

천궁 (*Cnidium officinale* M.)의 화기절편으로부터 형성된 체세포배의 자엽구조와 발아

조덕이* · 이은경¹ · 소용영¹

우석대학교 이공대학 생명공학부,

¹전북대학교 자연과학대학 생물과학부

Cotyledon Structure and Germinability of Somatic Embryos Formed from Inflorescence Explants of *Cnidium officinale* M.

CHO, Duck-Yee* · LEE, Eun Kyong¹ · SOH, Woong-Young¹

Department of Biology, WooSuk University, Chonbuk, 565-701, Korea

¹Department of Biological Sciences, Chonbuk National University, Chonju, 561-756, Korea

ABSTRACT Calli were induced from the explants of inflorescence, petiole and leaf blade of *Cnidium officinale* on MS medium with 2.4-D, while embryogenic callus was induced only from inflorescence explants. Somatic embryos of 78 per explant were formed during subculture of the explants on medium without 2.4-D after culture on medium with 2 mg/L 2.4-D. Cotyledonary variation, cup-shaped cotyledon of 49 % and other abnormal cotyledons of 13.5 % was observed on the somatic embryos. However this variation could be overcome by the addition of activated charcoal onto culture medium. Somatic embryos at cotyledonary stage germinated on MS basal medium but the germination rate was very poor, about 50 %. Somatic embryos on the medium with activated charcoal showed improved germination.

Key words : Embryogenic explant, somatic embryogenesis, cotyledonary variation, germination, activated charcoal

서 론

산형과 (Apiaceae)의 미나리아과 (Subfam. Apioideae) 회향아족 (Subtribe Foeniculinae)에 속하는 천궁속 (*Cnidium*)은 아시아 전역, 유럽 및 아프리카에 4종이 분포하고 있으며 Pimenov and Leonov (1993), 천궁은 고산 습지와 냇가에서 잘 자라며 숙근성 약용식물로서 진통, 보혈, 강장, 두통, 청혈 및 냉증제거등에 복용되고 있어서 약용 및 경제적으로 그 가치가 높은 식물이다 (Chang et al. 1988). 특히 한국산 천궁은 일본 천궁에 비하여 약효가 매우 특출한 것으로 알려져있다.

이와 같이 중요한 천궁은 재배과정에서 종자형성이 어려우므로 근경으로부터 영양증식을 하게 되는데 선충 및 마이코플라스마의 피해등으로 생산성에서 한계가 있다 (Lee et al. 1994). 따라서 천궁의 체세포배 발생을 통한 식물체 재생에 의한 대량 번식체계를 확립할 필요가 있다.

산형과 식물중 당근 (Steward et al. 1958), 켈러리 (William et al. 1976), 파드득 나물, 미나리 (Kim et al. 1991), 시호 (Cho et al. 1995), 당귀 (Cho et al. 1998) 및 강활 (Cho and Soh 1998) 등에서 체세포배 형성을 통한 식물체 재생체계가 확립되어 있다. 이와같이 체세포배 형성을 통한 식물체 재생에 의한 대량번식은 산형과 식물의 시호 (Cho et al., 1995), 당귀 (Cho et al. 1998) 및 강활 (Cho and Soh 1998) 등 약용식물에서 이루어지고 있으나 조직배양방법에 의한 천궁에 관한 연구는 경정배양 이외에 (Lee et al. 1994) 거의 보

고된 바 없으므로 본 연구에서는 천궁의 체세포배의 발생조건을 산형과의 다른 식물의 경우와 비교하는 동시에 체세포배의 자엽변이와 발아능력을 밝히고자 시도되었다.

