

지황의 액체배양에서 식물생장조정제와 치상 조직이 직접 체세포배 형성에 미치는 영향

박주현*·채영암*

Effects of Growth Regulators and Explants on Direct Somatic Embryogenesis in Liquid Culture of *Rehmannia glutinosa*

Ju Hyun Park* and Young Am Chae*

ABSTRACT : The effects of plant regulators on direct somatic embryogenesis in liquid culture of *Rehmannia glutinosa* were investigated and the proper explant for direct somatic embryo formation was studied. Direct somatic embryos were induced from leaf segments culture in the MS liquid medium containing 0.5 mg/l of both IAA and NAA, while IBA of 1.0 mg/l was required for the same effect. Many somatic embryos were directly formed at the concentration of 2.0 mg/l cytokinin such as BA, kinetin and zeatin, but somatic embryogenesis was relatively poor at above or below this level. Relatively more somatic embryos were induced in the combination of 1.0 mg/l IAA and 2.0 mg/l zeatin. Formation of somatic embryos begun after 6 weeks on stem segments, while 7 weeks both on petiole and leaf. However, overall production of somatic embryos after 8 weeks was higher in leaf segment than that of stem segment.

緒 言

지황은 우리 나라에서 오랫동안 재배하고 이용하여 온 중요한 생약재의 하나로 매년 수요가 증가되고 있다. 지황은 뿌리로 번식하기 때문에 증식이 낮을 뿐만 아니라, 번식용 종근을 옮겨장 하다가 봄에 심기 때문에, 저장 기간 동안 병원균의 감염율이 커서 재배에 많은 어려움이 따르고 있다.

병원균의 오염을 제거하고 대량증식을 하는 한 가지 효율적인 방법으로 현탁배양을 통한 체세포배 형성을 생각할 수 있고 (Redenbaugh, 1993), 또한 생물반응기를 이용하여 여러 작물에서 체세포배를 형성시킨 보고들이 있다 (Denchev, 1992; Nishimura et al., 1993; Preil, 1990; Redenbaugh, 1987 and 1991).

지황 캘러스의 현탁배양에서 체세포배 형성이 보고되었으나 (Park et al, 1995; Chae and Park, 1993), 현탁배양을 통해 체세포배를 유도할 때 문제가 되는 것 중의 하나가 체세포배의 변이성이다 (Preil, 1990). 이 문제점을 해결할 수 있는 방법은 캘러스 형성 과정을 거치지 않고 치상 조직으로부터 직접 체세포배를 형성시키는 것이지만 아직 지황에서 직접 체세포배 형성에 관한 보고는 없다.

본 연구에서는 생물반응기에서 직접 체세포배의 대량 형성 기반을 마련하고자, 액체배양에서 직접

본 연구에서는 생물반응기에서 직접 체세포배의 대량 형성 기반을 마련하고자, 액체배양에서 직접

* 서울대학교 농업생명과학대학 농학과 (Department of Agronomy, Seoul Nat'l Univ., Suwon 441 - 744, Korea)

(97. 10. 23 접수)

체세포배의 형성에 적절한 성장조절제의 종류와 농도 그리고 가장 효율적인 치상 조직을 찾고자 하였다.

材料 및 方法

1. 실험 재료

지황 증자는 70% 알콜로 1분간 소독한 다음 2% sodium hypochlorite로 15분간 표면 소독한 다음 멸균수로 3회 세척한 후 기내에서 발아시켰다. 발아한 유식물은 1개월마다 MS 고체배지에서 증식시켜 실험 재료로 사용하였다.

2. 직접 체세포배 형성

직접 체세포배가 형성되는지를 알기 위해서는 MS 고체배지를 사용하였고, 액체배지에서 직접 체세포배 형성에 영향을 미치는 성장조절제의 종류와 농도 그리고 적합한 치상 조직을 결정하기 위해서는 MS 기본배지를 사용하였다.

사용한 옥신류의 성장조절제는 NAA, IAA 및 IBA이었으며 이들의 농도는 0, 0.1, 0.5 및 1.0 mg/l 이었다. 사이토키닌류의 성장조절제로는 BA, zeatin 및 kinetin을 사용하였고 이들의 농도는 0, 1.0, 2.0 및 5.0 mg/l로 하였다. 성장조절제는 단독처리 효과와 옥신류와 사이토키닌류와의 혼용 효과를 아울러 조사하였다.

