

## 조직배양에 의한 하늘타리의 증식

황성진<sup>†</sup>·황백\*

동신대학교 식품생물공학과, \*전남대학교 생물학과 및 기초과학연구소

### *In vitro* Propagation of *Trichosanthes kirilowii* Max.

Sung-Jin Hwang<sup>†</sup> and Baik Hwang\*

Department of Food and Biotechnology, Dongshin University, Naju 520-714

\*Department of Biology & Institute of Basic Science, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

**ABSTRACT** : Adventitious shoot buds, without an intervening callus phase, were induced from stem explants of *Trichosanthes kirilowii* on MS medium supplemented with 2 mg/L BA. The culture medium, carbon source as well as plant growth regulators were found to influence further shoot multiplication and eventual shoot growth. A maximum number of shoots was obtained on a MS medium containing 0.5 mg/L BA and 3% sucrose. Shoot produced *in vitro* were rooted on half-strength phytagelled 1/2MS medium prior to transfer to green house condition.

## 서 언

중부 이남의 산야지에 자생하는 하늘타리 (*Trichosanthes kirilowii* Max.)는 다년생 초본으로 7, 8월에 개화하며 성숙과는 구형으로 황색을 띤다. 종자번식을 하나 생태환경의 변화 등으로 인해 최근 주변에서 점차 사라져가는 자원식물로 전래적으로 식용, 공업용, 그리고 약용으로 사용되어 왔다. 한방에서는 열매(括樓仁)와 뿌리(括樓根)를 해열, 해수, 이뇨, 변비, 어혈, 황달, 피부병, 결핵, 유방염, 적백리, 그리고 당뇨병 등의 치료에 사용한다(Zhu, 1998). 근경에서 생합성되는 것으로 알려지는 trichosanthin(TCN)은 항진균성 물질

로 항암작용은 물론 HIV(human immunodeficiency virus)의 복제를 억제하는 것으로 알려지고 있다(Byers et al., 1990). 조직배양은 식물세포의 분화전능성을 이용하여 체세포조직으로부터 유전적으로 동일한 유묘를 단기간에 대량으로 생산해 낼 수 있기 때문에 고부가가치성 약용물질을 함유하는 자생식물에 대한 우량 신품종의 육성을 위한 매우 적절한 수단으로 사용되고 있다(Samuelsson, 1992). 기내(*in vitro*) 배양을 통하여 유묘를 증식할 경우 생육에 필요한 모든 조건은 인위적으로 조절이 가능하며 재배지의 생태환경의 변화나 인건비의 상승에 따른 제반 문제점 등도 쉽게 극복해 낼 수 있다. 또한 생물반응기를 통하여 균질화된 우량 유묘

<sup>†</sup> Corresponding author (Phone) E-mail : 061 - 330 - 3225, Sungjhwang@hanmail.net

Received Jan. 13, 2001

를 대량으로 생산할 수도 있다 (Terashima and Nishimura, 1991). 기내배양에 있어서 시료 (explants)의 특성과 age, 배지의 성분, 배지내 탄소원이나 식물성장조절물질, 배지의 pH, 그리고 온도나 광조건과 같은 물리적인 요인들이 크게 작용한다 (Staba, 1980).

본 실험에서는 국내에 자생하는 하늘타리의 조직으로부터 직접 부정아를 형성시키고 이로부터 신초를 대량 증식시킬 수 있는 방법을 확인하여 이를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 식물재료

하늘타리 (*T. kirilowii* Max.)의 종자는 전남북 일원의 자생지로부터 직접 채취하여 전남대 분류학실에서 동정을 받았으며 일본 쓰꾸바 약용작물 시험장으로부터 같은 종을 제공받아 사용하였다. 하늘타리 종자는 과실로부터 적출하여 70% (v/v) ethanol에서 5분, 5% (v/v) sodium hypochlorite 용액에서 10분간 침지시켜 표면살균 처리를 하였으며 멸균된 무균수로 3회 이상 세척한 후 외피를 제거하고 무기염이 절반으로 줄어든 MS (Murashige and Skoog, 1962) 고형배지에 치상하여 암소 (25±1℃)에서 발아를 유도하였다.