재료 및 방법

천궁 (*Cnidium officinale* M.)의 엽신, 엽병 및 미성숙 화기를 70% 에탄올에서 1분간, 1% sodium hypochlorite 용액에서 15분간 표면살균 후 무균수로 세번 행구었다. 각각의 절편은 30 mg/L 자당, 0.8% 한천 및 여러가지 농도의 (1, 2, 3, 4, 5 mg/L)의 2,4-D가 첨가된 MS 기본배지 (Murashige and Skoog, 1962)에 치상하였다. 한천을 넣기전에 pH 5.8로 맞추고 121°C에서 15분간 고압멸균한 배지를 100 mL 삼각플라스크에 40 mL씩 분주하고 절편을 4개씩 치상하여 $46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 16시간 광주기의 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 배양실에서 8주간 배양하였다. 각각의 조건에서 유도된 캘러스를 증식시킨 후 식물생장 조절제가 첨가되지 아니한 MS 기본배지에 옮겨 체세포배 발생률과 자엽변이율을 관찰하였다. 또한 체세포배 발생에 미치는 활성탄의 영향을 밝히고자 배형성능 캘러스를 MS 기본배지에 여러가지 농도로 활성탄을 첨가하여 배양하였으며 형성된 자엽시기의 체세포배의 자엽구조를 관찰하였다. 자엽기의 체세포배를 1/2 MS 기본 배지에 옮겨서 발아능력을 관찰하였으며 발아판별기준은 뿌리와 제 1잎이 자라나온 것으로 정했다.

결과 및 고찰

천궁의 잎, 엽병 및 화기조직을 여러가지 농도의 2,4-D (1, 2, 3, 4, 5 mg/L)가 첨가된 MS 배지에 이식하여 8주간 배양하면 진주황색의 캘러스가 형성되었다. 캘러스 유기율은 외식편의 종류에 따라서 다르게 나타났다. 화기조직을 배양하면 1 mg/L 2,4-D 배지에서 외식편당 139 mg의 가장 높은 캘러스의 형성을 보였으며, 2,4-D 농도가 증가될수록 감소하여 비교적 고농도에서는 캘러스 유기율이 낮았다. 또한 엽병의 경우 3 mg/L 2,4-D 첨가 MS배지에서 외식편당 117 mg의 유기율을 나타내었으며 잎 외식편에서는 2,4-D의 농도에 민감하지 아니하였다. 이와 같이 사용한 외식편에 의해서 2,4-D에 반응하는 농도가 다르고 캘러스 유기율이 다르게 나타났다 (Figure 1). 이와같은 결과는 시호 (Cho and Soh 1995), 강활 (Cho and Soh 1998) 및 당귀 (Cho et al. 1998) 등의 경우에서도 관찰되었다.

세가지 외식편을 여러 가지 농도의 2,4-D 첨가 MS 배지에서 캘러스를 유도하였으나 화기외식편 배양의 경우에서만 배발생능 캘러스를 얻을 수 있었다 (Figure 3). 따라서 잎과 엽병조직 유래 캘러스로 부터는 체세포배의 형성은 관찰할수 없었다. 이와 같이 배발생능 캘러스 유기율과 체세포배 형성

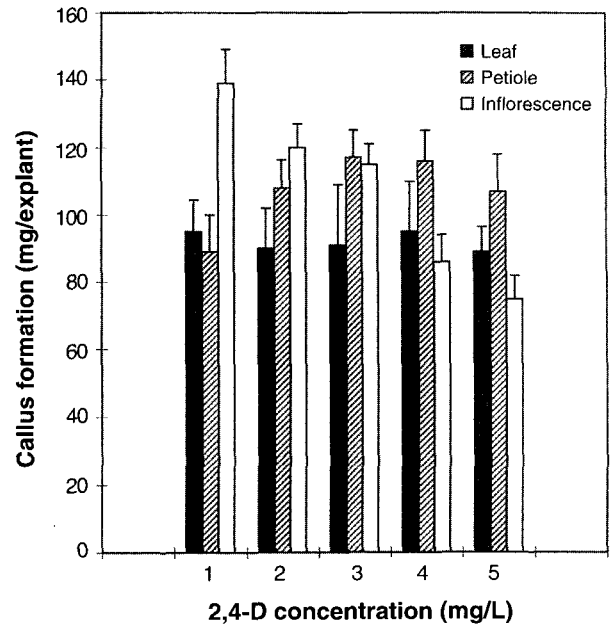


Figure 1. Effects of 2,4-D on callus formation from leaf blade, petiole, and inflorescence explants of *Cnidium officinale* M. The explants were cultured on MS medium supplemented with 2,4-D of various concentrations. Data were collected after 8 weeks of culture and represented as fresh weight. Vertical bars represent means \pm SD obtained from three independent experiments.

