type and 37% of dwarf type were obtained from tissue culture treated by various mutagen. Gentiopicroside contents of regenerated plantlets was analyzed. Root of dwarf type contained more gentiopicroside(1.383%) than that of elongation type (0.083%).

용담(*Gentiana scabra*)은 뿌리에 Gentiopicroside, Gentisin등의 약효성분을 함유하고 있어 한방에서는 고미건위약으로 이용되고 있고 청자색의 꽃은 절화용으로 좋은 가치가 있다. 국내생약 수요의 전량을 야생채취와 수입에 의존하고 있어 '92년에는 46,183 kg을 수입하여 사용하였다. 이러한 유용한 약용식물의 재배화를 위한 번식방법으로 실생번식은 초기 생육이 부진하여 잡초경합이 문제되고 있고 분주법은 증식율이 낮은 문제점이 있다.

따라서 조직배양을 이용한 대량증식기술과 병행하여 기내유용변이주 유도에 관한 시험을 수행하고 얻어

진 변이주에 대한 용담의 지표물질인 Gentiopicroside 함량을 비교하여 얻어진 결과를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

본 시험에 사용한 공시재료는 작물시험장 약용작물 유전자원 보존포장에 식재되어 있는 용담(*Gentiana scabra*)의 엽조직을 배양하여 재생한 기내식물체의 정아, 측아와 종자를 사용하였다.

종자의 소독은 95% Ethanol에 5분간 침지하고 10% Lax 액에 10분간 침적하여 표면 살균하고 멸

* 作物試驗場 特用作物果(Industrial Crop Division, Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea) <95. 1. 10. 接受>

Table 1. The sample weights in different parts used in analysis.

Sample part	Dry weight(mg)
Young callus(After 40 days)	100.3
Aged callus(After 80 days)	100.4
Tall type shoot	10.3
Tall type root	90.1
Dwarf type shoot	13.2
Dwarf type root	72.8

Table 2. Analytical conditions for gentiopicroside in *Gentiana scabra* BUNGE.

Column	TSK - gel ODS - 80TS (TOSOH co. ⑆ 4.6mm×15cm)
Mobile phase	30% MeOH/Water
Detection	UV 247nm
Flow rate	0.7ml/min
Temperature	25℃
Injection volumn	5 μ l

균수로 3회 수세하여 배양하였다.

돌연변이 유기원으로 Sodium azide(NaN_3)는 0.001, 0.002 및 0.003M, EMS는 0.05, 0.1 및 0.2M, MNU (N-methyl-N-nitrosourea)는 1, 2 및 4mM의 용액을 만들어 정아와 측아는 2시간 동안, 종자는 24시간 동안 80rpm의 속도로 진탕처리한 다음 멸균수로 2회 수세한 후 배지에 치상하였다. 배지의 조제는 MS(Murashige and Skoog, 1962)배지의 성분량과 한천을 넣은 후 생장조정물질로 NAA와 BA를 각각 0.5mg/ℓ 첨가하여 pH 5.8로 조정하고 121℃에서 10분간 고압멸균 하였다. 배양 조건은 형광등 1,500 lux광도로 1일 16시간의 광주조건으로 배양실의 온도로 25±1℃로 유지되도록 조절하였다. 배양식물체의

Table 3. Standard calibration of gentiopicroside.

Dilute	Conc.(μ l/ml)	Peak area($\times 10^3$)
$\times 5$	1,260	7,656
$\times 2$	630	3,804
$\times 5$	126	821
$\times 5$	25.2	158

토양순화는 질석과 펄라이트가 1 : 1로 혼합된 상태에서 하였다. 배양체의 Gentiopicroside 함량비교는 기내배양한 용담의 캘러스와 유도된 변이주를 신장형과 위축형으로 구분하고 식물체의 shoot와 root 부분을 나누어서 재료로 사용하였다.(표 1)

분석방법은 High Performance Liquid Chromatography법을 이용하였고 기기의 조건은 표 2와 같다.

시료의 조제는 MeOH를 추출용매로 10분씩 3회 추출하여 최종 부피로 1ml로 만들어 기기에 주입하였고 검량선의 작성은 Gentiopicroside 6.3mg/ml를 MeOH에 희석하여 표준물질로 사용했다.

*얻어진 검량선 회귀식은 $y = 0.001653x - 3.81912$ ($r = 0.999$)** 이다.

結果 및 考察

용담의 유용 돌연변이주를 얻고자 돌연변이 유발 원인으로 널리 이용되고 있는 NaN_3 , EMS 및 MNU용액을 농도별로 엽조직배양에서 재생한 기내식물체의 정아에 2시간 진탕하여 배양하였을 때의 결과는 표 4와 같다. 30일 배양후 생존율은 NaN_3 가 48~54%로 EMS나 MNU 처리보다 높았다.

