

## 액아배양을 통한 쇠무릎(*Achyranthes japonica*)의 대량증식

김광수 · 성낙술<sup>1</sup> · 김명원<sup>2</sup> · 표병식<sup>3</sup> · 황백\*

전남대학교 자연과학대학 생물학과, 호르몬연구센터, 1농촌진흥청 작물시험장 특용작물과,  
<sup>2</sup>연세대학교 자연과학대학 생물학과, <sup>3</sup>동신대학교 식품생물공학과

### Micropropagation of *Achyranthes japonica* Through Axillary Buds Culture

KIM, Kwang Soo · SEUNG, Nak Sul<sup>1</sup> · KIM, Myoung Won<sup>2</sup> · PYO, Byoung Sik<sup>3</sup> · HWANG, Baik\*

Department of Biology & Hormone Research Center, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea:

<sup>1</sup>National Crop Experiment Station, R. D. A., Suwon, 441-100, Korea: and

<sup>2</sup>Department of Biology, Yonsei University, Wonju, 220-702, Korea. <sup>3</sup>Department of Food and Biotechnology, Dongsin University, Naju, 500-714, Korea. \*Corresponding author.

Multiple shoot formation was obtained from excised axillary buds of *Achyranthes japonica* NAKAI cultured on MS media containing various growth regulators such as auxin and cytokinin. The highest average number of shoots was obtained in 1 mg/L NAA and 2 mg/L BA after 6 weeks (25.8 adventitious shoots per node). Although the regeneration rate was less than the former condition, optimal combination for the production of more shoots with a suitable size was 0.5 mg/L NAA and 1 mg/L BA (19.7 adventitious shoots per node). Roots were induced from regenerated shoots after 3 weeks culture, transferred to 1/2 MS medium supplemented with 0.1 mg/L IBA. Micropropagated plants were successfully transferred to soil.

**Key words:** multiple shoot, NAA, BA, IBA

쇠무릎(*Achyranthes japonica* NAKAI)은 비름과에 속하는 다년생 식물로 우리나라를 비롯해 중국, 일본 등에 분포하고 있다. 쇠무릎의 뿌리에는 oleanolic acid계 saponin, inosterone, ecdysterone,  $\beta$ -sitosterol, succinic acid, stigmasterol 등의 성분이 함유되어 있다(Ida et al., 1994; Ogawa et al., 1971). 약리작용으로는 진통, 진경, 이뇨, 혈압강하, 섬유소 용해 등의 효과가 있어(Gupta et al., 1972; Sun et al., 1985), 예로부터 뿌리를 우슬(牛膝)이라 하여 관절통과 같은 율혈의 치료제, 이뇨제, 고혈압, 통경제 등으로 사용되고 있다. 현재 시중에서 판매되고 있는 쇠무릎은 대부분 자생상태의 식물을 채취하여 사용하고 있고 소량이 종자를 직파하여 재배되어 공급되고 있는 실정이나 인건비 상승 등으로 인하여 채취의 어려움과 자연환경의 오염과 훼손 등에 따른 자원식물의 감소에 대처하기 위해서는 이들 식물을 기내에서 배양함으로써 대량증식을 통해 유용 자원식물의 보존과 우량품종의 개발 및 유용 성분의 효율적인 생산 등을 이룰 수 있다(Heyenga et al., 1990; Teixeira et al., 1994). 최근 기내배양에 의한 약용작물의 대량증식에

관한 연구(Krishnan and Seeni, 1994)가 진행되고 있으나 아직은 미흡한 실정이며, 특히 쇠무릎의 대량증식을 위해 조직배양법이 적용되었다는 보고는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 유용자원식물을 보존하고, 유용성분 대량 함유주 생산, 건전한 식물체의 확보와 이들 식물체를 실제 재배 농가에 공급하기 위한 기초연구로써 액아배양을 통한 대량증식의 배양조건을 확립하였으며 이를 보고한다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

전남대학교 교내에서 자생하고 있는 쇠무릎(*Achyranthes japonica* NAKAI)의 정단부위를 채취, 수도물로 세척하여 70%의 에탄올에 수초간 침지한 후 1-2 방울의 Tween 20을 첨가한 2% sodium hypochlorite 용액에서 5분간 표면살균하고 멸균수로 3-4회 세척하여 멸균된 여과지로 물기를 제거

한 후 3% sucrose, 0.2% gelite, pH 5.8로 조정된 MS (Murashige and Skoog, 1962) 고형배지에 치상하여 기내에서 무균적으로 배양하였다.