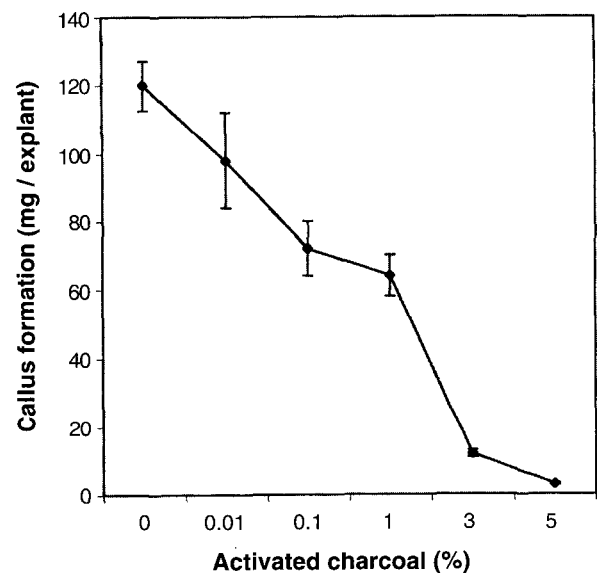


Figure 2. Effects of activated charcoal on callus formation from inflorescence explants of *Cnidium officinale* M. The explants were cultured on MS medium with 2mg/L 2,4-D for 8 weeks then the explants with embryogenic callus were transferred to MS medium supplemented with various concentrations of charcoal for 4 weeks. Vertical bars represent means \pm SD obtained from three independent experiments.

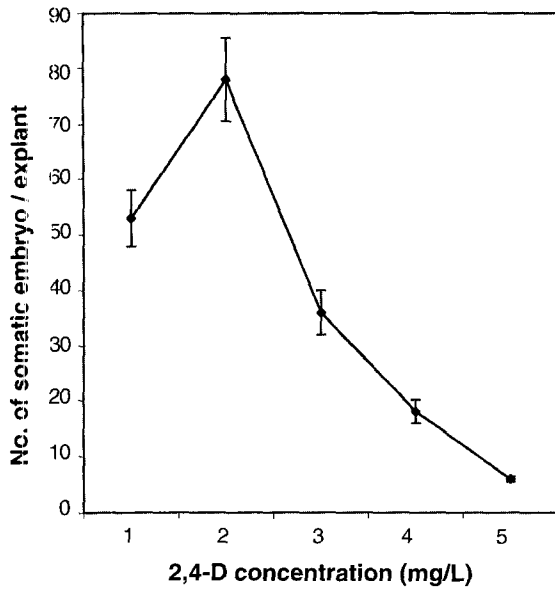


Figure 3. Effects of 2,4-D concentration on somatic embryo formation from inflorescence explants of *Cnidium officinale* M. The explants were cultured on MS medium supplemented with 2,4-D of various concentrations for 8 weeks, then the explants with embryogenic callus were transferred to MS basal medium for 4 weeks of culture. Vertical bars represent means \pm SD obtained from three independent experiments.

