

魚腥草의 줄기배양에 의한 植物體 再分化

秋秉佶*·柳點鎬*·杜洪秀*·權泰鎬**

Plant Regeneration by the Stem Culture in *Houttuynia cordata* Thunberg

Byung Gil Choo*, Jeom Ho Ryu*, Hong Soo Doo*, Tae Ho Kwon**

ABSTRACT : Plant regeneration from the stem tissue of *Houttuynia cordata* Thunberg was investigated. The medium supplemented with the combination of 2,4-D 1 mg/L and kinetin 0.5 mg/L was the most effective for the embryogenic callus formation. The internode segment produced more callus formation than the leaf segment. ½ MS medium was the most effective for the embryogenic callus formation. The medium supplemented with the 1% activated charcoal produced the whole plant directly without the callus formation from the nodes. The medium supplemented with the combination of NAA 0.2 mg/L and BA 1 mg/L was the most effective for the plant regeneration from the embryogenic callus.

Key words : Growth regulators, Callus, Media, Activated charcoal, Shoot, Regeneration

緒 言

魚腥草 (*Houttuynia cordata* Thunberg)는 三白草科에 속하는 多年生 宿根草로서 약모밀이라고도 불리우며, 우리나라에서는 울릉도와 안면도 그리고 일부 中部地方에 自生하고 있는 것으로 알려져 있다. 全草를 즙채, *Houttuyniae Herba*라고 하며 생선 비린내와 같은 독특한 냄새를 내어서 魚腥草라 불리운다. 繁殖은 營養系와 實生으로 하는데, 營養系와 實生으로 繁殖하는 대부분의 宿根草들처럼 자체에 變異가 많이 생기고 開花期까지 상당한 시간이 소요된다.¹³⁾

魚腥草의 이용은 全草를 藥用으로 사용하며, 漢

方에서는 利尿, 解毒, 化膿, 腫瘍, 高血壓 등에 이용되어 왔다. 이러한 效能은 免疫機能의 強化, 強心作用, 抗菌作用 등과 더불어 현재 科學的으로 證明되고 있다.

*Houttuyniae Herba*에는 quercitrin, isoquercitrin, decanoyl-acetaldehyde, methylnonylketone, mycene, capric aldehyde, capric acid 등의 성분이 있으며, 魚腥草의 生理活性의 本體인 quercitrin은 K⁺鹽과 더불어 강한 利尿活性物質임이 알려졌다⁹⁾, 劉와 尤¹⁰⁾, 그리고 宋¹¹⁾은 魚腥草 抽出物이 免疫기능을 強化시킨다고 보고하였다. 또한, 赤松¹⁾은 quercitrin 등의 成分이 強心作用을 보인다고 보고하였으며, 임⁷⁾은 魚腥草의 抗癌作用에 대한 가능성을 보고 하였다.

* 全北大學校 農科大學 (College of Agriculture, Chonbuk National University, Chonju 560 - 756, Korea)

** 全北大學校 遺傳工學 研究所 (Institute for Molecular Biology & Genetics, Chonbuk National University, Chonju 560 - 756, Korea)

日本에서는 魚腥草를 많은 農家에서 栽培하고 있으며, 이를 이용하여 무좀치료제, tonic drink, 피부보호제, 利尿, 소염제 등이 개발되어 있는데, 국내에서는 魚腥草 抽出物의 成分分析에 관한 논문²⁾이 발표되고 김 등³⁾은 食品利用 可能性을 研究한 정도이며, 少數農家에서 少面積으로 栽培하고 있으나 有用藥用作物으로서의 研究는 全無한 실정이다.

藥用植物로부터 二次代謝産物의 生産은 식물체 의 조직을 이용한 배양체계가 우선적으로 확립되어야 한다. 따라서 藥用植物資源으로 이용 가능성이 큰 魚腥草를 조직 부위별로 배양을 시도하여 줄기조직으로부터 완전한 植物體를 얻었으므로 그 결과를 보고한다.

材料 및 方法

본 실험에 사용한 供試材料는 全北大學校 農科大學 藥用作物 保存圃場에 植在되어 있는 魚腥草의 節間, 節, 葉을 채취하여 70% ethyl alcohol에 30초간 살균 후, 2% sodium hypochlorite 수용액에 20분간 沈漬시켜 표면살균하고 滅菌水로 4회 水洗하여 1 cm 크기로 잘라 사용하였다.