Multiple shoot의 유도

기내배양 중인 쇠무릎에서 multiple shoot를 유도하기 위하여 액아를 함유한 마디를 약 1 cm의 길이로 잘라 0 - 2 mg/L의 NAA, 2,4-D 및 0 - 5 mg/L의 BA가 단용 또는 농도별로 혼용 첨가된 MS 고형배지(3% sucrose, 0.2% gelite, pH 5.8)를 사용하였다. 각각 15 ml 씩 담긴 시험관(φ 1.5 cm × 12 cm)에 10 반복씩 치상하여 광량 50 μmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 광주기 16/8 시간, 온도 25 ± 1°C에서 6주간 배양하여 신초의 발생 양상과 수를 관찰하였다.

신초로부터 뿌리 유도

액아로부터 발생한 신초의 성장 및 발근을 위한 적정 배지, 성장조절제의 종류 및 농도를 규명하기 위해 약 2 cm의 길이로 잘라 IBA와 2,4-D가 0.05 - 1 mg/L의 농도로 첨가된 MS 고형배지와 무기염의 농도를 1/2로 줄인 1/2 MS 고형배지(3% sucrose, 0.2% gelite, pH 5.8)를 사용하였다. 각각 15 mL 씩 담긴 시험관(φ 1.5 cm × 12 cm)에 10 반복씩 치상하여 광량 50 μmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 광주기 16/8 시간, 온도 25 ± 1°C에서 3주간 배양하여 신초의 생육상태 및 뿌리의 발생 양상 및 수, 길이를 측정 하였다.

결과 및 고찰

Multiple shoot의 유도

기내에서 배양중인 쇠무릎에서 액아를 절취하여 NAA, 2,4-D 및 BA가 첨가된 MS배지에서 배양한 결과, BA 단독 처리구에서의 전반적인 반응은 첨가된 BA의 양이 많아질수록 발생하는 신초의 수가 비례하여 많았으나 크기는 작아지는 것으로 나타났다(Table 1). 2,4-D와 BA의 조합처리구에서는 신초의 발생 빈도가 낮고 발생한 신초의 크기도 작은 반면에 부정근의 발생과 치상 기저부의 캘러스 형성으로, 신초의 발생에는 좋지 않음을 보였다(Fig. 1-A). 한편 NAA와 BA의 조합 처리구에서는 부정근과 캘러스의 형성이 적게 일어나는 반면에 신초의 발생이 BA 단독 및 2,4-D와 BA 조합처리구 보다 많았다. 발생한 신초의 수는 1 mg/L NAA와 2 mg/L BA가 첨가된 처리구에서 액아 당 평균 25.8개로 가장 많았으나 신초의 크기가 작으며, 유리화(vitrification)로 인한 기형적인 줄기의 발생이 많고, 엽록체의 발달이 미약하고 색소(Betanin)의 침적이 많아 전체적으

Table 1. Effect of growth regulator on shoot multiplication from axillary bud cultures of *A. japonica* after 6 weeks in culture. Each value represents the mean of 10 replicates.

Growth regulator (mg/L)			No. shoots/axillary bud	Shoot length (cm)	Callus & root formation(%)	
BA	2,4-D	NAA			callus	root
Control			1.6	9.7	-	
1			4.8	3.3	20	
2			5.4	2.6	-	
5			9.8	0.8	-	
0.5	0.5		2.4	3.4	60	100
		1	2.3	1.6	90	80
		2	4.1	1.7	100	50
1	0.5		4.0	4.5	80	100
		1	4.7	3.0	100	80
		2	0.7	1.1	100	30
2	0.5		8.7	2.1	80	90
		1	2.7	0.7	90	20
		2	-	-	100	20
0.5	0.5		10.4	2.5	20	10
		1	4.6	6.8	30	30
		2	4.8	3.6	80	-
1	0.5		19.7	3.5	10	20
		1	16.4	2.0	30	-
		2	1.7	2.8	100	-
2	0.5		19.5	1.6	60	-
		1	25.8	0.8	80	-
		2	-	-	100	-

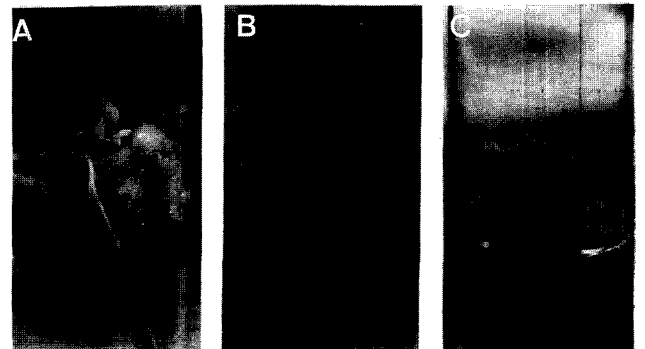


Figure 1. Micropropagation of *A. japonica* through axillary bud culture. A: Callus and root formation from axillary bud cultures on MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D and 2 mg/L BA. B and C: Multiple shoot formation from axillary bud cultures on MS medium supplemented with 1 mg/L NAA and 2 mg/L BA(B) and 0.5 mg/L NAA and 1 mg/L BA(C) after 6 weeks culture.