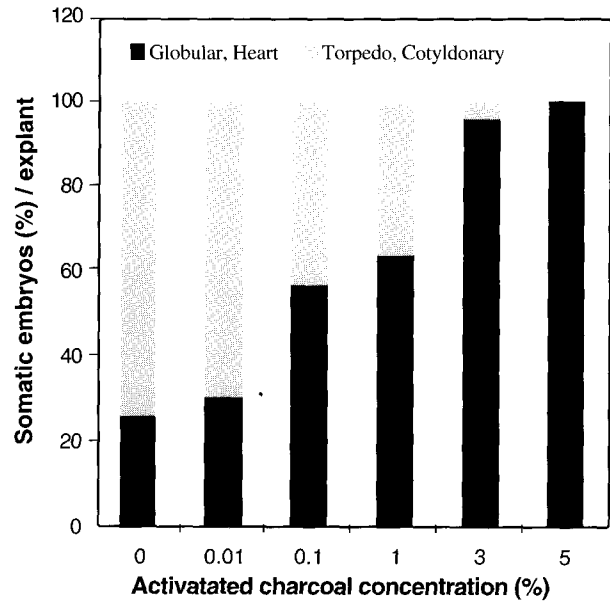


Figure 5. Effects of activated charcoal on maturation of somatic embryo formation from inflorescence explants of *Cnidium officinale* M. The explants were cultured on MS medium with 2 mg/L 2,4-D for 8 weeks, then the explants with embryogenic callus were transferred to MS medium supplemented with various concentrations of charcoal for 4 weeks. Vertical bars represent means \pm SD obtained from three independent experiments.

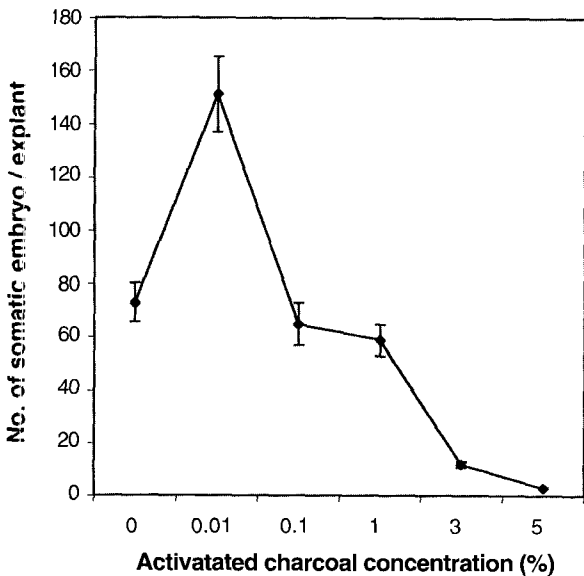


Figure 4. Effects of activated charcoal on somatic embryo formation from inflorescence explants of *Cnidium officinale* M. The explants were cultured on MS medium with 2 mg/L 2,4-D for 8 weeks then the explants with embryogenic callus were transferred to MS medium supplemented with various concentrations of charcoal for 4 weeks. Vertical bars represent means \pm SD obtained from three independent experiments.

율은 외식편의 종류에 따라서 현저하게 달랐으며 이와같은 현상은 식물조직의 분화와 내재호르몬과의 관계때문으로 추정된다 (Cho and Soh 1998).

화기외식편을 1, 2, 3, 4, 5 mg/L 2,4-D 배지에서 8주간 배양 후 진주황색의 불투명하고, 딱딱하고 차밀한 배발생능 켈러스를 선별하여 MS 기본배지에서 4주간 계대배양하면 체세포배의 형성률이 외식편당 53개, 78개, 36개, 18개 및 6개로서 2 mg/L 2,4-D 배지에서 유도된 켈러스에서 가장 많은 배가 형성되었다. 반면에 고농도인 3 mg/L, 4 mg/L 및 5 mg/L 2,4-D 첨가배지에 배양하여 유도된 켈러스로부터는 점차적으로 체세포배 형성율이 떨어졌다. 따라서 천궁화기 외식편으로부터 체세포배발생에 적당한 2,4-D의 농도는 2 mg/L가 최적농도로 나타났다 (Figure 3). 당귀의 경우는 2,4-D배지에서 형성된 배발생능 켈러스를 계대배양 없이 동일배지에서 체세포배형성이 일어났으나 (Cho et al. 1998) 천궁은 시호 (Cho and Soh 1995)와 당근 (Soh et al. 1996)의 경우와 같이 2,4-D 배지에 배양한 후 2,4-D 제거배지에서 계대배양하면 체세포배가 발생되었다. 또한 체세포배발생에 대한 2,4-D의 적정농도는 같은 산형과 식물에 있어서도 종에 따라서 달랐고 당귀의 경우 1 mg/L 2,4-D에서 유도된 켈러스로부터 체세포배의 발생이 양호하였으며 (Soh et al. 1996), 시호는 한천배지에서는 1 mg/L 2,4-D에서, 그리고 현탁배양시는 0.1 mg/L 2,4-D에서 양호하였다. 또한 대두에서는 고농도의 2,4-