그러나 배양 60일경에는 EMS 처리 정아는 전혀

Table 4. Effect of mutagen on the apical shoot culture in *Gentiana scabra* BUNGE.

Treatments	30days after cultured				60days after cultured				
	Concentration	No. of cultures apicals	No. of survived shoots	(%)	Plant length(cm)	Shoots(No.).....	Leaves	Roots	Plant growth
NaN_3	0.001M	50	24	(48)	6.2	4.6	9.9	17.8	++++
	0.002M	50	27	(54)	7.9	4.4	7.4	17.5	++
	0.003M	50	27	(54)	7.7	3.8	7.3	12.9	++
EMS	0.05M	50	18	(36)					Died
	0.1M	50	9	(18)					"
	0.2M	50	0	(-)					"
MNU	1mM	50	3	(6)	5.6	4.8	5.6	7.0	+++
	2mM	50	21	(42)	5.9	3.3	7.8	6.3	++
	3mM	50	5	(10)	5.5	2.7	4.4	5.0	++

*-- : moderate, +++ : good, ++++ : excellent

생존하지 못하고 전부 고사하였고, NaN_3 와 MNU 처리 정아는 식물체 생육이 NaN_3 0.001M, MNU 1mM 등 저농도에서 양호한 경향을 보였다. 정아의 경우 돌연변이 유발원 처리에 의해 EMS에서 고사되었고 NaN_3 와 MNU는 생육 차이를 보였을 뿐 변이주 출현은 보이지 않았는데 이는 정아의 생육이 왕성하여 큰 영향이 없었던 것으로 생각된다.

기내배양 식물체의 측아를 각각의 돌연변이 유기물질에 처리하여 배양하였을 때의 결과는 표 5와 같다.

EMS의 경우는 농도에 관계없이 전 조합에서 생존치 못하고 고사하였다. 배양 30일후의 생존율은 전반적으로 MNU 보다 NaN_3 에서 약간 높은 경향이었고, 배양 60일 후의 식물체 생육은 NaN_3 에서 다소 양호하였으며, MNU 처리는 식물체 생육은 저조하였으나 엽색이 황색 또는 진보라색을 띠거나 초장이 아주 작은 위축형 등 변이주의 출현이 있었다.

정아에서는 변이주의 출현을 거의 관찰할 수 없었지만 측아의 경우 MNU 1mM, 4mM 처리에서 엽색 또는 초형의 변이주를 얻을 수 있었다.

수확한 용담의 종자를 돌연변이 유발물질에 하루동안 침적한 후 배양하였을 때 결과는 표 6과 같다.

NaN_3 의 경우 배양 30일 후의 발아율은 32 - 41.4%를 보여 처리 중 가장 높았고 동일한 배지에서 60일까지의 생존 식물체 수와 기내생육도 타처리에 비하여 양호하였다.

그러나 EMS 처리는 0.05M처리에서만 발아율이 4.8%였고 MNU는 1mM에서만 2.8%의 발아율을 보여 극히 저조하였다. EMS와 MNU 처리구는 배양 60일 후의 생존식물체도 극히 적었고 기내생육도 불량하였으나 초형이 크고 작고, 다수의 분지수를 갖는 변이주를 얻을 수 있어 용담의 조직배양에서 변이주 획득에는 효과적이었다.

Table 5. Effect of mutagen on the lateral bud culture in *Gentiana scabra* BUNGE.

Treatments	30days after cultured				60days after cultured				
	Concentration	No. of cultured apicals	No. of survived shoots	(%)	Plant length(cm)	Shoots(No.).....	Leaves	Roots	Plant growth
NaN_3	0.001M	50	24	(48)	1.7	1.7	5.9	0.3	+
	0.002M	50	20	(40)	3.0	2.4	7.2	3.3	++
	0.003M	50	8	(16)	2.3	2.5	7.9	5.0	+
EMS	0.05M	50	0	(-)			Died		
	0.1M	50	0	(-)			"		
	0.2M	50	0	(-)			"		
MNU	1mM	50	15	(30)	1.2	1.0	12.0	0	+
	2mM	50	2	(4)			Died		
	3mM	50	16	(32)	1.4	1.3	6.3	1.8	+

*+ : poor, ++moderate

Table 6. Effect of mutagen on the *in vitro* germination in *Gentiana scabra* BUNGE.