### 2. 배지조제

기본배지의 성분에 sucrose와 고형제를 첨가한 후 1N NaOH를 사용하여 초기 pH가 5.7이 되도록 조정하였다. 식물성장조절물질은 배지를 121℃로 20분간 감압멸균한 후 배지가 약 45℃ 이하로 식었을 때 0.2 μm membrane filter로 여과하여 첨가하였다.

### 3. 부정아의 형성

조직 절편으로부터 직접 부정아를 유도하기 위하여 발아 후 10주 정도 자란 유식물체의 줄기, 잎,

뿌리의 절편을 취하여 식물성장조절물질이 첨가된 기본배지가 들어있는 페트리디쉬 (110 x 10 mm)에 치상 하였다. 실험에 사용된 기본배지로는 MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지를 사용하였으며, 식물성장조절물질로는 BA와 kinetin을 1-3 mg/L의 농도로 처리하였다.

### 4. 신초의 증식

부정아로부터 형성된 신초의 증식과 성장을 위해서 MS배지와 WPM (Lloyd and McCown, 1981) 배지에 BA와 kinetin을 0.5-2 mg/L의 농도로 첨가하였다. 또한 배지에 첨가하는 탄소원과 고형제의 효과를 알아보기 위해서 탄소원으로는 sucrose, glucose, fructose를 1-5% 까지 농도별로 첨가하였으며, 고형제로는 agar, phytigel (Sigma, USA), 그리고 gelite (Kelco, USA)를 첨가 하였다. 모든 배양체는 광도 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 로 연속 조명이 이루어지고 26±1℃로 유지되는 배양기내에서 배양되었다.

### 5. 발근

무기염의 농도를 낮춘 1/2MS, 1/4MS, 1/2WPM, 1/4WPM배지에 1.5 cm 이상 성장한 신초만을 절취하여 기저부가 배지에 닿도록 치상하였다. 모든 배양체는 광주기가 16/8 (24 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>)인 배양실에서 26±1℃로 유지시켰으며, 신장된 유식물체는 vermiculite : perlite (1 : 1) 혼합토로 채운 pot에 옮겨 온실에서 재배하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 부정아의 형성

기내에서 발아된 유식물체로부터 절취한 잎과 줄기, 뿌리의 조직절편을 성장조절물질이 첨가된 MS 기본배지에 치상하여 직접 부정아를 유도하였다. 2 mg/L BA 처리구에서 정단부위가 포함된 줄기 절편의 기저부로부터 캘러스의 형성 없이 다수의 부정아가 형성되었다 (Table 1). 부정아는 모두

정상적인 신초로 분화하였다. Shivasta 와 Rajani (1999)는 2  $\mu$ M BA가 첨가된 MS배지에서 *Bacopa monnieri*의 잎과 줄기의 절편으로부터 캘러스단계를 거치지 않고 직접 다수의 부정아를 유도하였으며, 이 때 kinetin 보다는 BA가 효과적임을 확인한 바 있다. Clog 등(1990)도 기본배지에 cytokinin류를 단독으로 처리하여 *Vitis*종으로부터 부정아를 유도하였으며, Sudripta 등(1996)과 Agrawal 등(1997) 또한 cashewnut와 cotton의 자엽절편 배양에서 동일한 결과를 얻었다. Boggetti 등(1999)은 조직절편으로부터 직접 부정아를 형성시키기 위해서는 배지내 무기염의 농도를 절반으로 줄이는데 바람직하다고 하였으나 하늘타리의 경우 기본배지로는 MS배지가 적합하였으며, B5, WPM, SH 그리고 무기염의 농도를 절반으로 낮춘 1/2MS배지 등에서는 조직 절편으로부터 부정아의 형성을 확인할 수 없었다(data not shown). 조직 절편으로부터 직접 부정아가 형성 되는데 있어서 배지의 특정 성분이 영향을 미치는 경우도 있으나(Idei and Kondo, 1998), Choi 등(1999)이 *Panax ginseng*의 성숙배의 절편으로부터 직접 부정아를 유도 하는데 있어서는 배지성분이나 성장조절물질 보다는 1 M sucrose에서의 전처리가 중요한 요인으로 작용하였다. 결론적으로 조직 절편으로부터 직접 부정아를 유도하기 위해서는 배지의 성분, 식물성장조절물질

질 그리고 시료의 분화능과 같은 여러 요인들이 검토되어야 할 것으로 사료된다.