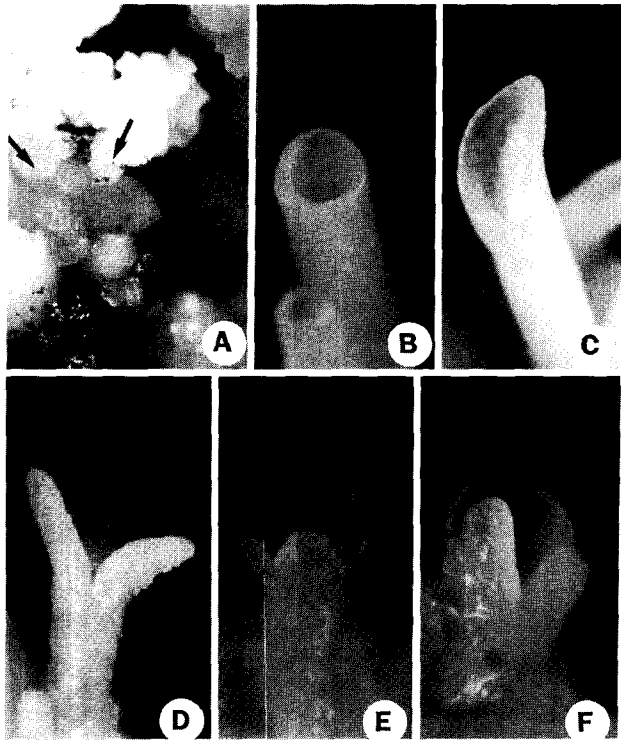


Figure 6. Cotyledonary variation of somatic embryos formed from callus on inflorescence explants of *Cnidium officinale* M. on 1/2 strength MS basal agar medium. A. Embryogenic callus(arrows); B. Cup-shaped cotyledon; C. One cotyledon; D. Two cotyledons; E. Three cotyledons; F. Four cotyledons.

D (10, 20 mg/L)에서 체세포배 형성이 잘 일어났다 (Choi et al. 1994; John and Akitsu 1998). 같은 종일지라도 배양조건에 따라서 요구되는 2,4-D의 농도가 달랐으며 식물의 종에 따라서는 물론 다르게 나타났다.

활성탄이 첨가되지 아니한 MS 기본배지에서 외식편당 120 mg의 캘러스가 유도되었다. 캘러스 형성율에 미치는 활성탄의 영향을 구명하기위하여 2 mg/L 2,4-D 첨가배지에서 8주간 배양한 후 0.01, 0.1, 1, 3, 5 %의 활성탄 첨가배지에 배양한 결과 0.01 % 첨가시 98 mg으로서 약 20 % 감소율을 보였고 3 %와 5 % 첨가시 57 mg 및 39 mg 으로서 현저하게 감소하였다(Figur. 2). 이러한 현상은 활성탄이 캘러스 유기에 필요한 영양물질을 흡수한 것이 원인으로 추정된다.

체세포배 발생에대한 활성탄의 영향을 보면 0.01 % 첨가배지에서 151개로서 활성탄을 첨가하지 아니하였을 때보다 더욱 효과적이었다. 그러나 0.1, 1, 3, 5 % 첨가시는 고농도 활성탄 첨가와 비례하여 체세포배형성이 억제되었다 (Figure. 4). 따라서 체세포배 형성에 가장 촉진적인 활성탄의 농도는 0.01 %이었으며 이러한 현상은 고농도의 활성탄이 과다하게 영양물질등의 배발생유도물질들을 흡수하였기 때문에 일어난 것으로 사료된다. 체세포배 성숙도에 대한 활성탄의 영향을 살펴보면 체세포배 발생 초기단계인 구형배와 심장형배는 고농도인 3 % 활성탄 첨가배지에서 96.2 % 이었으며 5 % 활성탄 첨가배지에서 100 %가 구형배 단계로 동조화 되면서 발