魚腥草의 캘러스 形成에 미치는 生長調節物質의 影響을 알아보기 위해 MS培地에 auxin계인 2, 4-D (dichlorophenoxy-acetic acid)와 NAA (naphtaleneacetic acid)를 0.5, 1, 3 mg/L 그리고 cytokinin계인 kinetin (furfurylamino purine)과 BA (benzylamino purine)를 0.5, 1 mg/L을 混用處理하여 節間 및 葉을 置床하였으며 12주 후 캘러스 形成 및 生體重을 調査하였다.

魚腥草의 組織培養에 適合한 培地의 種類를 探索하고자 MS, 1/2 MS, 1/4 MS, B5, White 등 5種類의 배지에 캘러스 형성에 가장 효과적이었던 2, 4-D 1 mg/L와 kinetin 0.5 mg/L을 첨가하여 節間을 置床하고 캘러스 形成 및 生體重을 조사하였다.

活性炭이 캘러스 形成 및 shoot 發生에 미치는 影響을 알아보기 위해 1/2 MS培地에 2, 4-D와 kinetin 그리고 活性炭을 濃度別로 처리하여 節을 置床 후 그 반응을 조사하였다.

誘導된 embryogenic 캘러스를 NAA 0.2 mg/L와 BA 1, 3 mg/L 그리고 2, 4-D 0.2 mg/L와 kinetin 1,

3 mg/L이 混用處理된 1/2 MS培地에 옮겨 植物體 再分化를 시도하였다.

이상의 실험에서 培地의 調製는 처리별로 成分 量과 8 g/L의 agar를 넣은 후 pH를 5.8로 조정하고 121°C에서 15분간 高壓滅菌하였으며, 培養條件은 25±1°C에서 1,200 Lux의 光源下에서 16/8h의 光週기로 明培養하였다.

結果 및 考察

1. 캘러스 形成에 미치는 生長調節物質의 影響

魚腥草의 캘러스 形成과 生長에 미치는 生長調節物質의 影響을 알아보기 위하여 節間 및 葉의 切片을 2, 4-D와 kinetin 그리고 NAA와 BA를 濃度別 混用處理한 MS培地에 置床한 후 培養體의 캘러스

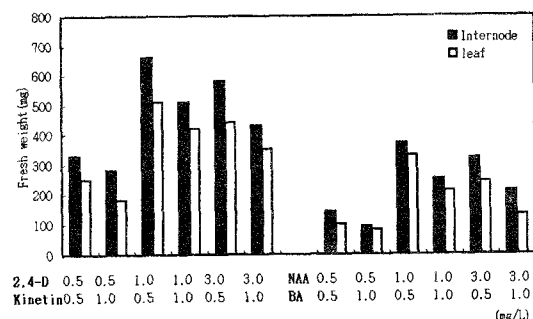


Fig. 1. Effect of growth regulators on the fresh weight of embryogenic callus from the internode and the leaf of *Houttuynia cordata* Thunberg after 12 weeks on the MS medium.

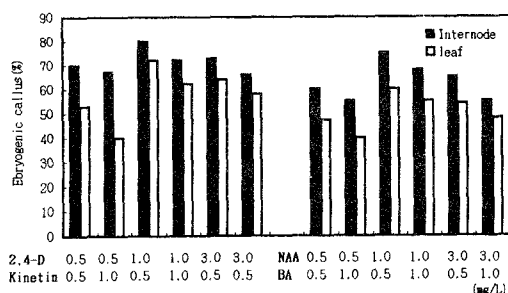


Fig. 2. Effect of growth regulators on the induction rate embryogenic callus from the internode and the leaf of *Houttuynia cordata* Thunberg after 12 weeks on the MS medium.

形成과 生體重을 조사한 결과는 그림 1, 2와 같다.