로 붉은색을 띄고 있어 이 신초를 절취하여 배양한 결과, 완전한 식물체로의 발달이 어려웠다. 또한 오옥신류인 NAA와 2,4-D가 2 mg/L 이상 첨가된 처리구에서는 신초의 발생이 없거나 불량하고 캘러스의 발생이 두드러졌다. 이와 같은 현상은 높은 농도의 오옥신 활성화로 인한 것으로 사료되며, 치상 기저부에서의 심한 캘러스화가 신초의 발달 및

성장을 저해하는 것으로 보였다(Fig. 1-B). 신초의 발생 빈도와 발생된 신초가 완전한 식물체로 자라기 위한 적절한 크기를 고려할 때의 조합은 0.5 mg/L NAA와 1 mg/L BA가 첨가된 처리구에서 액아 당 19.7개의 신초가 발생하였으며 발생된 신초도 양호한 성장을 보여 가장 좋은 결과를 얻었다(Table 1, Fig. 1-C). 한편 Hasegawa (1979)와 Rha와 Kim (1996)의 장미와 지황의 배양에 있어 BA 단독처리구에 비해 BA와 NAA의 조합처리구가 신초의 발생 반응과 수가 저조하다고 했지만, Jha와 Jha(1989)는 식물체의 재분화시 사이토키닌의 단독처리 보다 오옥신과의 조합처리 때 좋은 결과를 보인 것과 마찬가지로 본 실험에서도 BA 단독처리 보다 BA와 NAA를 조합처리가 신초의 발생이 양호하여 식물의 종에 따라 반응의 차이가 다양함을 보였다.

Multiple shoot로부터 뿌리 유도

액아로부터 발생한 신초의 성장 및 발근을 위한 적정 배지, 성장조절제의 종류 및 농도를 규명하기 위해 약 2 cm로 신초를 절취하여 IBA와 2,4-D를 각각 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 mg/L의 농도로 첨가한 MS 기본배지 및 1/2 MS배지에 3주간 배양한 결과, MS 기본배지보다 1/2 MS배지에서 뿌리의 발생, 신장 및 신초의 성장이 전반적으로 양호하여, 염의 농도에 따른 뿌리의 발생 양상이 다르게 나타났다(Table 2). 한편, 2,4-D와 IBA처리구 모두에서 첨가된 양에 비례하여 발생된 뿌리의 수는 증가한 반면에 뿌리의 신장 및 신초의 성장은 억제되는 것으로 나타났다(Table 2). 2,4-D 첨가구에서는 뿌리의 발생 빈도는 높았으나 신장이 잘 이루어지지 않았고 발생된 뿌리의 캘러스화로 신초의 전체적인 생장도 불량하여(Fig. 2-A), Kang 등(1996)의 상추 실험에서 2,4-D가 부정근의 근원기 형성단계에는 촉진적이지만 부정근의 신장 단계에서는 억제된다는 보고와 유사한 결과를 보였다. 한편 IBA 처리구는 뿌리의 발생 빈도는 낮으나 길이 성장 및 신초의 성장 등이 2,4-D처리구에 비해 양호하였으며, 특히 0.1 mg/L IBA가 첨가된 1/2 MS 배지에서 뿌리의 신장 및 줄기의 성장과 전개된 잎의 개수 등 전반적인 식물체의 생육이 왕성하여(Fig. 2-B), 증식된 신초의 발근과 성장에 가장 좋은 결과를 얻었다. 뿌리가 발생된 식물체의 잎을 제거하고 버미큐라이트가 담긴 화분으로 이식한 후 랩으로 덮어 상대습도를 85%로 유지시켜 약 2주간 순화시키면 완전히 활착하여 쇠무릎의 액아 배양을 통한 다량증식의 가능성을 확인하였다.

적 요

쇠무릎(*A. japonica*) 다량증식 방법의 일환으로 액아를 이용한 multiple shoot유도를 위한 최적 조건을 조사하였다. 기

Table 2. Effect of IBA and 2,4-D on shoot elongation and root growth from explant of *A. japonica* after 3 weeks in culture. Each value represents the mean of 10 replicates.