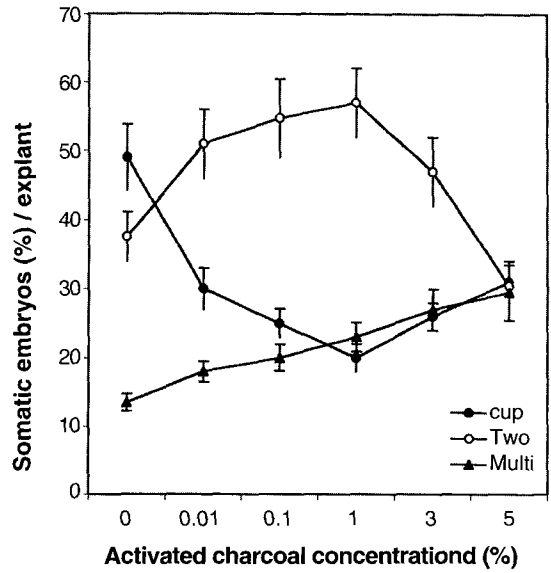


Figure 7. Effects of activated charcoal on cotyledonary variation of somatic embryos from inflorescence explants of *Cnidium officinale* M. The explants were cultures on MS medium with 2mg/L 2,4-D for 8 weeks then the explants with embryogenic callus were transferred to MS medium supplemented with various concentrations of charcoal for 4 weeks. Vertical bars represent means \pm SD obtained from three independent experiments.

생이 중단되었다. 또한 비교적 저농도의 활성탄에서는 후기단계인 어뢰형 및 자엽시기의 배발생이 되었다. 따라서 체세포배의 성숙을 활성탄이 지연시키는 것은 배성숙 촉진성분을 흡수해버리기 때문으로 보인다 (Figure 5).

천궁의 화기로부터 형성된 체세포배에서 비정상적인 자엽을 가진 체세포배가 높은 비율로 나타났다 (Figure 6). 대조구에서는 두 개의 자엽을 갖는 정상적인 체세포배가 37.5 %였고 주발모양배가 49 %나 나타나며 3개 및 4개의 다자엽을 갖는 체세포배는 13.5 %가 형성되었다 (Figure 7). 이와 같이 천궁의 체세포배 발생에서 다양하게 자엽형태 변화가 일어난 것은 다른 식물과 비교할 때 자엽변이가 상당히 높게 나타난 것을 알 수 있다. 땅두릅 및 당귀 조직배양에서 2,4-D, 싸이토키닌 및 ABA등의 외래 호르몬 첨가에 의해 다자엽 및 주발모양의 체세포배 발생이 일어나는 것으로 알려졌다 (Lee and Soh 1993a, 1993b; Cho et al. 1998). 그리고 대두의 체세포배는 식물생장호르몬 이외에 배지에 첨가되는 당의 농도에 의한 삼투압 변화는 체세포배의 형태 변화를 유발시키는 것으로 알려졌다 (Kageyama et al. 1990; Choi et al. 1994; Moon et al. 1994).

활성탄의 첨가에 따라서 자엽변이율은 농도별로 다르게 나타났다. 1 % 활성탄 첨가배지에서 2개의 자엽을 갖는 정상적인 체세포배가 57 %로 형성되어 대조구와 비교하였을때에 약 20 %의 향상률을 보여 가장 효과적이었다. 이에 반하여

