

## 야생 현호색 (*Corydalis remota* for. *peatinata*)의 꽃자루로부터 체세포배 발생과 소식물체형성

천우재 · 이대원\*

동국대학교 자연과학대학 생물학과

### Plantlet Formation and Somatic Embryogenesis from the penduncle explants of wild *Corydalis remota* for. *peatinata*

CHEON, Woo Jae · LEE, Dae Won\*

Department of Biology, Dongguk University, Kyongju, 780-714, Korea

**ABSTRACT** For the induction of somatic embryogenic callus, the penduncle explants of *Corydalis remota* for. *peatinata* were cultured on MS basal media supplemented with 2,4-D, kinetin and zeatin. The highest embryogenic callus formation was observed on the media containing 2.0 mg/L of 2,4-D and 2.0 mg/L of zeatin. The somatic embryogenesis on the media with 0.5 mg/L of cytokinin (zeatin or kinetin) were excellent under light condition, however somatic embryos abnormally developed into plantlets. Normal dicotyledonary plantlets were found on MS medium supplemented with 1.0 mg/L of zeatin. When MS medium with 2,4-D plus cytokinin and with BAP were used, the secondary somatic embryogenesis took place in root explants of the regenerants derived from *in vitro* somatic embryogenic callus.

**Key words:** Somatic embryogenic callus, regenerant, cytokinin

## 서 론

현호색속은 우리나라 전 지역의 산야에 자생하는 다년생 초본으로 양귀비과 (*Papaveraceae*)에 속하는 식물군으로서 (Smith 1980; Kim and Oh 1987), 속내의 대부분 종들은 음지의 수분이 많은 곳에서 군락의 형태로써 자생한다. *Corydalis* 속은 지역간, 종간, 개체간에도 서로 변이가 아주 크므로 분류학자에 따라 그 분류를 달리 하기도 한다.

*Corydalis*속의 종들은 일반적으로 많은 알칼로이드 물질을 함유하고 있다. 한방요법에서 부인병의 진경과 진통제로 많이 사용되어 왔고, 동의보감에서는 복방으로 70여 처방에 쓰일 뿐만 아니라 단방으로도 쓰이며, 현재도 안중산 (安中散) 등의 생약제제에 널리 배합되고 있다 (Yamahara et al. 1986).

Tetrahydropalmatine (THP)은 진통작용이 morphine보다는 약하나 연속 사용에 있어서도 내성을 나타내지 않는 장점이 있어 중국에서는 이미 의약품으로 개발되어 사용하고 있다 (Tang et al. 1992).

식물 조직배양을 통한 유용물질의 생산에 관한 연구는 특정한 유용물질 생산의 극대화 수단으로 이용되고 있다 (Choi and Soh 1995; Kim et al. 1996). 이미 현호색을 대상으로 기내 배양을 통하여 특정한 berberine (Takao et al. 1976; Iwasa et al. 1982; 1987a; 1987b; 1989; 1995; Shin et al. 1996), protopine (Iwasa et al. 1982; Takao et al. 1976)과 같은 유용물질의 생합성을 위한 연구가 이루어져 왔다. 그러나 아직까지 현호색의 체세포배발생에 관한 연구 결과가 보고되지 않고 있다. 따라서 본 실험에서는 국내에서 자생하고 있고 일부 분류학자들로부터 덧잎 현호색이라고 불리워지기도 하는 *Corydalis remota* for. *peatinata*로부터 체세포 배발생 및 재분화를 시도하여 결과를 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

\*Corresponding author. Tel 0561-770-2214

E-mail dwleebio@mail.dongguk.ac.kr

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 살균

실험재료는 현호색종 중에서 일반적으로 닳잎 현호색이라고 불리워지기도 하는 *Corydalis remota* for. *peatinata*이다. 1996년과 1997년의 2년에 걸쳐 매년 4월경, 경상북도 경주시 안강읍 소재의 옥산서원 주변에서 채집되어 충북대학교 생물학과 오병운교수에 의해 식물 동정되었으며, 표본은 동국대학교 생물학과 표본실에 보관되어 있다.

멸균은 자방과 꽃자루 전체부분을 70% 에탄올에 1분간, 1.5% sodium hypochlorite에 3분간 소독한 후, 멸균수로 1회 10분씩 3회 수세하여 식물체 전체 길이가 30±3 cm인 것을 선택하여 자방의 밑부분과 꽃자루 부분을 절단하여 꽃자루 조직절편만을 치상하였다.