魚腥草의 節間培養에서는 置床 3주째 부터 2, 4-D와 kinetin이 組合處理된 培地에서 培養體가 褐變되면서 모든 처리구에서 胼胝 形成이 관찰되기 시작했다. 胼胝는 節間의 가장자리로부터 형성되었고 6 주째에는 節間의 중심부까지 黃白色의 단단하고 緻密한 embryogenic 胼胝가 形成되었으며 (Figure 3), 12주 후에는 양성한 胼胝의 增殖을 볼 수 있었다. 2, 4-D 1 mg/L와 kinetin 0.5 mg/L이 組合處理된 培地에서 embryogenic 胼胝의 形成率은 80%, 生體重은 660±45 mg으로 가장 효과적이었다. NAA와 BA가 組合處理된 培地에서는 2, 4-D와 kinetin의 처리구보다 胼胝 形成이 1주일 정도가 늦은 4주가 경과된 후부터 綠黃色의 胼胝를 形成하기 시작했으며, NAA 1 mg/L와 BA 0.5 mg/L 처리구가 가장 높은 embryogenic 胼胝 形成率(71%)과 生體重(370±27 mg)을 나타냈으나, 2, 4-D 1 mg/L와 kinetin 0.5 mg/L의 組合處理區에 비해 生體重에서 ½정도 밖에 되지 않았다.

한편, 葉의 培養에서 胼胝 形成에 미치는 生長

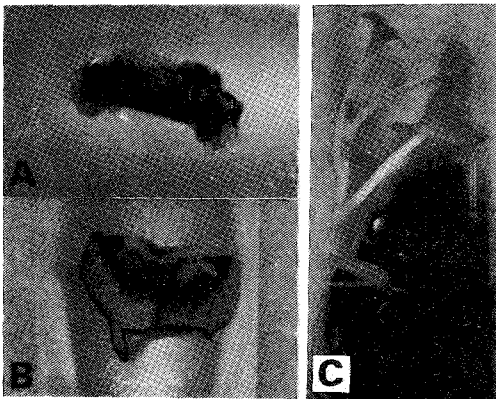


Fig. 3. Callus formation and vegetative propagation from the explants of *Houttuynia cordata* Thunberg. < A > : The internode after inoculated at 4 weeks. < B > : The leaf after inoculated at 4 weeks. < C > : Vegetative propagation from node after inoculated at 16 weeks in the medium supplemented with 10g/L activated charcoal.

調節物質에 대한 影響은 節間培養과 類似한 傾向으로 2, 4-D 1 mg/L와 kinetin 0.5 mg/L 組合處理區에서 胼胝 形成率은 72%, 生體重은 510±31 mg으로 가장 良好하였고 NAA 1 mg/L과 BA 0.5 mg/L 組合處理區에서 胼胝 形成率이 60%, 生體重은 330±17 mg으로 비교적 良好하였으나 節間培養의 경우 보다는 胼胝 形成率과 生體重在 낮은 效率을 보였다 (Figure 3).

Murashige⁸⁾는 auxin과 cytokinin 등의 植物生長調節物質의 均衡·調節이 대부분의 植物에서 細胞分裂이나 器官分化의 과정을 制御하는데 결정적인 역할을 한다고 보고하였는데, 本實驗에서도 auxin과 cytokinin의 組合 및 添加量에 따라 胼胝 形成과 生長에 차이를 보였으며, 魚腥草의 節間과 葉의 培養 결과, 切片으로부터 胼胝 發生은 切片體의 部位와는 큰 관계없이 培地內 添加된 生長調節物質의 種類와 濃度에 따라 차이가 있었다.

2. 魚腥草 組織培養에 適合한 培地 探索

魚腥草의 組織培養에 적합한 培地의 種類를 探索하고자 MS, ½MS, ¼MS, B₅, White 등 5 種類의 培地에 上記實驗에서 胼胝 形成에 가장 효과적이었던 2, 4-D 1 mg/L와 kinetin 0.5 mg/L을 添加하여 節間을 置床하고 비교한 결과는 표 1과 같다.

魚腥草의 節間으로부터 胼胝의 形成과 生長에

Table 1. Effect of the various media on the callus formation from the internode *Houttuynia cordata* Thunberg after 12 weeks on the medium supplemented with 1 mg/L 2, 4-D and 0.5 mg/L kinetin.