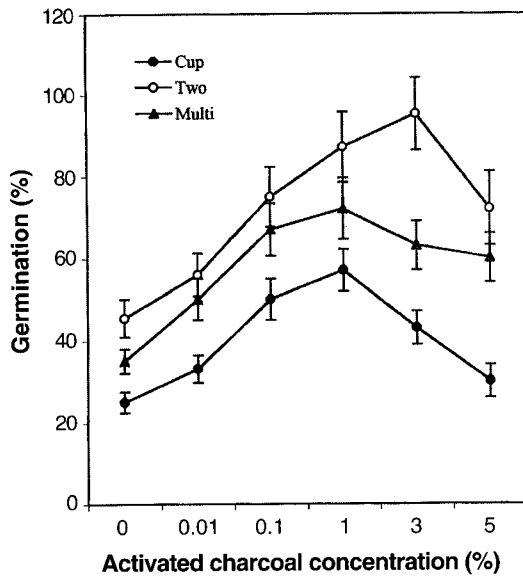


Figure 8. Effects of activated charcoal on germination of somatic embryos formed from inflorescence explants of *Cnidium officinale* M. The explants were cultures on MS medium with 2 mg/L 2,4-D for 8 weeks then the explants with embryogenic callus were transferred to MS medium supplemented with various concentrations of charcoal for 4 weeks. Cotyledon stage embryo represent means \pm SD obtained from three independent experiments.

주탈모양 체세포배는 20%로 활성탄 첨가배지에서 많이 감소되었다 (Figure 7). 이러한 현상은 활성탄이 배지내에서 비정상적인 자엽 발생을 유도하는 성분을 흡수하여 이상자엽배의 발생을 감소시킨 것으로 사료된다. 그러나 5% 활성탄을 처리하였을 때는 건전한 2개 자엽의 체세포배 형성이 현저하게 줄어들어 30.5%의 형성률을 나타내어 37.5%를 나타내고 있는 대조구에 비하여 오히려 감소현상을 보였다. 따라서 활성탄이 배지내의 유해한 성분뿐만 아니라 정상배의 발생에 필요한 성분을 흡수하여 나타난 현상으로 추정된다. 따라서 정상적인 체세포배 형성을 위하여 적절한 활성탄의 농도를 구명하는 것은 다른 식물에서도 필요할 것으로 보인다.

천궁의 체세포배 발아율은 다른 산형과 식물인 시호, 당귀 및 당근에 (Cho and Soh 1995; Soh et al. 1997; Cho et al., 1998) 비하여 낮게 나타났다. 2개 자엽 체세포배의 경우 당근에서 99%의 발아율을 보이지만 천궁에 있어서는 45.5%로 절반 미만의 저조한 발아율을 보였다 (Figure 8). 그러나 활성탄을 첨가함으로써 자엽수에 관계없이 모든 체세포배의 발아율이 대조구에 비해 현저하게 향상되었다. 활성탄 3% 첨가에서는 2개의 자엽을 갖는 체세포배가 95%로 발생되어 당근의 2개 자엽 체세포배의 발아율에 가깝게 향상되었다 (Figure 8). 대두 있어서는 에틸렌 생합성의 저해제인 C_6Cl_2 와 활성탄을 첨가함으로써 체세포배의 발아능력을 향상되었으며 (Moon et al. 1994), 고농도의 PEG 또는 sucrose 첨가에

의한 삼투 스트레스를 가할 경우에도 체세포배의 발아율이 향상된 보고가 있다 (Cailloux et al. 1996; Liossier et al. 1997). 이와 같이 활성탄 첨가 등의 방법으로 발아율이 저조한 체세포배들의 발아율 향상이 확인되었으므로 발아율 향상에 대한 연구는 체세포배의 산업적 이용에 크게 기여할 것으로 전망된다.

적 요

천궁 (*Cnidium officinale*)의 잎, 엽병 및 화기 외식편을 재료로 하여 2,4-D가 첨가된 배지에 배양하였을 때 캘러스 형성은 어느 외식편에서나 비슷한 수준으로 유기되었지만 배형성능 캘러스는 화기유래 캘러스에서만 형성되었다. 체세포배발생의 유도는 2 mg/L 2,4-D를 첨가한 MS 배지에서 잘 일어났으며 2,4-D 제거배지에서 계대배양하면 외식편당 78개의 체세포배가 형성되었다. 체세포배의 자엽수에 있어서 변이가 빈번하게 관찰되었으나 배지에 1% 활성탄을 첨가하면 비정상적인 자엽수를 갖는 체세포배의 발생률이 감소되는 효과를 얻을 수 있었다. 자엽기 체세포배는 MS 기본배지에서 저조한 발아율을 보이는 반면에 활성탄 첨가배지에서는 현저한 발아향상을 보였다.