Treatments	30days after cultured			60days after cultured		
	No. of cultured seeds	No. of germinated seeds	(%)	No. of survived plants	Plant growth	
NaN_3	0.001M	220	91	(41.4)	52	+++
	0.002M	200	64	(32.0)	29	++
	0.003M	200	66	(33.0)	48	+++
EMS	0.05M	250	12	(4.8)	2	+
	0.1M	182	0	-	-	
	0.2M	260	0	-	-	
MNU	1mM	250	7	(2.8)	3	+
	2mM	250	0	-	-	
	3mM	200	0	-	-	
Control	200	82	(41.0)	46	+++	

*+ : poor, ++moderate, +++ : excellent

Table 7. The contents of gentiopicroside in *in vitro* samples of *Gentiana scabra*.

Sample part	Conc.(%)
Young callus(After 40 days)	0.038
Aged callus(After 80 days)	0.051
Tall type shoot	0.426
Tall type root	0.883
Dwarf type shoot	2.710
Dwarf type root	1.383

표 2와 같은 HPLC 기기분석 조건으로 표준물질과 각 시료를 분석하여 얻어진 크로마토그램은 그

림 1과 같았으며, gentiopicroside의 retention time은 17.6 분대였다.

용담의 조직배양 식물체를 배양한후 40일과 80일이 경과된 캘러스와 신장형과 위축형의 shoot와 root에 대한 Gentiopicroside 함량을 비교한 결과는 표 7과 같다.

배양체의 Gentiopicroside 함량은 차이를 보여 배양후 40일된 callus 보다는 80일된 callus에서 높았고, Shoot와 root 모두 신장형 보다 위축형이 많이 함유하고 있었는데 위축형의 잎은 2.710%, 뿌리는 1.383%를 가지고 있었다.

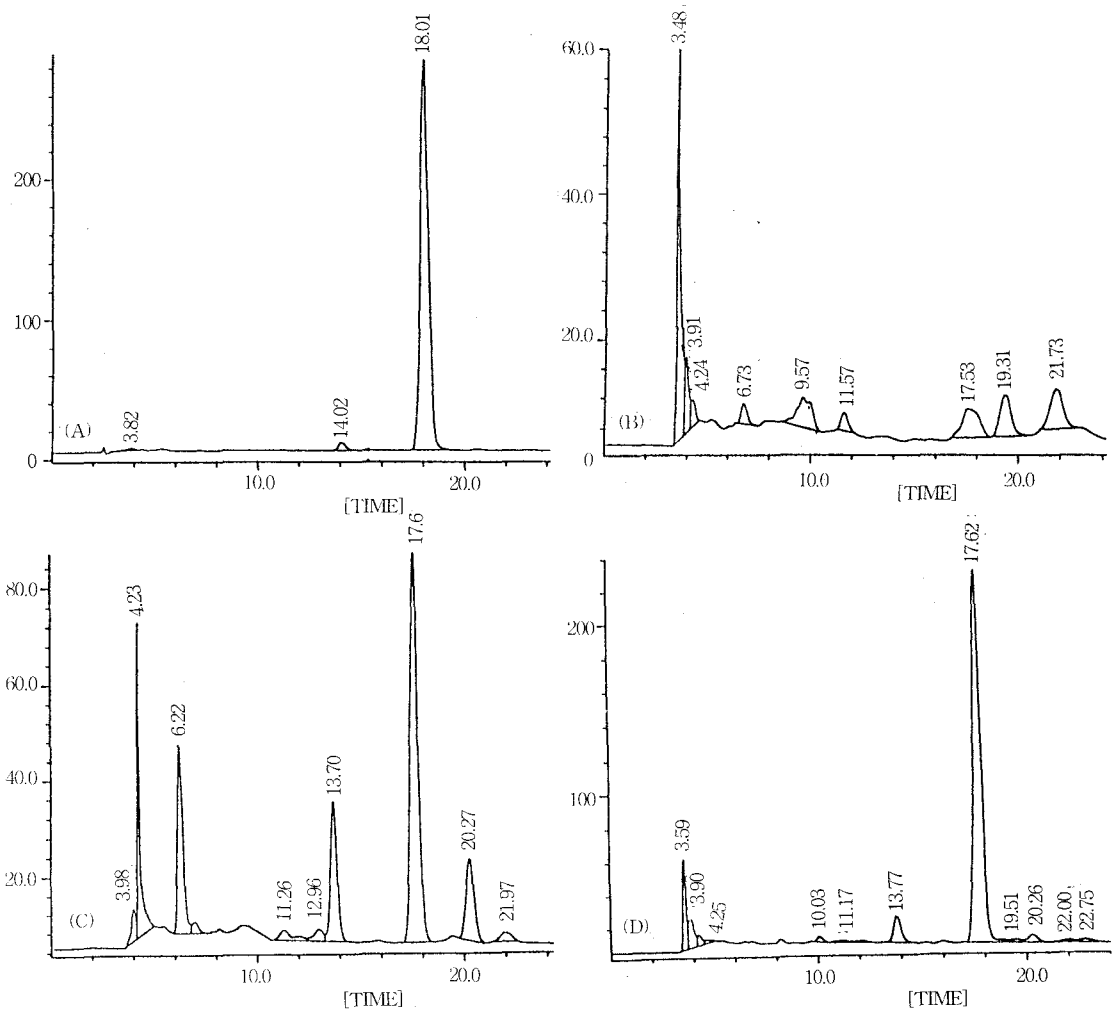


Fig. 1. Chromatogram of HPLC for quantitative analysis of gentiopicroside
(A) : Standard, (B) : Young callus, (C) : Dwarf type shoot, (D) : Dwarf type root