## 2. 신초의 증식

부정아로부터 분화된 신초로부터 새로운 신초를 분화시키기 위하여 기본배지에 cytokinin을 처리하고 길이 약 1.5 cm 가량의 신초를 기저부가 배지에 접하도록 하여 치상하였다. 배양 4주 후 신초 1개당 0.5 mg/L BA가 첨가된 MS 배지와 WPM배지에서 각각  $17.3 \pm 0.2$ 개와  $12.7 \pm 0.1$ 개의 새로운 신초가 형성되었다(Table 2). 그러나, 고농도의 BA나 kinetin이 첨가된 배지 조건에서는 신초의 증식이 매우 낮거나 전혀 이루어지지 않았다. Stefaan 등(1994)은 신초의 증식시 cytokinin류 중에서 BA가 가장 효과적이라고 보고한 바 있다. 본 실험에서는 무기염의 농도가 상대적으로 낮은 1/2MS나 WPM 배지에 비해 MS배지에서 신초의 형성율이 높은 것은 배지내 무기염의 적정 농도의 유지가 하늘타리의 신초 증식에 필수적이라고 볼 수 있다. 그러나, 무기염의 농도를 낮춤으로서 보다 나은 결과를 가져오는 경우도 있다. Boggetti 등(1999)과 Sansberro 등(1999)은 *Anacardium occidentale*와 *Ilex paraguariensis*의 배양에서 각기 1/2MS와 1/4MS배지를 사용하여 신초를 형성시켰다. 그러나, cashewnut의 유묘 조직 절편으로부터 신초의 형성에 있어서는 배지내 무기성분이 전혀 영향을 미치지 않았다(Sudripta et al., 1996). 하늘타리에 있어서는 MS 배지와 WPM 배지를 제외한 모든 배지에서 신초의 증식이 거의 이루어지지 않거나 형성된 신초의 대부분이 계대배양 과정에서 기저부를 중심으로 캘러스화되는 경향을 나타내었다. 배지내 cytokinin의 첨가는 새로운 신초의 분화에는 효과적일지 모르나 오히려 형성된 신장을 저해할 수 있기 때문에(Agrawal et al., 1997) 일단 형성된 신초의 활발한 성장을 위해서는 식물성장조절물질을 완전히 제거 시키거나(Taji et al., 1989; Bunn et al., 1989) 농도를 낮추는게 바람직한 것으로 보고

Table 1. Effects of cytokinins on adventitious shoot buds formation in *T. kirilowii*

| Medium | Cytokinins (mg/L) | Responding explants (%) |      |      |   |
|--------|-------------------|-------------------------|------|------|---|
|        |                   | Leaf                    | Stem | Root |   |
| MS     | BA                | 1                       | -    | 4    | - |
|        |                   | 2                       | C    | 87   | - |
|        |                   | 3                       | C    | C    | - |
|        | Kinetin           | 1                       | R    | R    | - |
|        |                   | 2                       | C    | C    | - |
|        |                   | 3                       | -    | -    | - |

C; callus formation R; rooting -; not detected

있다(Ewald and Suss, 1993). 따라서, 본 실험에서는 1.5 cm 이상 자란 하늘타리의 신초는 길이 생장과 잎의 활착을 위해 BA의 농도를 0.1 mg/L로 낮춘 기본배지로 옮겨 배양하였다.

**Table 2.** Effects of cytokinins and culture media on shoot multiplication in *T. kirilowii*

| Media | Cytokinins (mg/L) | No. of shoots/explants (Mean±SE) |
|-------|-------------------|----------------------------------|
| MS    | BA 0.5            | 17.3 ± 0.2                       |
|       | 1                 | 10.8 ± 0.2                       |
|       | 2                 | C                                |
|       | Kinetin 0.5       | 1.8 ± 0.3                        |
|       | 1                 | C                                |
|       | 2                 | -                                |
| WPM   | BA 0.5            | 10.7 ± 0.4                       |
|       | 1                 | 6.4 ± 0.4                        |
|       | 2                 | C                                |
|       | Kinetin 0.5       | -                                |
|       | 1                 | 1.2 ± 0.4                        |
|       | 2                 | C                                |

C; callus formation -; not detected

신초의 증식에 있어서 탄소원의 종류 및 적정 농도를 조사하기 위해서 4종의 탄소원을 농도별로 배지에 첨가하였다. 신초의 증식은 3% sucrose 처리