Media	No. of explants cultured	Fresh weight (mg)	Callus formation rate(%)	Frequency of embryogenic callus(%)
MS	37	640±28	75	73
1/2MS	35	750±33	88	88
1/4MS	39	460±25	65	27
B ₅	34	910±43	90	15
White	35	220±14	33	10

가장 큰 效率을 보인 培地는 B5培地였으나 形成되고 生長한 캘러스는 대부분이 緻密하지 못하고 灰白色인 non-embryogenic 캘러스로 思料된다. 組織培養에서 胚의 形成은 auxin 이외에 培地 중에 들어 있는 窒素 形態의 影響을 크게 받는다. Wetherell 등¹²⁾이 당근으로 한 一連의 實驗에서 KNO₃의 量이 아주 높으면 培地內에 還元型的 窒素가 없어도 胚를 발달시킬 수 있지만 KNO₃ 단독 보다는 NH⁴⁺ 이온을 添加함으로써 胚發生을 증가시킬 수 있다고 보고한 바 있는데, B5배지는 MS나 ½MS培地보다 還元型 窒素의 量이 적어서 embryogenic 캘러스의 形成이 좋지 않았던 것으로 思料된다.

White 培地는 뿌리배양에 널리 이용되어 왔으나 캘러스 形成 및 生長을 위해서는 이 培地에 無機養分이 不充分하다는 것이 밝혀졌는데³⁾, 本 實驗에서도 역시 節間으로 부터 캘러스 形成이 低調하였고 切片體로 부터 직접 뿌리만을 分化시키는 傾向이었다.

따라서, 無機鹽類의 量이 MS培地의 절반 수준인 ½MS培地가 캘러스 形成率과 embryogenic 캘러스의 誘導率이 각각 88%, 生體重은 750±33 mg으로 가장 効果적인 培地로 思料된다. 魚腥草

의 組織培養에서 MS培地는 無機鹽類가 다소 많은 듯 하며, ¼MS培地는 無機鹽類의 量이 다소 부족하여 embryogenic 캘러스 形成에는 적합하지 못한 것으로 思料된다.

3. 活性炭의 影響

魚腥草의 embryogenic 캘러스 形成과 shoot 誘導에 活性炭의 影響을 알아보고자 ½MS培地에 2, 4-D와 kinetin 그리고 活性炭을 濃度別로 수준을 달리하여 組合處理한 후 節과 葉을 培養하여 비교한 결과는 표 2와 같다.

魚腥草의 節을 培養하였을 때에는 간혹 新梢가 誘導되어 완전한 植物體로 分化하는 것을 볼 수 있었는데, 특이하게도 活性炭의 濃度 수준과는 관계 없이 活性炭이 添加된 培地에서는 캘러스를 形成하지 않고 직접 shoot가 形成되었다. 2, 4-D와 kinetin이 각각 1 mg/L과 活性炭이 1% 수준에서는 97%의 shoot 誘導를 보였으며 誘導된 shoot의 대부분이 완전한 植物體로 再生되었다(Figure 3). 한편 活性炭이 첨가된 培地의 葉切片에서는 培地의 褐變化는 없었지만 캘러스도 形成되지 않았고 shoot의 分化도 관찰할 수 없었다.

Table 2. Effect of charcoal on the callus formation from the node and the leaf of *Houttuynia cordata*. Thunberg after 16 weeks on the ½ MS medium.

Explants	Activated charcoal (g/L)	Growth regulators		No. of explants cultured	Callus formation rate (%)	Shoot formation rate (%)
		2, 4-D (mg/L)	kinetin (mg/L)			
Node	0	1.0	0.5	29	86	7
	5	1.0	0.5	28	0	71
	10	1.0	0.5	30	0	80
	0	1.0	1.0	27	78	19
	5	1.0	1.0	25	0	84
	10	1.0	1.0	30	0	97
Leaf	0	1.0	0.5	32	72	0
	5	1.0	0.5	30	0	0
	10	1.0	0.5	32	0	0
	0	1.0	1.0	29	60	0
	5	1.0	1.0	33	0	0
	10	1.0	1.0	28	0	0