摘要

- 용담의 조직배양기술과 병행하여 기내변이주 유도 및 배양체의 Gentiopicroside 함량을 비교분석한 결과
1. 정아는 NaN_3 0.001M~0.003M에서 48~74%의 생존율을 보였고, EMS 0.05M에서 36% 생존하였으나 생육치 못하고 고사하였으며 MNU 처리 유래 식물체의 기내 생육은 양호하였다.
 2. 측아는 NaN_3 의 농도가 높아질수록 생존율이 감소되었고 EMS는 전부 고사하였으며 MNU에서는 4~32% 생존하였다. 배양 60일경의 기내 생육은 NaN_3 와 MNU 모두 정아처리에 비하여 저조한 경향이였다.
 3. 종자 처리후 발아율은 NaN_3 는 0.001M에서 41.4%인 반면 농도가 높을수록 감소하였고, EMS는 저농도인 0.05에서만, 4.8% MNU도 1mM에만 2.8%를 보였다. 기내생육은 NaN_3 는 무처리구와 비슷한 생육을 보였고 EMS와 MNU 처리구는 생육이 불균일한 변이 발생을 보였다.
 4. 용담 조직배양체의 gentiopicroside 함량비교에서 Callus는 40일 배양한 것이 0.038%, 80일 배양한 것이 0.051% 함유하였고 shoot는 신장형이 0.426%, 위축형이 2.710%였다. 특히 뿌리에서는 신장형이 0.883%, 위축형은 1.383%로 조사되었다.

引用文獻

1. Bajaj, Y. P. S. Furmanowa M, Olszowska O. 1988. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants in agriculture and forestry, vol 4. Medicinal and aromatic plants I 60~103.
2. Bang, J. W. and H. W. Choi. 1991. Somaclonal variation in Tissue Culture of *Scilla scilloides* complex. Abstracts, 3rd ISPMB, Tucson AZ, USA.
3. 방재욱, 이미경, 정성현. 1994. 용담(*Gentiana scabra*)의 절편배양에서 체세포배 발생에 의한 식물체 재분화. 한국식물조직배양학회지 21(4) : 233~237.
4. C, Ham. 1987. Somatic embryogenesis and its

- use in the plant breeding. Korean J. Plant tissue culture 14 : supplement p248.
5. 조문수, 장정자, 권순태. 1992. 큰용담(*Gentiana axillariflora* var. *coreana*)의 기내증식을 위한 절편체 종류별 배양조건 구명. 식물조직 배양 학회지 19(6) : 357~362.
 6. Evans, D.A. 1989. Somaclonal variation : Genetic basis and breeding application. Trends in Genet. 5 : 46~50.
 7. 한창열, 이세영. 1985. 유전공학(농업적 이용) 일조각
 8. 한국 의약품 수출입 협회. 1992. '92 의약품등 수출입 실적표. p591.
 9. Karp, A. 1988. Origins and causes of chromosome instability in plant tissue culture and regeneration. Kew Chromosome Conference III. HMSO : 185~191.
 10. Karp, A. and S. W. J. Bright. 1985. On the causes and origins of somaclonal variation. Oxford survey of plant molecular and cell biology vol (2) B. J. Mefflin : 199~234. Oxford Univ. Press.
 11. 김재길, 신영철. 1992. 약용식물 재배학, 남산당.
 12. 이정일, 이승택, 성낙술, 박래경. 1991. 국내약용작물 연구 현황과 금후 연구방향. 약용식물의 안정생산과 연구방향 : 6~23.
 13. 이정일, 성낙술, 장영선, 채영암, 김길용. 1992. 약초류 조직배양 기술배양 및 이용연구 농촌진흥청 특정연구 보고서 : 1~53.
 14. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15 : 473~497.
 15. Nishioka. I. 1988. Clonal multiplication of medicinal plant by tissue culture. Shoyakugaku Zasshi 42(1) : 1~11.
 16. 농림수산부. 1992. '92 특용작물 생산실적.
 17. 성낙술, 박충현, 이승택, 김성민. 1993. 용담(*Gentiana scabra* Bunge.)의 藥肉 및 줄기배양에 의한 식물체 재분화와 増殖. 한약작지 1(2) : 129~136.