

有用 2次 代謝産物の 生産을 위한 藥用植物의 増殖과 形質轉換 I. 器内培養을 통한 병풀 葉柄의 植物體 再分化

金光秀 · 白允雄 · 高庚珉 · 黃聲振 · 任炯卓 · 黃昶*

全南大學校 自然科學大學 生物學科

병풀(*Centella asiatica*)의 엽병 조직절편에서 유도된 배발생 캘러스로부터 체세포배 발생에 의하여 소식물체의 재분화를 이루었다. 엽병 조직절편을 1 mg/L 2,4-D와 1 mg/L kinetin이 조합 처리된 MS 기본배지에 치상하여 85%의 효율로 배발생 캘러스를 유도할 수 있었으며 이와 같은 배발생 캘러스를 5 mg/L NAA와 1 mg/L kinetin이 첨가된 배지로 옮겨갈 때 체세포배의 형성은 87%까지 이루어졌다. 체세포배는 기본배지의 농도를 절반으로 줄이고 0.2 mg/L NAA와 0.2 mg/L kinetin이 첨가된 배지조건에서 기관분화를 거쳐 소식물체로 재분화되었다.

주요어: 병풀(*Centella asiatica*), 엽병, 체세포배 발생

최근 급속한 자연환경의 훼손 등에 따른 자원식물의 감소에 대처하기 위해서는 이들 식물을 기내(*in vitro*)에서 배양함으로써 대량증식을 통해 자원식물의 보존과 우량 품종의 개발, 유용 성분의 효율적 생산 등을 이룰 수 있다(Heyenga *et al.*, 1990; Teixeira *et al.*, 1994). 주요 약용식물의 하나인 병풀(*Centella asiatica*)은 인도, 파키스탄을 비롯한 동남아 일대에서 자생하는 산형과에 속하는 다년생 초본으로 vallerin, asiatic acid, madecassic acid, asiaticoside와 미량의 alkaloid를 함유하며 상처 치료에 탁월한 효과가 있어 유럽과 미국은 물론 전세계적으로 많은 수요가 요구되는 약용식물이다(Del Vecchio *et al.*, 1984; Arpaia *et al.*, 1990; Solet *et al.*, 1993; Bonte *et al.*, 1994). 우리나라에서도 연고의 원료로 매년 다량이 사용되고 있으나 자생 군락지역이 제한되어 있고 생육이 더디며 재배가 까다로워 전량을 수입에 의존하고 있는 실정이다. 국내에 자생하는 자원식물의 기내배양에 대한 연구가 아직은 미흡하며 특히 병풀에 관한 보고는 아직 없다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 극히 제한된 생육조건에서 자생하고 있는 병풀을 재료로 기내 배양을 통한 대량증식 방법을 확립하였으며 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료, 캘러스 유도

본 실험에 사용한 병풀(*Centella asiatica*)은 제주도 성산봉

일대의 자생 군락지에서 채취하였다. 약 3주 정도 자란 병풀을 70% ethanol에 3분, 3% sodium hypochlorite에 10분간 침적하여 표면살균한 후 멸균수로 3회 세척하고 잎은 0.2-0.3 cm²로, 뿌리와 엽병은 약 0.4-0.5 cm의 크기로 각각 절단한 다음 캘러스 유도배지에 치상하여 광조건 20 μmol m⁻²s⁻¹, 광주기 16/8 h, 온도 25±1°C가 주어질 조건에서 배양하였다. 캘러스 유도배지는 MS(Murashige and Skoog, 1962) 기본배지를 사용하였으며 2,4-D, NAA, kinetin(KIN)을 농도별로 처리하여 배발생 캘러스의 형성률을 조사하였다.

체세포배 발생 유도

체세포배의 유도는 유기된 캘러스 중 배발생 캘러스만을 0.5 cm×0.5 cm 크기로 분할하여 2,4-D, NAA와 KIN이 농도별로 처리된 MS 배지에 치상하여 광조건 40 μmol m⁻²s⁻¹, 광주기 16/8 h, 온도 25±1°C로 배양하였으며 2주 간격으로 동일 조성의 새로운 배지로 옮겨 계대배양하였다. 체세포배의 형성과정은 해부현미경(Olympus, SZH-10)하에서 관찰하였다. 식물체 재분화를 위하여는 증식된 체세포배를 무기염의 농도가 절반으로 줄어든 MS 기본배지로 옮겨 광조건 50 μmol m⁻²s⁻¹, 광주기 16/8 h, 온도 25±1°C로 기관 분화와 함께 소식물체로의 재분화를 유도하였다.