### 배발생캘러스의 유기 및 선별

캘러스 유도를 위한 배지는 MS배지에 2,4-D를 여러 농도로 단일 처리한 배지와 이에 kinetin과 zeatin을 농도별로 혼합처리한 배지를 이용했다. 배양온도는 24±2°C로 하였으며, 계대 배양 주기는 30일로 암조건에서 유도하였다. 캘러스유도율은 캘러스유도 절편 수/ 전체 절편의 치상수로 계산하였으며, 한번에 30개, 총 60절편을 치상하여 2회 실험하였다. Sucrose 30 g/L, casein 1 g/L, phytigel 4 g/L을 첨가하고 121°C에서 20분간 가압 멸균하고 pH를 5.8로 조정하였다. 암조건에서 30일 주기로 계대배양되던 캘러스로부터 약 3~6개월 후부터 배발생 캘러스가 형성되었다. 배발생 캘러스는 비교적 균일하고 구형이면서 세포가 촘촘하며 백색을 띠는 것으로 0.5 cm<sup>3</sup>의 정방형으로 절단한 후 체세포 배형성 배지에 치상하였다.

### 체세포배발생

배지는 MS 기본배지에 성장조절물질의 경우 cytokinin류 (kinetin, zeatin, BAP)를 0.1 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L, 그리고 2 mg/L의 농도로 단독처리한 배지와 2,4-D를 0.1 mg/L로 미량 혼용 처리한 배지를 이용하였다. 또한 MS배지의 ammonium nitrate와 potassium nitrate의 농도를 1/2로 낮추어서 각각의 성장조절물질의 농도를 조절하여 사용하였다. 체세포 배발생을 위한 배양조건은 암조건과 광조건 (형광등: 24 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 16 h 광주기)에서 행하여 졌으며 이들의 식물성장조절물질의 농도를 통해 배발생 캘러스로부터의 체세포배형성을 비교하였다.

### 재분화배지 및 배양조건

배발생 후 다시 완전한 식물체로의 재분화 실험을 위하여

광조건 (형광등: 24 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 16 h 광주기)에서 재분화 배지는 MS 배지에 cytokinin류 (zeatin, kinetin, BAP)를 1 mg/L, 2 mg/L로 조정하여 사용하였다. 이때 자연형 배나 어뢰형 배보다 가급적으로 분화가 적게 진행된 심장형 배나 구형 배를 선별하여 치상하여 재분화율을 조사하였다. 온도 및 기타조건은 체세포배발생과 동일한 조건으로 유지하였다.

## 결과 및 고찰

### 캘러스의 유도

기내배양을 통한 캘러스 유도는 식물의 종에 따라 또는 식물체내에서도 배양에 이용되는 조직부위 및 배양조건과 방법에 따라 그 양상이 상당히 달라진다. 예비실험에서 잎, 줄기, 구근, 꽃자루 등 조직별 캘러스 유도율을 조사한 바 치상조직 중 꽃자루에서 캘러스 유도율이 가장 높았다.

생장조절 물질에 따른 캘러스 유도율을 비교하면, 2,4-D만을 단독 첨가한 배지에서는 유도되는 캘러스가 적었고, 유도된 캘러스도 몇 차례의 계대배양 후 서서히 갈변하면서 괴사하는 현상을 나타냈다. 일반적으로 2,4-D를 단독 첨가한 배지보다 2,4-D와 cytokinin류를 혼용 첨가한 배지에서 월등히 높은 캘러스 유도율을 나타냈으며, kinetin보다는 zeatin처리 시 더 높았다. 이는 담배 캘러스의 성장촉진에 미치는 cytokinin의 효과에서 나타난 것과 동일한 결과 (Skoog et al. 1967)를 보여 주고 있다. Cytokinin농도는 kinetin과 zeatin 모두 1 mg/L보다 2 mg/L 첨가했을 때 더 많은 캘러스가 형성되었다. 이와 같이 식물성장조절물질의 농도가 증가함에 따라 캘러스 유도율이 높아지는 추세를 보여 2,4-D 2.0 mg/L에 zeatin 2.0 mg/L를 혼용 처리한 배지에서 가장 양호한 캘러스 유도 및 성장률을 나타냈다 (Figure 1).