**Table 3.** Effects of carbon sources on shoot multiplication in *T. kirilowii*

| Carbon sources | Concentration (%) | No. of shoots/explants (Mean±SE) |
|----------------|-------------------|----------------------------------|
| Glucose        | 1                 | 4.2 ± 0.4                        |
|                | 3                 | 3.7 ± 0.3                        |
|                | 5                 | 2.8 ± 0.3                        |
| Sucrose        | 1                 | 9.1 ± 0.2                        |
|                | 3                 | 17.3 ± 0.2                       |
|                | 5                 | 6.7 ± 0.4                        |
| Fructose       | 1                 | 2.2 ± 0.3                        |
|                | 3                 | 1.8 ± 0.5                        |
|                | 5                 | 1.2 ± 0.3                        |

구에서 배양 4주 후 시료당 약 17.3±0.3개로 가장 높았다(Table 3). 5% 이상의 농도에서는 새로운 신초의 증식이 억제 되었으며 장기간 계대배양 과정에서 기저부의 괴사현상을 나타내었다. Cashew에 있어서 신초의 형성에 관한 연구 결과(Boggetti et al., 1999)와 달리 하늘타리에서는 glucose, maltose, 그리고 lactose 등은 신초의 증식에 효과를 나타내지 못하였다.

### 3. 발근

신초로부터 발근을 유도하기 위해서 무기염의 농도를 각기 1/2과 1/4로 낮춘 1/2MS, 1/4MS, 1/2WPM 그리고 1/4WPM 배지에 신초를 치상하였다. 배양 4주 후 조사한 신초당 발근율은 1/2MS배지에서 약 4.3±0.02개로 1/4MS나 1/2WPM, 그리고 1/4 WPM배지에 비해 높게 나타났다 (Table 4). 따라서, 하늘타리 신초로부터 발근을 위해서는 무기염의 농도를 절반으로 낮추는게 바람직 할 것으로 보였다. 발근을 촉진 시키기 위해 배지에 저농도의 auxin을 처리하는 경우가 많으나(Pattnaik and Chand, 1997; Boggetti et al., 1999), 본 실험에서는 auxin류의 처리시 성장이 억제되고 캘러스화 경향이 심하게 나타났다 (data not shown). Gasper와 Coumans (1987)는 발근의 촉진을 위해 2단계 배양방법 즉, BA가 첨가된 배지에서 증식된 신초를 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 기본배지에서 1차 배양 후 IBA가 첨가된 배지로 옮겨 발근

**Table 4.** Effects of culture media on root formation in *T. kirilowii*

| Media  | Root no./explants (rooting %) (Mean±SE) |
|--------|---|
| MS     | 0.7 ± 0.03 (34)                         |
| 1/2MS  | 4.3 ± 0.02 (96)                         |
| 1/4MS  | 1.6 ± 0.02 (57)                         |
| 1/2WPM | 3.2 ± 0.05 (67)                         |
| 1/4WPM | 0.4 ± 0.03 (31)                         |

을 촉진시켰다. 대부분 증식과정에서 처리한 cytokinin이 발근을 억제하기 때문에 이와같은 2단계 배양방법을 사용하는 것도 바람직할 수 있다. 하늘타리의 경우 증식과정에서 이미 BA의 농도를 낮추어 줌으로써 BA에 의한 발근 억제 효과를 제거한 것으로 사료되었다. 한편 고형물질에 의한 발근율의 차이는 없었다.

## 적 요

하늘타리 (*T. kirilowii*) 의 기내 (*in vitro*) 대량증식을 위하여 줄기절편을 2 mg/L BA가 첨가된 MS 배지에 치상하였을 때 정단부위가 포함된 줄기절편의 기저부로부터 다수의 부정아가 형성되었다. 부정아는 정상적인 신초로 분화하였으며, 이와같이 형성된 신초는 0.5 mg/L BA가 첨가된 MS 배지로 옮겨졌을 때 4주 후 시료당 17.3±0.2개의 신초로 재분화하였다. 신초의 증식에 있어서 배지내 탄소원으로는 3% sucrose가 적절하였으며, 고형물질에 의한 영향은 확인할 수 없었다. 한편 신초의 발근은 무기염의 농도가 절반으로 줄어든 1/2MS 배지 (2% sucrose, 0.3% phytagel, pH 5.7) 에서 신초당 4.3±0.02개로 96% 이상 형성 되었다.