결과 및 고찰

배발생 캘러스 유도 및 배양

병풀의 각 조직으로부터 캘러스 유도를 위해 2,4-D와 NAA

*교신저자: Fax (062) 520-6872

© 한국식물학회 [서울] 1995

그리고 KIN을 농도별로 MS 기본배지에 첨가하여 광조건 아래서 배양하였을 때 2주 후 주로 엽병 조직 절편으로부터 캘러스의 형성을 관찰할 수 있었다. NAA가 첨가된 배지조건에서는 캘러스의 형성이 대부분 이루어지지 않았으나 1.0 mg/L NAA가 처리된 배지에서는 유연하고 투명한 비배발생 캘러스가 형성되었다. 이와 같은 비배발생 캘러스는 체세포배의 형성 능력이 없었으며 오랜 시간 계대배양시 괴사하였다. 2,4-D의 경우 단독 처리하였을 때보다는 1 mg/L 2,4-D와 1 mg/L KIN이 첨가된 배지조건에서 희고 단단한 배발생 캘러스의 형성이 이루어졌으며(Table 1, Fig. 1) 동일 배지조건에서 계대배양하였을 때 캘러스의 지속적인 증식이 이루어졌다. Fujimura와 Komamine(1980)는 옥신 처리가 배발생캘러스의 형성에 중요한 작용을 하는 것으로 보았으며, Ammirato(1983)와 Jelaska(1986)는 또한 옥신이 이후 배발생과정에까지 영향을 미친다고 하였다. 그러나 본 실험에서는 옥신 단독 처리보다는 KIN과의 조합처리가 배발생캘러스의 유도 및 증식에 보다 효과적인 것으로 나타났다. 배발생 캘러스의 형성은 이와 같은 배양조건 뿐만 아니라 재료에 따라 영향을 받을 수도 있는데 일반적으로 미성숙 화서, 미성숙 배, 접합자배 등을 이용할 경우 분화능력이 높은 배발생 캘러스를 형성하는 것으로 알려져 있다(Finer, 1987; Mo *et al.*, 1989; Trigiano *et al.*, 1989; Teixeira *et al.*, 1994). 병풀의 조직 부위별 배발생 캘러스의 형성은 어린 엽병 조직절편으로부터는 이루어졌으나 잎과 뿌리 조직에서는 매우 어려웠고 그나마 형성된 캘러스의 대부분이

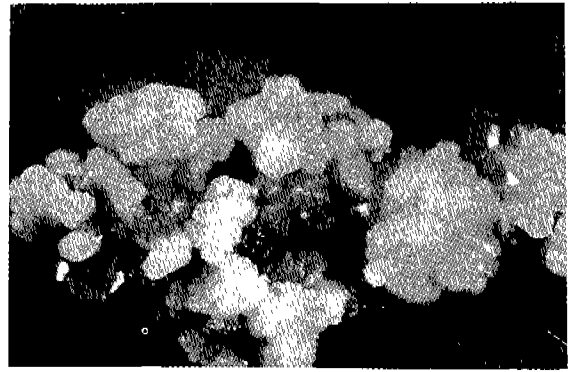


Fig. 1. Embryogenic callus from petiole of *Centella asiatica* formed on MS medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L KIN.

비배발생 캘러스였다. 또한 이와 같은 비배발생 캘러스는 계대배양이 반복될수록 괴사하는 현상을 보여주었는데 이와 유사한 결과가 두릅나무(Jhang *et al.*, 1994)와 마타리科(Mathur, 1993)에서 보고된 바 있다.