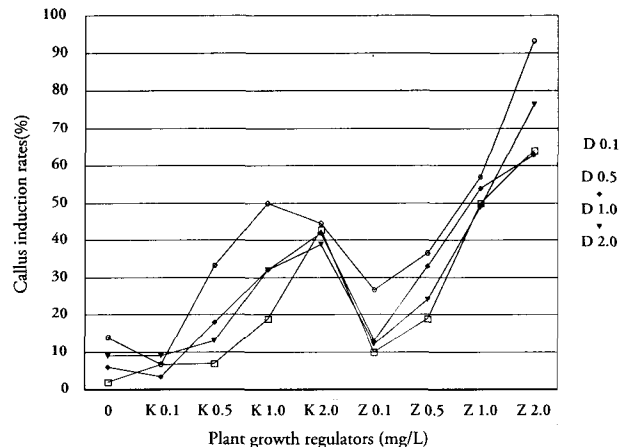
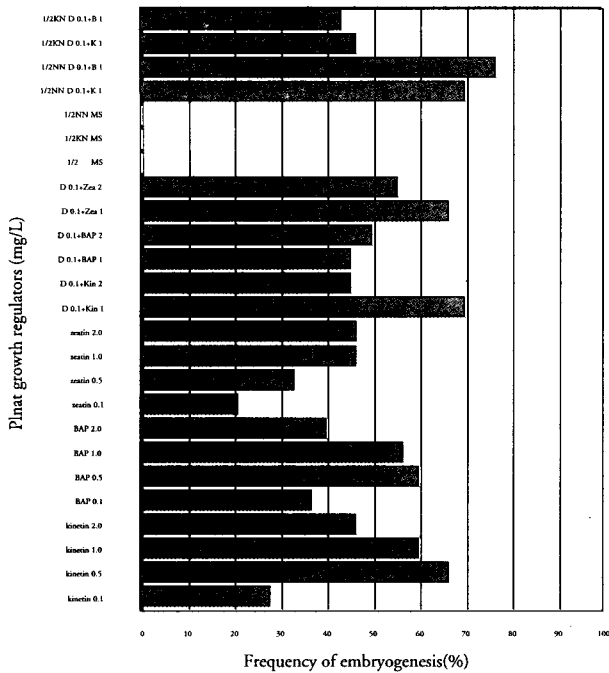


Figure 1. Effects of plant growth regulators on callus formation from penduncle of *Corydalis remota* for. *peatinata*. D, 2,4-D; K, kinetin; Z, zeatin.



**Figure 2.** Effects of plant growth regulators on somatic embryogenesis from embryogenic calli of penduncle of *C. remota* for *peatinata*. Numbers represent the concentration applied. MS medium combined with various plant growth regulators. D, 2,4-D; K, kinetin; B, BAP; 1/2NN,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0.82 g/L); 1/2KN,  $\text{KNO}_3$  (0.95 g/L).

배양 10일 경과 후 절편체로부터 엷은 황색의 물질이 분비되며, 배양 15~30일 후부터 비교적, 불규칙적으로 황색의 캘러스가 유도되었는데, 이는 같은 양귀비과 식물인 애기똥풀의 경우와 유사한 현상으로 보여진다 (Woo et al. 1996). 현호색의 여러 조직으로부터 캘러스를 유도하였는바, 각 조직으로부터 캘러스가 유도될 때 서로 다른 색의 물질을 분비하였다.

**체세포배발생을 위한 식물생장조절물질의 효과**

꽃자루에서 유래된 배형성 캘러스로부터 식물생장조절물질이 체세포배의 발생에 미치는 영향은 광조건하 cytokinin류를 단독 첨가하였을 때 양호하였으며, cytokinin류의 농도가 0.5 mg/L에서 높은 발생율을 나타냈다 (Figure 2). 암조건에서는 모든 배형성 캘러스가 부정근의 형태로 발달하다가 갈변하면서 더 이상 성장하지 않았다.

2,4-D를 미량 (0.1 mg/L) 첨가한 혼용배지에서는 단독 첨가한 배지에서보다 약간 높은 배발생율을 나타냈다. 그러나 BAP의 경우에는 별다른 유의차가 없었다. 그리고 MS기본배지에 ammonium nitrate와 potassium nitrate의 농도를 1/2로 조정된 배지에서 각각 2,4-D 0.1 mg/L와 cytokinin류인 BAP, kinetin, zeatin을 1 mg/L씩 혼용첨가한 경우에는 ammonium nitrate의 농도를 1/2로 조정된 것이 대체적으로 높은 체세포배 발생율을 나타냈다. 특히 ammonium nitrate



**Figure 3.** Various development stages of somatic embryos derived from embryogenic callus from penduncle of *C. remota* for *peatinata* on MS medium supplemented with 0.1 mg/L 2,4-D and 1 mg/L kinetin. A, Globular embryo after six weeks of culture; B, Heart-shaped embryo after eight weeks of culture; C, Torpedo-shaped embryo; D, cotyledonary embryo after ten weeks.