사사 : 본 연구는 교육부 기초과학연구소 지원 연구비(BSRI-97-4427)의 지원으로 수행되었으며 실험의 일부를 도와준 전북대학교 생물과학부 식물발생학 연구실 대학원생들에게 사의를 표한다.

인용문헌

- Cailloux F, Julien-Guerrier J, Linossier L., Coudret A (1996) Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant Sci* 120:185-196
- Chang SM, Choi J, Jyung SH, Shu DH (1988) Effect of the seed root weight and the local varieties on the yeild and quality of *Cnidium officinale* Makino root. *Agric Res Bull Kyungpook Natl Univ* 6: 87-91
- Cho DY, Soh WY (1995) Morphological observation of somatic embryogenesis in leaf cultures of *Bupleurum falcatum* L. *Kor J Plant Tiss Cult* 22(5): 291-297
- Cho DY, Lee EK, Soh WY (1998) Anomalous structure of somatic embryos developed from leaf explant cultures of *Angelica gigas* Nakai. *Kor J Plant Tiss Cult* 25(1): 1-5
- Cho DY, Soh WY (1998) Plant regeneration from somatic embryos with structural diversity from leaf explant culture of *Ostericum koreanum* Kitagawa. *Kor J Plant Tiss Cult* 25(1): 51-56
- Choi PS, Soh WY, Cho DY, Liu JR (1994) Somatic embryogenesis

- in immature zygotic embryo cultures of Korean soybean (*Glycine max* L.) cultivars and effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on somatic embryo morphology. *Kor J Plant Tiss Cult* **21**(1): 7-13
- John J F, Akitsu N** (1988) Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.) *Plant Cell Tiss Organ Cult* **15**: 125-136
- Jung H, Ko KC** (1983) Studies on the shoot tip culture of M7, M26, MM.106 apple rootstock. *J Kor Hort Sci* **24**:135-143
- Kageyama C, Komatsuda T, Nakajima K** (1990) Effects of sucrose concentration on morphology of somatic embryos from immature soybean cotyledons. *Plant Tiss Cult Lett* **7**: 108-110
- Kim YS, Cho DY, Soh WY** (1992) Protein analysis and structural aspects during somatic embryogenesis in *Oenanthe javanica*. DC. *Kor J Plant Tiss Cult* **19**(1): 23-28
- Lee KS, Soh WY** (1993a) Somatic embryogenesis and structural aberrancy of embryos in tissue cultures of *Aralia cordata* Thunb. *Kor J Plant Tiss Cult* **20**: 77-83
- Lee KS, Soh WY** (1993b) Effect of cytokinins on the number of cotyledons of somatic embryos from cultured cells of *Aralia cordata* Thunb. *Kor J Plant Tiss Cult*. **20**: 171-175
- Lee HS, Chung JD, Kim CB, Yoon JT, Choi BS** (1994) In vitro propagation of *Cnidium officinale* Makino Through shoot tip cul. *Kor J Plant Tiss Cult*. **21**(4): 221-225
- Linossier L, Veisseire P, Cailloux F, Coudret A** (1997) Effects of abscisic acid and high concentrations of PEG on *Hevea brasiliensis* somatic embryos development. *Plant Sci* **124**: 183-191
- Moon YH, Kim SK, Choi SB, Lee KW** (1994) Plant regeneration of soybean cultivars via somatic embryogenesis. *J Plant Biol* **37**: 333-341
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Pimenov, M G, Leonov M L** (1993) The genera of the Umbelliferae. Royal Botanical Garden Kew. UK.
- Soh W Y, Cho D Y, Lee E K** (1996) Multicotyledonary structure of somatic embryos formed from cell cultures of *Daucus carota* L. *J Plant Biol* **39**(1): 71-77
- Steward F C, Mapes M. O, Smith J** (1958) Growth and organized development of cultured cells *Amer J Bot* **45**: 693-713
- Williams L, Collin H A** (1976) Embryogenesis and plantlet formation in tissue culture of celery. *Ann Bot* **40**: 325-332

(접수일자 2000년 2월 8일)