체세포배 발생

분화능력을 갖는 배발생 캘러스로부터 체세포배의 형성과 발생은, 배양조건은 물론 배지에 첨가하는 성장조절제의 종류와 농도에 의해 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Vasil

Table 1. Effect of various plant growth regulators on callus induction from petiole of *C. asiatica*

Growth regulators (mg/L)			No. of petiole explants	Frequency of callus formation (%)	No. of petioles forming callus	Nature of response
2,4-D	NAA	KIN				
0.5	—	0.0	30	57	17.3	—
0.5	—	0.5	30	67	20.3	—
0.5	—	1.0	30	61	18.4	—
0.5	—	2.0	30	62	18.7	—
1.0	—	0.0	30	75	22.5	—
1.0	—	0.5	30	79	23.9	EC
1.0	—	1.0	30	85	25.6	EC
1.0	—	2.0	30	80	24.1	EC
2.0	—	0.0	30	62	18.8	—
2.0	—	0.5	30	62	19.9	EC
2.0	—	1.0	30	72	21.6	EC
2.0	—	2.0	30	80	24.0	EC
—	0.5	0.0	30	12	3.8	—
—	0.5	0.5	30	27	8.3	—
—	1.0	0.0	30	40	12.0	NEC
—	1.0	0.5	30	40	12.0	NEC
—	2.0	0.0	30	32	9.8	—
—	2.0	2.0	30	47	14.3	—

Data were scored at the end of 3 weeks. Callus induction medium: MS basal medium supplemented with 3% sucrose. EC: embryogenic callus. NEC: nonembryogenic callus.

Table 2. Effect of plant growth regulators on embryogenesis from pectiole callus of *C. asiatica*

Growth regulators (mg/L)		Frequency of embryogenesis (%)	Mean number of embryoids*/callus
NAA	KIN		
1.0	1.0	—	—
1.0	2.0	—	—
3.0	1.0	49	14.7
3.0	2.0	41	12.3
5.0	1.0	87	26.1
5.0	2.0	67	20.1

*Embryoid induction medium: MS basal medium supplemented with 3% sucrose.

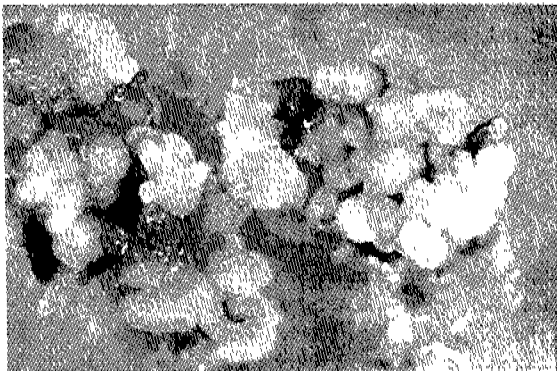


Fig. 2. Mixture of mature and immature somatic embryos cultured on MS medium supplemented with 5.0 mg/L NAA and 1.0 mg/L KIN.



Fig. 3. Multiple shoots developed from embryogenic callus derived somatic embryoids after 3-4 weeks.



Fig. 4. Different developmental stages of somatic embryos cultured on MS medium supplemented with 0.2 mg/L NAA and 0.2 mg/L KIN.

and vasil, 1981; Rangaswamy, 1986). 즉, *Panax ginseng* (Chang and Hsing, 1980), *Vitis* spp.(Srinivasan and Mullins, 1980), *Hemorocallis* spp.(Krikorian and Kann, 1981) 등을 재료로 한 실험에 있어서 성장조절제와 배지의 성분 등을 점차 변화시킴으로써 체세포배 발생을 유도시킬 수 있었다. 일반적으로 캘러스 유도 단계에서는 2,4-D를 처리하고 이후 성장조절제를 배지로부터 완전 제거하거나 옥신과 시토키닌 또는 그 밖의 성장조절제를 조합 처리하여 분화를 유도한다(Kumari and Saradhi, 1992). 그러나 본 실험에서는 성장조절제가 완전히 제거되거나 2,4-D가 첨가된 배지 조건에서는 뿌리의 분화만 이루어졌으며 5 mg/L NAA, 1 mg/L KIN이 첨가된 배지에서 3주 후 체세포배의 형성을 확인할 수 있었다(Table 2, Fig. 3). 한편 고농도의 2,4-D 처리에 의해 유기된 배발생 세포가 체세포배 발생의 유도 과정에서 일부 형태적으로 비정상적으로 되며(Lippmann and Lippmann, 1984) 구형배 단계에서 발달이 멈추거나 완전한 식물체로 재분화가 이루어지지 않는 경우가 보고되었으나(Lazzeri *et al.*, 1988; Buchheim *et al.*, 1989) 본 실험에서는 그와 같은 비정상적인 형태의 체세포