## 사 사

본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구과제 (971-0508-043-2) 연구비지원에 의하여 수행 되었음

## LITERATURE CITED

- Agrawal, D. C., A. K. Banerjee, R. R. Kolala, A. B. Dhage, A. V. Kulkarni, S. M. Nalawade, S. Hazra, and K. V. Krishnamurthy. 1997. *In vitro* induction of multiple shoots and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Plant Cell Rep. 16 : 647-652
- Boggetti, B., J. Jasik, and S. Mantell. 1999. *In vitro* multiplication of cashew (*Anacardium occidentale* L.) using shoot node explants of glasshouse-raised plants. Plant Cell Rep. 18 : 456-461
- Bunn, E., K. W. Dixon, and M. A. Langley. 1989. *In vitro* propagation of *Leucopogon obtectus* Benth. (Epacridaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 19 : 77-84
- Byers, V. S., A. S. Levin, L. A. Waites, B. A. Starrett, R. A. Mayer, J. A., M. R. Price, R. A. Robins, M. Delaney, and R. W. Baldwin. 1990 A phase I/II study of trichosantin treatment of HIV disease. AIDS 4 : 1189-1196
- Choi, Y. E., D. C. Yang, E. S. Yoon, and K. T. Choi. 1999. High-efficiency plant production via direct somatic single embryogenesis from preplasmolysed cotyledons of *Panax ginseng* and possible dormancy of somatic embryos. Plant Cell Rep. 18 : 493-497
- Clog, E., P. Bass, and B. Walter. 1990. Plant regeneration by organogenesis in *Vitis* root stock species. Plant Cell Rep. 8 : 726-728
- Ewald, D. and R. Suss. 1993. A system for repeatable formation of elongating adventitious buds in Norway spruce tissue cultures. Silvae Genet 42 : 169-175
- Gaspar, T. and M. Coumans. 1987. Root formation. In Cell and Tissue Cultures in Forestry, vol. 2. Bonga, J. M. and D. J. Durzan ed. pp. 202-221
- Idei, S. and K. Kondo. 1998. Effects of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and BAP on organogenesis in tissue cultured shoot primordia induced from shoot apices of *Utricularia praelonga* St. Hil. Plant Cell Rep. 17 : 451-456
- Lloyd, G. and B. McCown. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by the use of shoot tip culture. Proc. Int. Plant Proc. Soc. 30 : 421-427
- Murashige, T. and F. Skoo. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15 : 473-497
- Pattnaik, S. K. and P. K. Chand. 1997. Rapid clonal propagation of three mulberries, *Morus cathayana* Hemsl., *M. ihou* Koiz and *M. serrata* Roxb., through *in vitro* culture of apical shoot buds and nodal explants from mature trees. Plant Cell Rep.

- 16 : 503-508
- Samuelsson, G.** 1992. Plant Tissue Culture. *In* Drugs of Natural Origin. Swedish Phamaceutical Press pp. 27-35
- Sansberro, P., H. Rey, L. Mroginski, and M. Collavino.** 1999. *In vitro* plant regeneration of *Ilex paraguariensis*. *In vitro* Cell and Dev. Biol. - Plant 35 : 401-402
- Shivasta, N. and M. Rajani.** 1999. Multiple shoot regeneration and tissue culture studies on *Bacopa monnieri* (L.) Pennell. Plant Cell Rep. 18 : 919-923
- Staba, E. J.** 1980. *In* Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals. pp. 2-48
- Stefaan, P., O. Werbrouck, and P. C. Debergh.** 1994. Applied aspects of plant regeneration. *In* Plant Cell Culture : A practical approach. Dixson, R. A. and R. Z. Gonzales eds. Oxford University press, Oxford, NY. pp. 127-145
- Sudripta, D., J. Timir and S. Jha.** 1996. *In vitro* propagation of cashewnut. Plant Cell Rep. 15 : 615-619
- Taji, A. M. and R. R. William.** 1989. *In vitro* propagation of *Clanthus formosus* an Australian native legume. Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 16 : 61-66
- Terashima, T. and S. Nishimura.** 1991. Mass propagation of somatic embryos in carrot using bioreactor. Japan J. Breed. 41 : 234
- Zhu Y. P.** 1998 *In* Chinese Materia Medica. Harwood Academic Publishers pp. 489-490