의 농도를 1/2로 조정된 배지에 2,4-D 0.1 mg/L 를 첨가하고 BAP 1.0 mg/L을 혼용 처리한 배지에서 가장 높은 체세포배 발생율을 나타냈다 (Figure 2). 이러한 결과는 일부 다른 식물체에서 체세포배발생율을 높이는 방법으로 미량의 auxin계의 식물생장조절물질을 첨가하고, MS배지의 질소원의 농도를 증감시키므로서 배발생율을 높일 수 있다는 보고와 유사하게 나타났다 (Eun et al. 1995). 암조건에서는 모든 배형성 캘러스가 부정근의 형태로 발달하다가 갈변하면서 더 이상 성장하지 않았다.

식물생장조절물질을 첨가하지 않고 ammonium nitrate의 농도만을 1/2로 조정된 MS배지에서는 MS기본배지와 마찬가지로 체세포배가 발생하지 않고 급속히 갈변되었다.

일반적으로 배발생캘러스를 체세포 배발생 배지에 옮긴 다음 배양 6주부터 체세포가 형성되기 시작되었다. 체세포배형성은 분화단계별로, 구형의 배에서 심장형 배로, 다시 어리형 배로 진행되었고, 그후 자엽과 같은 형태로 배발생의 4단계가 명확히 나타났다 (Figure 3).

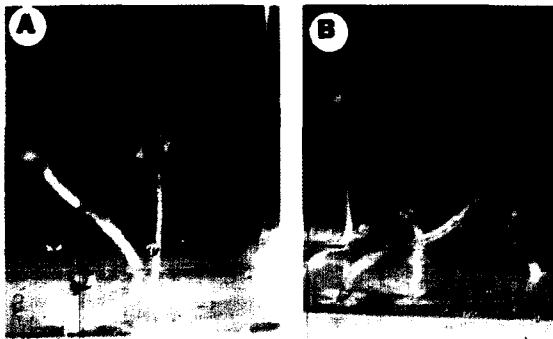
**소식물체 형성을 위한 배지의 영향**

체세포배가 형성되고 난 후, MS기본배지에 kinetin과 zeatin을 1 mg/L, 2 mg/L씩 각각 단독 처리한 배지에 옮겼을 경우 쌍자엽이 많이 형성되었으며, 특히 zeatin 1.0 mg/L을

**Table 1.** Effect of plant growth regulators for dicotyledonary embryo formation.

Medium	Plant growth regulators (mg/L)			Dicotyledonary embryo formation(%)
	kinetin	zeatin	BAP	
MS	0.5	0.0	0.0	+
	1.0	0.0	0.0	++
	2.0	0.0	0.0	++
	0.0	0.5	0.0	+
	0.0	1.0	0.0	+++
	0.0	2.0	0.0	++
	0.0	0.0	0.5	-
	0.0	0.0	1.0	-
	0.0	0.0	2.0	+

\*(+: 20%, ++:40%, +++:60%, -:0%).



**Figure 4.** Different shape of cotyledons derived from somatic embryos of *C. remota* for. *peatinata*. A, dicotyledonary-shape ; B, monocotyledonary-shape.

단독처리한 경우가 가장 형성률이 높은 것으로 나타났다 (Table 1, Figure 4b). 그러나 cytokinin의 농도가 0.5이하인 경우에는 대부분 갈변되어 분화가 이루어지지 않았다. 또한 체세포 배 발생 배지를 그대로 유지하여 계대배양했을 경우 대부분 기형인 단자엽으로 성장을 계속하였고 뿌리의 형성이 잘되지 않았다 (Figure 4a).

그리고 2,4-D를 미량 첨가하고 cytokinin류를 혼용첨가한 배지나 BAP를 단독 처리한 배지에서는 이상 비대현상이 많이 나타났으며, 소식물체의 배지 접지면인 뿌리부분에 활발한 2차 배발생이 다시 나타났다. 이는 재분화 조직의 배발생이 잠재력 유도 (Litz and Gray 1995)에 의해서 이루어지는 것으로 생각된다.