포배의 형성은 관찰되지 않았다. 단지 체세포배 발생 유도 배지에서 자엽이 형성된 체세포배를 4주 이상 계대배양 하였을 때 자엽과 근단 사이에서 약간의 캘러스화 현상과 함께 많은 2차 배가 형성되었다. 이와 같은 2차 배의 형성은 옥수수, cassava, alfalfa 등에서 보고된 바 있으며(Dos Santos *et al.*, 1983; Conger *et al.*, 1987; Szabados *et al.*, 1987) 기내 배양에 의한 다량 증식에 있어서 매우 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 본다.

식물체 재분화

발아된 체세포배를 무기염의 농도를 절반으로 줄이고 NAA와 KIN을 각각 0.2 mg/L로 낮추어 첨가된 배지로 옮겼을 때 지속적인 기관분화가 이루어졌으며(Figs. 3, 4). 대부분이 소식물체로 재분화되었으나(Fig. 5) 일부 개체에서 albinism 현상을 보였으며 이러한 경우에는 정상적인 소식물체로 발달하지 못하였다. 산형과 식물들은 기내 배양시 체세포배 발생 유도가 매우 양호한 것으로 알려져 있으나(Moon *et al.*, 1994)



Fig. 5. Plantlet derived from somatic embryos of *C. asiatica*.

병풀의 경우 아직까지 이와 같은 배양조건이 확립되어 있지 않았기 때문에 본 연구 결과는 병풀의 엽병조직으로부터 배 발생 클러스를 유도하고 체세포배 발생 과정을 통해서 재분화 개체를 형성시킬 수 있는 일련의 체계를 확립함으로써 대량 증식의 가능성을 높여주었다.

사 사

본 연구는 1994년도 기초과학연구조성비의 지원에 의하여 수행되었습니다. 이에 감사합니다.

인 용 문 헌

- Ammirato, P.V.** 1983. Embryogenesis. In *The Handbook of Plant Cell Culture. Techniques for Propagation and Breeding*. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (eds.), Vol. 1. Macmillan, New York, pp. 82-123.
- Arpaia, M.R., R. Ferrone, M. Amitrano, C. Nappo and G. Leonardo.** 1990. Effects of *Centella asiatica* extract on mucopolysaccharide metabolism in subjects with varicose veins. *Int. J. Clin. Pharm. Res.* **10**: 229-233.
- Bonte, F., M. Dumas, C. Chaudagne and A. Meybeck.** 1994. Influence of asiatic acid, madecassic acid, and asiaticoside on human collagen I synthesis. *Planta Med.* **60**: 133-135.
- Buchheim, J.A., S.M. Colburn and J.P. Ranch.** 1989. Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol.* **89**: 768-775.
- Chang, W.C. and Y.I. Hsing.** 1980. Plant regeneration through somatic embryogenesis in root derived callus of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Theor. Appl. Genet.* **57**: 133-136.
- Conger, B.V., F.J. Novak, R. Afza, and K. Erdelsky.** 1987. Somatic embryogenesis from cultured leaf segment of *Zea mays*. *Plant Cell Rep.* **6**: 345-347.
- Del Vecchio, A., I. Senni, M. Molinaro and G. Cossu.** 1984. Effect of *Centella asiatica* on the biosynthetic activity of fibroblasts in culture. *Farmaco Ed. Prat.* **39**: 355-364.
- Dos Santos A.V.P., E.C. Cutter and M.R. Davey.** 1983. Origin and development of somatic embryos in *Medicago sativa* L. (alfalfa). *Protoplasma* **117**: 107-115.
- Finer, J.J.** 1987. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on a high sucrose-containing medium. *Plant Cell Rep.* **6**: 372-373.
- Fujimura, T. and A. Komamine.** 1980. Mode of action of 2,4-D and zeatin on somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Z. Pflanzenphysiol.* **99**: 1-8.
- Heyenga, A.G., J.L. Lucas and P.M. Dewick.** 1990. Production of tumor-inhibitory lignans in callus cultures of *Podophyllum hexandrum*. *Plant Cell Rep.* **9**: 382-385.
- Jelaska, S.** 1986. Cucurbits. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry 2. Crops I*. Y.P.S. Bajaj (ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 371-386.
- Jhang, H.H., C.H. Park, Y.S. Lee and Y.B. Shin.** 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of *Aralia elata* S. *Korean J. Plant Tissue Culture* **3**: 167-171.
- Krikorian, A.D. and R.P. Kann.** 1981. Plantlet production from morphogenetically competent cell suspensions of day lily. *Ann. Bot.* **47**: 679-686.
- Kumari, N. and P. P. Saradhi.** 1992. Regeneration of plants from callus cultures of *Origanum vulgare* L. *Plant Cell Rep.* **9**: 476-479.
- Lazzeri, P.A., D.F. HildebrandF, J. Sunega, E.G. William and G.B. Collins.** 1988. Soybean somatic embryogenesis: interaction between sucrose and auxin. *Plant Cell Rep.* **7**: 517-520.
- Lippmann, B. and G. Lippmann.** 1984. Induction of somatic embryos in cotyledonary tissue of soybean *Glycine max* L. *Plant Cell Rep.* **3**: 215-218.
- Mathur, J.** 1993. Somatic embryogenesis from callus cultures of *Nardostachys jatamansi*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **33**: 163-169.
- Mo, L.H., S.V. Arnold and U. Lagercrantz.** 1989. Morphogenic and genetic stability in longterm embryogenic cultures and somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst). *Plant Cell Rep.* **8**: 375-378.
- Moon, H.K., Y. Youn and S.K. Lee.** 1994. Rapid micropagation of *Pimpinella brachycarpa* via somatic embryogenesis. *Korean J. Plant Tissue Culture* **2**: 85-90.