魚腥草의 캘러스 形成은 培養時間이 경과됨에 따라 切片體가 褐變되고 生長이 느리며 培地의 색 갈 또한 褐變되는 현상을 볼 수 있었는데, 이것은 切片體로부터 生成되는 페놀成分과 같은 毒性物質 때문이라 여겨진다. 活性炭의 添加는 毒性物質을 吸收 및 除去시킬 수 있다고 하였으며, Roberts 등¹⁾은 같은 活性炭의 添加는 auxin의 吸收速度를 增加시키고 胚發生의 誘導를 가져온다고 하였다. Dhar 등²⁾과 李 등³⁾은 節에서는 캘러스의 形成이 低調한 경우라도 직접 新梢가 誘導되어 完전한 植物體로 分化가 가능하다고 보고하였는데, 本實驗에서도 活性炭을 添加할 경우 切片體와 培地의 褐變化가 없어지고, 節에서 캘러스가 形成되지 않고 직접 shoot의 分化를 보여 類似的한 결과를 얻을 수 있었다.

4. 植物體 再分化

魚腥草의 節間으로부터 形成된 embryogenic 캘러스를 NAA와 2,4-D가 0.2 mg/L 그리고 BA와 kinetin이 1, 3 mg/L 混用添加된 1/2 MS培地에 置床하여 植物體 再分化를 誘導한 결과는 표 3과 같다.

Table 3. Effect of growth regulators on the plantlet regeneration from the internode derived callus of *Houttuynia cordata* Thunberg after 12 weeks on the 1/2 MS medium.

Contents of growth regulators (mg/L)	No. of inoculated embryogenic calli	No. of plantlet regeneration
2,4-D 0.2 kinetin 1	50	0(0) ^a
3	50	0(0)
NAA 0.2 BA 1	50	15(30)
3	50	3(6)

a : Plantlet regeneration ratio

培養條件은 캘러스 形成時와 동일한 조건으로 약 12 주간 培養하였는데, 植物體의 分化는 NAA 0.2 mg/L와 BA 1 mg/L를 添加한 培地에서 30%의 shoot를 形成하여 가장 良好하였으며 (Figure 4), shoot를 형성한 embryogenic 캘러스는 배양시간이

경과함에 따라 multiple shoot를 形成하였다 (Figure 4). 2,4-D와 kinetin이 添加된 培地에서는 캘러스로부터 뿌리만 分化되었다. 再分化된 multiple shoot를 동일한 培地에 옮겨 生育시킨 결과 生育이 왕성하였으며, 이를 植物生長調節物質을 添加하지 않은 1/2 MS培地에 옮겨 生育시킨 결과

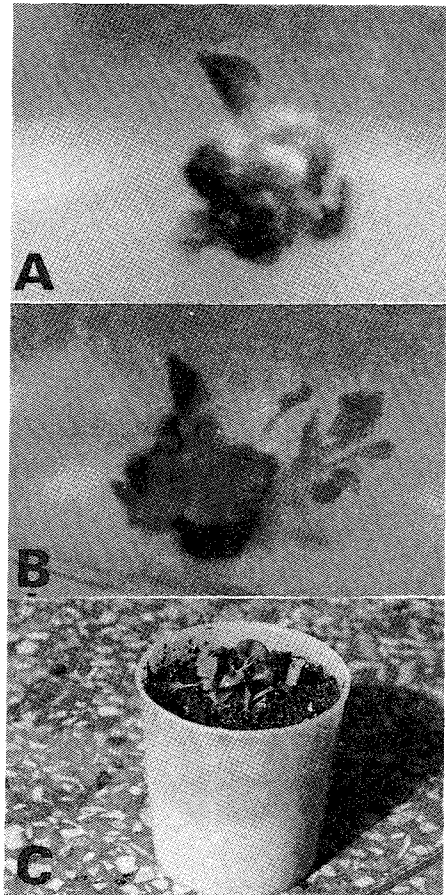


Fig. 4. Regeneration of *Houttuynia cordata* Thunberg on the 1/2 MS medium supplemented with 0.2 mg/L NAA and 1 mg/L BA. <A> : Single shoot regenerated at 10 weeks after inoculation of internode segments, : Multiple shoot after inoculated at 12 weeks, <C> : Growing plantlets in pot supplemented with vermiculite and perlite.