## 적 요

*Corydalis remota* for. *peatinata*의 꽃자루에서 캘러스를 유도한 후 MS기본배지에 성장조절물질을 첨가하여 체세포 배발생 및 재분화를 시도하였다. 성장조절 물질에 따른 캘러스 유도율을 비교하면 2,4-D 2.0 mg/L 에 zeatin 2.0 mg/L를 혼용 처리한 배지에서 아주 양호한 캘러스 유도 및 성장을

나타냈다. 식물생장조절물질 또는 호르몬 첨가에 의한 체세포 배의 발생율은 광조건에서 cytokinin류의 농도가 0.5 mg/L 단독 첨가한 배지에서 가장 높았다. 또한 발생된 부정배중 MS기본배지에 zeatin 1.0 mg/L을 단독처리한 경우가 가장 쌍자엽형성율이 높은 것으로 나타났다. 또한 2,4-D를 미량 첨가하고 cytokinin류를 혼용첨가한 배지나 BAP를 단독 처리한 배지에서는 소식물체의 배지 접지면인 뿌리부분에 활발한 2차 배발생이 나타났다.

## 인용문헌

- Kim YS, Oh BU (1987) A taxonomic study of Korean *Corydalis* on the morphological characters. *Kor J Plant Tax* 17(2):73
- Choi YE, Soh WY (1995) Effects of growth regulators on somatic embryogenesis from ginseng zygotic embryos. *Kor J Plant Tiss Cult* 22(3):157-163
- Eun JS, Ko JA, Kim YS, Kim MJ (1995) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo culture of *Wasabia japonica* Matsum. *Kor J Plant Tiss Cult* 22(4):207-211
- Iwasa K, Kamigauchi M, Takao N (1987a) Biotransformation of phthalideiso quinoline alkaloids by *Corydalis* tissue cultures. *Arch Pharm (Weinheim)* 320: 693-697
- Iwasa K, Kondoh Y, Kamigauchi M (1995) Studies on the metabolism of quaternary protoberberine alkaloids in cell cultures of *Corydalis pallida* Var. *Tenius* and *Corydalis incisa*. *J Nat Prod* 38(3):379-391
- Iwasa K, Tomii A, Takao N (1987b) Biotransformation of the 1,3-hydroxytetrahydro-protoberberine N-methyl salts by callus cultures of *Corydalis* species. *Heterocycles* 22:33-38
- Iwasa K, Takao N (1982) Formation of alkaloids in *Corydalis ophiocarpa* callus culture. *Phytochemistry* 21:611-614
- Iwasa K, Kamigauchi M, Takao N, Cushman MM, Chen JK, Wong WC, McKenzie A (1989) Synthesis and evaluation of hypothetical intermediates in the biosynthetic conversion of protoberberine to benzo (c)phenanthridine alkaloids. Evidence for oxidative C-N bond fission followed by intramolecular recyclization in cell culture of *Corydalis indica*. *J Amer Chem Soc* 111:7925-7931
- Litz RE, Gray DJ (1995) Somatic embryogenesis for agricultural improvement, *World J Microbio Biotechnol* 11:416-425
- Kim JC, Park YC, Lee KW, Cho SH, Han TJ (1996) Multi-secondary somatic embryogenesis and plant regeneration from shoot-tip cultures of *Pimpinella brachycarpa*. *Kor J Plant Tiss Cult* 23(3):189-194
- Shin SW, Chang JI, Chi HJ (1996) Study on production of alkaloid by plant cell culture of *Corydalis remota*. *Kor J Pharm* 27(4):289-294
- Skoog F, Hamzi HQ, Szweykowska AM, Leonard NJ, Carraway KL, Fujii T, Helgeson JP, Loeppky, RN (1967) Cytokinins:

- Structure/activity relationships. *Phytochemistry* **6**:1169-1192
- Smith AC** (1980) An appraisal of the orders and families of primitive extant angiosperm, *J. Indian Bot Soc Olden Jubilee Vol.* **50A**, pp215
- Takao N, Iwasa K, Kamigauchi M, Sugiura M** (1976) Studies on the alkaloids of *Papaveraceous* plants. XXV1. The alkaloids of *Corydalis incisa* PERs. and *Chelidonium majus* L. incorporations of tetrahydroprotoberberines, N-methosalts of tetrahydroprotoberberines, and protopine. *Chem Pharm Bull* **24(11)**:2859-2868
- Woo JW, Huh GH, Ahn MY, Kim SW, Liu JR** (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration in pedicel explant cultures of *Chelidonium majus var.asiaticum* *Kor J Plant Tiss Cult* **23**: 363-366
- Yamahara J, Kimira H, Kobayashi M, Sawada H, Fujimira H** (1986) Pharmacological properties of Anchusan (安中散) a chinese herbal medicine. *Shoyakugaku Zassbi* **40(2)**:123

(접수일자 1998년 9월 7일)