- 90.
- Murashige, T. and F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- Rangaswamy, N.S.** 1986. Somatic embryogenesis in angiosperm cell tissue and organ cultures. *Proc. Indian Acad. Sci.* **96**: 247-271.
- Solet, J.M., B.M. Francoise, G. Herve, S. Roberto, J.L. Guignard and C. Louis.** 1993. Glucosylation of thiocolchicine by a cell suspension culture of *Centella asiatica*. *Phytochemistry* **33**: 817-820.
- Srinivasan, C. and M.G. Mullins.** 1980. High frequency somatic embryo production from unfertilized ovules of grapes. *Scientia Hort.* **13**: 245-252.
- Szabados, L., R. Hoyos and W. Roca.** 1987. *In vitro* somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava. *Plant Cell Rep.* **6**: 248-251.
- Teixeira, J.B., M.R. Sondahl and E.G. Kirby.** 1994. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. *Plant Cell Rep.* **13**: 247-250.
- Trigiano, R.N., R.M. Beauty and J.T. Dietrich.** 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cornus florida*. *Plant Cell Rep.* **8**: 270-273.
- Vasil, V. and I.K. Vasil.** 1981. Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum* and *P. americanum* × *P. purpureum* hybrid. *Amer. J. Bot.* **68**: 864-872.

(1995. 5. 2 接受)

Multiplication and Transformation of Medicinal Plants for Production of Useful Secondary Metabolites

I. Plant Regeneration from Petiole Explants of *Centella asiatica* by *In Vitro* Cultures

Kim, Kwang-Su, Yun-Woong Paek, Kyung-Min Ko,
Sung-Jin Hwang, Hyung-Tag Im and Baik Hwang*

Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

ABSTRACT

Somatic embryogenesis and subsequent plantlet formation were obtained from embryogenic calli derived from young petioles of *Centella asiatica*. Embryogenic callus cultures were induced from petiole explants of *Centella asiatica* on basal MS medium supplemented with 1.0 mg/L 2,4-D and 1.0 mg/L kinetin. After transfer of these calli to MS medium supplemented with 5.0 mg/L NAA and 1.0 mg/L kinetin, 87% of embryogenic calli were differentiated into embryoids with primary and adventitious roots, elongated hypocotyl and cotyledon. Plantlets were induced when these embryoids were transferred to half strength inorganic salts of basal MS supplemented with 0.2 mg/L NAA and 0.2 mg/L kinetin.

Keywords: *Centella asiatica*, petiole, somatic embryogenesis

*Corresponding author: Fax +82-62-520-6872