배양은 25℃에서 16시간 조명 하에서 수행하였으며, 액체배양인 경우는 100ml Erlenmyer 플라스크에서 100 rpm 속도로 배양하였다. 치상 조직으로는 잎 절편, 엽병 및 줄기 조직을 사용하였다. 잎은 1cm x 1cm 크기로, 엽병과 줄기는 1cm 길이로 잘라 배지에 치상하였다.

結果 및 考察

1. MS 고체배지에서 직접 체세포배 형성

MS 고체배지에서 직접 체세포배 발생에 영향을 미치는 BA와 NAA의 효과를 알기 위하여 지황 잎 절편을 치상하여 6주간 배양한 결과는 표 1과 같다. BA를 단독으로 처리한 실험구에서만 직접적

으로 체세포배가 형성·발달되었고, 2 mg/l의 BA와 NAA를 조합 처리한 시험구에서는 캘러스를 거쳐 간접적으로 체세포배가 형성되었다. 그에 비하여 1mg/l의 BA와 NAA를 조합 처리한 경우에는 캘러스만 형성되어, 지황의 체세포배 형성에는 높은 농도의 BA가 필요한 것으로 나타났다.

Table 1. Effect of combination of NAA and BA on direct somatic embryogenesis from leaf segment cultures of *Rehmannia glutinosa* in solid agar medium after 6 weeks.

Growth regulator (mg/l)	Formation of somatic embryo
BA 1	D
BA 1+NAA 0.5	C
+NAA 1.0	C
BA 2	D
BA 2+NAA 0.5	T
+NAA 1.0	T

D : Direct somatic embryogenesis, T : Through callus, C : Callus only

2. MS 액체배지에서 직접 체세포배 형성

생물반응기 (Bioreactor)에서의 체세포배의 대량 생산 조건을 결정하기 위한 실험의 일환으로 MS 액체배지에 auxin류의 성장조절제인 IAA, IBA 및 NAA를 농도별로 처리하여 지황 잎 절편을 8주간 배양한 결과는 표 2에서와 같다.

IAA, IBA, NAA 모두 0.1 mg/l의 농도로 처리한 시험구에서는 직접 체세포배가 형성되지 않았고, 이보다 높은 농도인 0.5~1.0 mg/l의 농도에서 형성되었지만 그 수는 많지 않았다. IAA 1.0mg/l 처리구에 잎절편에 엽병이 부착된 상태로 배양한 경우 새로운 shoot가 생성되어 이로부터 발근이 되었고 (Fig. 1-A, B), 줄기만을 배양하였을 때에는 뿌리만 발생하는 경우도 있었다 (Fig. 1-C). 이것으로 보아 식물체의 부위별로 반응하는 양상이 다르기 때문에 성장조절제의 종류나 농도의 결정과 더불어 식물체의 부위를 정확히 결정하는 실험도 필요할 것으로 생각되었다.

Table 2. Effect of auxins on direct somatic embryogenesis from leaf segment cultures of *Rehmannia glutinosa* in MS liquid medium after 8 weeks.

Conc. (mg/l)	Auxins		
	IAA	IBA	NAA
0.1	-	-	-
0.5	+	-	+
1.0	+	+	-

- : none, + : poor, ++ : good

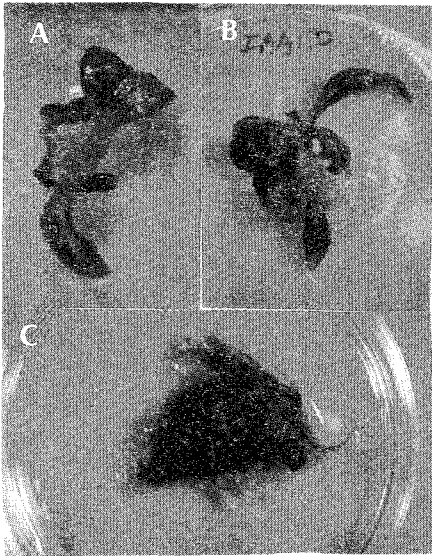


Fig. 1. Various types of differentiation from different explants of *Rehmannia glutinosa* cultured in liquid media.

A, B : leaf with petiole (A : multiple shoot ; B : shoot with roots), C : stem (root only)

액체배지에서 직접 체세포배 발생에 미치는 cytokinin의 영향을 알아 보려고 BA, kinetin, zeatin을 농도별로 처리한 결과는 표 3에서와 같다. Auxin을 단독 처리한 실험 결과와 마찬가지로 저농도 처리구에서는 전혀 배가 발생하지 않았고, 치상조직이 괴사하였다. 처리한 모든 cytokinin에서 그 농도가 2.0 mg/l일 때 가장 좋은 체세포배 발생을 나타내었고, 5.0 mg/l의 농도에서는 오히려 억제되거나 zeatin과 같이 변화가 없는 것으로 보아 cy-

tokinin을 단독 처리할 경우에는 2.0 mg/l가 가장 적합한 것으로 나타났다.