20 주 후에는 發根된 완전한 小植物體를 얻을 수 있었고, 이 幼植物體를 Ball社의 vermiculite와 perlite를 1 : 1로 혼합한 床土에 옮겨 生育시켰다 (Figure 4).

節間 由來의 캘러스로부터 植物體 再生은 節로부터 직접 植物體를 再生시키는 경우보다 비교적 효율이 좋지 않았는데, 기내에서 캘러스 형성 없이 節로부터 직접 植物體를 대량 증식시키는 체계도 구체적인 검토가 요구되며, 또한 embryogenic 캘러스로부터의 再分化 효율을 증가시키는 연구도 필요하다고 사료된다.

摘 要

藥用植物으로써 이용 가능성이 큰 魚腥草의 二次代謝産物의 생산에 기초가 되는 組織培養體系를 확립하고자 魚腥草의 節間, 節 및 葉의 切片體를 利用하여 캘러스를 形成시키고, 形成된 캘러스로부터 植物體 再分化를 시도하였다.

1. Embryogenic 캘러스 形成은 모든 切片體에서 2, 4-D 1 mg/L와 kinetin 0.5 mg/L을 添加하였을 때 가장 효과적이었다.

2. 節間에서의 캘러스 形成이 葉보다 더 효과적이었다.

3. 魚腥草의 節間으로부터 embryogenic 캘러스 形成은 1/2 MS 培地가 효과적이었다.

4. 培地內에 1%의 活性炭을 添加하였을 경우 캘러스를 形成시키지 않고 培養된 節로부터 직접 植物體가 分化되었다.

5. Embryogenic 캘러스로부터 植物體 再分化는 0.2 mg/L NAA와 1 mg/L BA를 添加한 培地가 다른 組合의 培地보다 分化率이 높았다.

引用 文 獻

1. 赤松金芳. 1980. 新訂 和漢藥. 醫齒藥出版株式會社. 東京. pp538 - 539.
2. 최광훈, 권승자. 1989. *Houttuynia cordata* 및 *Saururus chinensis*의 精油成分에 관한 연구. 慶熙大 論文集. 18 : 341 - 348.
3. 崔相鎮. 1989. 植物組織培養(理論과 實際). 대한교과서주식회사. 서울. pp33 - 49, pp 118 - 119.
4. Dhar A. C., P. B. Kavi Kishor, and A. M. Rao. 1989. *In vitro* propagation of guayule (*Parthenium argentatum*) a rubber yielding shrub. Plant Cell Reports. 8 : 489 - 492.
5. 김준평, 정동효, 이영춘, 윤광호, 강규찬. 1989. 魚腥草 抽出物의 理化學的 性質과 그의 食品에의 應用. 中央大學校 自然界 論文集. 2 : 113 - 126.
6. 李孝承, 李正日, 柳守魯, 金石東, 金成敏. 1994. 山藥의 器內培養에 미치는 培地 및 生長調節物質과 活性炭의 影響. 韓國藥用作物學會誌 2(1) : 51 - 59.
7. 임재훈. 1986. 數種의 漢藥物이 癌細胞 感受性에 미치는 影響. 慶熙大學校 大學院 博士學位論文. p30
8. Murashige T. 1977. Clonal crops through. in : W. Barz et al(editors). Plant tissue culture and its bio-technological application. Springer-Verlag, Berlin, pp392 - 403.
9. Roberts D. R., B.S. Flinn, D. T. Webb, F. B. Webater and B.C.S. Sutton .1990. Abscisic and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage protein in somatic embryos of interior spruce. Physiology Plant. 78 : 335 - 360.
10. 劉正材, 尤煥文. 1983. 中醫免疫. 四川省. 重慶出版社. p57.
11. 宋昊垠. 1986. 魚腥草 抽出物이 肝炎誘發 생쥐의 免疫反應 및 組織變化에 미치는 影響. 圓光大學校 大學院 博士學位論文. p30
12. Wetherell D.F., and. K. Dougall. 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. Physiol. Plant. , 37 : 97 - 103.
13. 陸昌洙. 1990. 原色韓國藥用植物 圖鑑. 아카데미서적. 서울. p220