Medium	Growth regulator(mg/L)		No. roots /explant	Root length (cm)	Shoot length (cm)
	IBA	2,4-D			
Full strength MS	0.05		2.7	2.1	4.8
	0.1		6.8	4.8	7.8
	0.2		8.9	3.5	5.3
	0.5		7.2	2.0	3.6
	1.0		10.4	1.3	3.5
		0.05	5.0	2.6	5.7
		0.1	9.2	1.6	4.2
		0.2	13.9	1.4	3.5
		0.5	17.5	1.1	3.0
		1.0	17.8	0.8	2.4
Half strength MS	0.05		2.9	3.4	5.8
	0.1		10.8	6.3	8.5
	0.2		10.9	3.1	7.3
	0.5		9.4	2.8	4.8
	1.0		12.4	1.5	3.5
		0.05	7.0	2.7	5.1
		0.1	11.2	1.8	3.9
		0.2	11.9	1.3	4.7
		0.5	21.5	0.7	4.0
		1.0	22.8	0.8	3.4

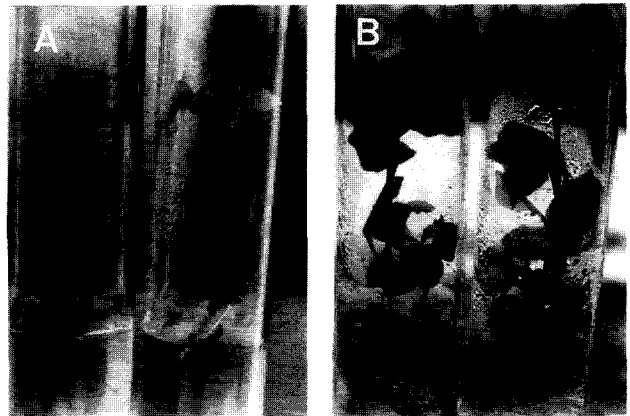


Figure 2. Regenerated shoots were rooted on 1/2 MS medium supplemented with 0.1 mg/L 2,4-D(A) and 0.1 mg/L IBA(B) after 3 weeks in culture.

내에서 증식하고 있는 식물체로부터 액아를 적출하여 NAA, 2,4-D 및 BA가 여러 농도로 첨가된 MS 배지(3% sucrose, 0.2% gelrite)에서 6주 간 배양한 결과, shoot의 발생은 1 mg/L NAA와 2 mg/L BA가 첨가된 처리구에서 액아 당 평균 25.8개로 가장 많았다. 신초의 발생 빈도는 조금 낮지만 발생된 신초가 완전한 식물체로 되기 위한 크기를 고려할 때의 조합은 0.5 mg/L NAA와 1 mg/L BA가 첨가된 처리구에서 액아 당 19.7개의 신초가 발생하여 가장 좋은 결과를 얻었다. 한편 발생된 신초는 절취하여 0.1 mg/L IBA가

첨가된 1/2 MS 배지에서 배양했을 때 뿌리의 발생과 신장이 가장 양호하였으며, 식물체의 생육도 왕성하였다. 발근된 식물체를 기외로 이식 후 활착시켜 쇠무릎의 액아 배양을 통한 다량증식의 가능성을 확인하였다.

시사-본 연구는 1997년도 농업특정연구개발사업 연구비 지원에 의한 것입니다.

## REFERENCES

- Ida Y, Katsumata M, Satoh Y, Shoji J (1994) Glucuronide saponins of oleanolic acid from *Achyranthes fauriei* roots. *Planta Med* 60: 286-287
- Gupta SS, Bhagwat AW, Ram AK (1972) Cardiac stimulant activity of saponin of *Achyranthes aspera*. *Indian J Med Res* 60: 462-471
- Hasegawa PM (1979) In vitro propagation of rose. *Hortscience* 14: 610-612
- Heyenga AG, Lucas JL, Dewick PM (1990) Production of tumor-inhibitory lignans in callus cultures of *Podophyllum hexandrum*. *Plant Cell Reports* 9: 382-385
- Jha S, Jha TB (1989) Micropropagation of *Cephaelis ipecacuanha* Rich. *Plant Cell Reports* 8: 437-439
- Kang MK, Cho DY, Soh WY (1996) Effect of auxins on adventitious root formation on cotyledon-derived microcalli in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Korean J Plant Tissue Culture* 23: 135-139
- Krishnan PN, Seeni S (1994) Rapid micropropagation of *Woodfordia fruticosa* (L.) Kurz (Lythraceae), a rare medicinal plant. *Plant Cell Reports* 14: 55-58
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Ogawa S, Nishimoto N, Okamoto N, Takemoto T (1971) Constituents of *Achyranthes radix*. VIII. Insect-molting substances in *Achyranthes* genus. 2. *Yakugaku Zasshi* 91: 916-920
- Rha ES, Kim JK (1996) Plant regeneration in leaf explant cultures of *Rehmannia glutinosa* Liboschitz. *Korean J Plant Tissue Culture* 23: 299-302
- Sun SP, Li XH, Sun SS (1985) Pharmacological studies on *Achyranthes bidentata*. *Henan Trad Chin Med* 39-40
- Teixeira JB, Sondahl MR, Kirby EG (1994) Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. *Plant Cell Reports* 13: 247-250

(1997년 8월 27일 접수)