Table 3. Effect of cytokinins on direct somatic embryogenesis from leaf segment cultures of *Rehmannia glutinosa* in MS liquid medium after 8 weeks.

Conc. (mg/l)	Cytokinin		
	BA	Kinetin	Zeatin
1.0	-	-	-
2.0	++	++	++
5.0	+	+	++

- : none, + : poor, ++ : good

양의 실험결과를 토대로 IAA농도를 1.0 mg/l로 고정시키고, cytokinin을 종류별·농도별로 조합 처리한 배지에서 잎 절편을 8주간 배양하여 체세포배 발생에 적합한 조합과 농도를 찾기 위해 실험한 결과는 표 4에서와 같다.

절편당 형성된 체세포배의 수는 cytokinin의 종류·농도별로 차이를 보였다. BA를 조합 처리하였을 때에는 농도에 관계없이 일정한 발생 빈도를 보였지만 그 수는 적었고, kinetin의 경우는 2.0 mg/l 농도로 조합 처리했을 때 비교적 많은 체세포배가 형성되었다. 다른 cytokinin과 비교했을 때 zeatin을 조합 처리한 시험구에서 보다 좋은 결과를 보였는데, 특히 농도가 2.0 mg/l일 때 체세포배가 가장 많이 형성되었고, 다른 처리구보다 빠르게 배양 후 6주 정도에 체세포배가 형성되어 같은 기간에 더 성숙되고 건전하게 발달되었다 (Fig. 2).

Table 4. Effect of combination of IAA and cytokinins on direct somatic embryogenesis from leaf segment cultures of *Rehmannia glutinosa* in MS liquid medium after 8 weeks.

Cytokinin	BA (mg/l)			Kinetin (mg/l)			Zeatin (mg/l)		
	1.0	2.0	5.0	1.0	2.0	5.0	1.0	2.0	5.0
IAA	+	+	+	-	++	+	++	+++	++

- : none, + : 1~3 somatic embryos per explant, ++ : 4~6 somatic embryos per explant, +++ : 7 < somatic embryos per explant

직접 체세포배 발생에 적합한 치상 부위를 결정하기 위하여 MS 배지에 IAA 1.0 mg/1와 zeatin 2.0 mg/1를 첨가한 배지에 줄기, 엽병 및 잎 절편을 배양한 결과는 표 5에서와 같다.

Table 5. Response of *Rehmannia glutinosa* explants on direct somatic embryogenesis and shoot development.

Period (weeks)	Explant		
	Stem	Petiole	Leaf
6	++	+	+
7	++	++	++
8	++	++	+++

+: poor, ++: fair, +++: good

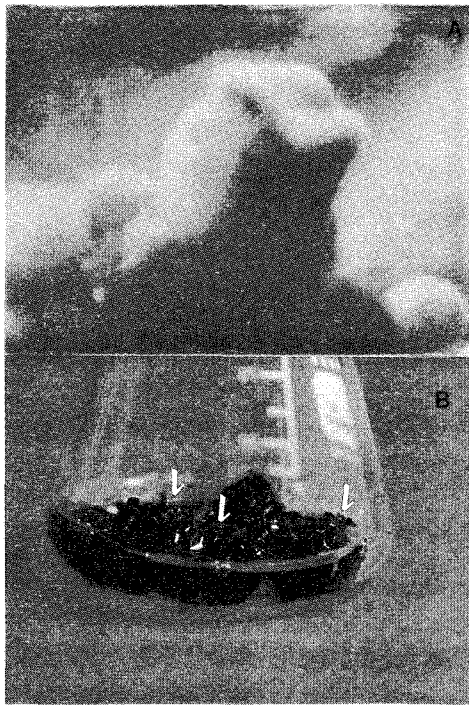


Fig. 2. Direct somatic embryogenesis from leaf segment cultures of *Rehmannia glutinosa*.

A: Formation of somatic embryo after 6 weeks culture ($\times 40$)

B: Somatic embryos cultured in MS basal medium containing IAA 1.0 mg/1 and Zeatin 2.0 mg/1 for 8 weeks. Arrows indicate somatic embryos.

줄기 절편에서는 엽병이나 잎 절편에 비해 짧은 기간내에 shoot가 발생하였는데, 이는 완벽한 직접 체세포배 발생 과정을 통하였다기 보다는 기관 분화에 의한 multiple shoot 발생인 것으로 생각되어진다. 반면 잎 절편을 재료로 하였을 경우, 발생 기간은 비교적 길었지만, 8주 후의 발생율에 있어서는 오히려 다른 조직에 비해 더 높은 것으로 이루어 보아 지황의 조직 배양을 통한 체세포배의 발생에는 잎 조직이 유용한 것으로 여겨진다. 이는 적색광 하에서 Begonia의 잎 절편과 엽병을 재료로 직접 체세포배 발생을 유도한 결과, 잎 절편에서의 반응이 엽병에 비하여 늦었지만 형성된 체세포배의 수는 오히려 더 많았다는 Castillo 등(1997)의 보고와 비슷한 양상이었다.

摘 要

지황 (*Rehmannia glutinosa*)에서 종근 저장시 나타나는 병원균의 오염을 없애면서 종묘를 대량 증식시키기 위한 방법의 하나로 조직을 액체 배양하여 직접 체세포배를 형성하고자 할 때 효과적인 성장조절제의 종류와 농도 및 이들의 혼용 효과와 직접 체세포배 형성 효율이 높은 최적 치상 조직을 찾자 실험한 결과는 다음과 같다.

1. MS 고체배지에 잎 절편을 치상한 결과 BA를 1.0 mg/1 이상 처리한 경우에는 직접적으로 체세포배가 형성되었으나, BA 1.0 mg/1에 NAA를 혼용한 경우에는 캘러스만 형성되었고, BA 2.0 mg/1에 NAA를 혼용한 경우에는 캘러스 과정을 거쳐 체세포배가 형성되었다.

2. MS 액체배지에 잎 절편을 배양한 결과 IAA와 NAA를 각각 0.5 mg/1로 처리하거나, IAA와 IBA를 각각 2.0 mg/1로 처리한 경우 직접 체세포배가 형성되었다.

3. 잎 절편을 MS 액체배지에 치상하였을 때 BA, zeatin 및 kinetin을 각각 2.0 mg/1로 처리한 경우 직접 체세포배가 효과적으로 형성되었다.

4. IAA 1.0 mg/1에 BA, zeatin 및 kinetin을 혼용 처리한 MS 액체배지에 잎절편을 배양한 결과, zeatin 2.0 mg/1를 혼용 처리한 구에서 직접 체세포배 형성율이 가장 높았고 다음이 kinetin 2.0 mg/1

와 zeatin 5.0 mg/l을 조합한 경우이었다.

5. 치상 6주 후부터 줄기, 엽병 및 잎 절편에서 직접 체세포배가 형성되었으나, 8주 후 치상 조직별 체세포배 형성율은 잎 절편에서 가장 높았다.

引用文獻

1. Castillo, B. and M.A.L. Smith. 1997. Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracillis* explants. Plant Cell Reports. 385-388.
2. Chae, Y.A. and S.U. Park. 1993. Callus induction and somatic embryogenesis in suspension culture of *Rehmannia glutinosa*. Kor. J. Medicinal Crop Sci. 1 : 184-190.
3. Denchev, P.D. 1992. Somatic embryo production in bioreactors. J. Biotech. 26 : 99-109.
4. Nishimura, S., T. Terashima, K. Higashi, and H. Kamada. 1993. Bioreactor culture of somatic embryos for mass propagation of plants. In "Synseed (Redenbaugh K. ed.)". CRC Press, pp.175-181.
5. Park, J. H., S.U. Park and Y.A. Chae. 1995. Studies on proper medium for somatic embryogenesis in suspension culture of *Rehmannia glutinosa* and encapsulation of somatic embryos. Kor. J. Medicinal Crop Sci. 3 : 100-106.
6. Preil, W. 1990. Application of bioreactors in plant propagation and gene transfer systems. In "Micropropagation (Debergh P. & Zimmerman R. H. ed.)". Kluwer Academic Press, pp. 427-448.
7. Redenbaugh, K., J. A. Fujii, and D. Slade. 1991. Synthetic seed technology. In "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant. (Vasil I. K. ed.)". Academic Publishers, pp. 35-74.
8. Redenbaugh, K., D. Slade, P. Viss, and J. A. Fujii. 1987. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. HortScience 22 : 803-806.