

시호의 약배양을 통한 배발생 및 재분화

권순태* · 정형진 · 김길웅¹

안동대학교 자연과학대학 생명자원과학부
¹경북대학교 농과대학 농학과

Embryogenesis and Regeneration from Anther Cultures of *Bupleurum falcatum* L.

Soon-Tae Kwon*, Hyung-Jin Jeong and Kil-Ung Kim¹

Dept. of Bioresources Science, Andong National University, Andong, Kyungpook 760-749, Korea
¹Dept. of Agronomy, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Abstract

Effects of growth regulators(2,4-D, IAA, NAA, BA and kinetin) and chilling treatment on callus induction, embryogenesis and regeneration through anther cultures of *B. falcatum* L. were examined. Frequency of callus induction and embryogenesis was effectively increased by the treatment of chilling at 5°C for 10 days before anther inoculation. Optimal level of growth regulator for callus induction and embryogenesis from anther was 2,4-D 1.0 mg/L in Murashige and Skoog(MS) basal medium supplemented with 30 g/L sucrose, 8 g/L agar. Frequency of embryogenesis from anther derived callus was increased up to 48% or 45% by addition of IAA 0.1 + kinetin 1.0 mg/L or IAA 0.1 + BA 1.0 mg/L in MS medium, respectively. Optimal medium for obtaining green callus was MS basal supplemented with BA 1.0 mg/L. Addition of auxins(IAA or NAA) inhibited the formation of green callus from anther derived callus.

Key words – anther culture, embryogenesis, growth regulators, callus

서 론

한국산 시호는 일본이나 중국산보다 약리성분인 saikosaponin 함량이 우수하나 수요에 비하여 공급량이 부족하므로 국내수요의 상당부분을 수입에 의존하고 있다. 우리 나라는 주로 노지재배에 의한 시호의 번식법을 사용하므로 재배기간이 상당히 길며 상품화가 가능한 2년생 뿌리의 내

부 목질화가 심하여 saikosaponin 함량이 현저히 떨어지는 문제가 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 조직배양법을 이용하여 우수한 세포주나 변이체의 선발을 통해 시호의 품종개량을 시도할 필요가 있다.

시호의 조직배양을 시도한 예는 캘러스유래 부정근에서 saikosaponin의 기내생산[6,8], 체세포 배발생을 통한 기내 증식[3,4], 캘러스유래 부정근의 조직학적 연구[2]등이 있으나, 약(藥)배양을 통한 식물체 재생이나 배발생에 관한 연구는 없다. 약배양은 반수체 육종에 가장 널리 쓰이는 방법으로 배가법에 의해 동형접합성의 고정된 우량 순계를

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : (054) 820-5623, Fax : (054) 820-5785
E-mail : skwon@andong.ac.kr

단시간에 획득할 수 있고, 열성인자의 검출이 가능하므로 육종 기법상의 효율뿐만 아니라 선발효과도 우수한 장점이 있다. 그러나 약배양에 의해 반수체 식물을 유기하는 효율은 식물의 종류와 생육환경, 소포자의 발육단계, 저온처리, 배지구성성분 및 배양환경 등에 따라 큰 차이를 보이며, 어떤 식물은 약배양이 전혀 되지 않는 경우도 있다.

본 실험은 시호의 약배양을 위한 기초실험으로 약의 저온처리나 식물생장조절제의 처리가 약배양의 효율에 미치는 영향과 약 유래 캘러스로부터 기관분화 및 배발생을 위한 효율적인 조건을 구명하고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험에 사용된 시호(*B. falcatum* L.)의 품종은 '정선종'이었으며, 꽃에 종자를 파종하여 하우스 비가림 재배하였다. 배양에 필요한 약(葯)은 시호의 꽃봉오리가 열개 되지 않은 1 핵기 전후의 꽃으로부터 채취하였다. 꽃의 소독은 70% EtOH에 30초, 2% H₂O₂에 1분간 전처리 후 1% sodium hypochlorite 용액에 10분간 소독하여 멸균수로 3차례 이상 씻어 주었다. 약의 분리는 실체 현미경을 이용하였으며, 약의 크기가 200-300 μ m 정도 되는 것을 치상하였다.

약 배양

약 배양을 위한 배지는 MS(Murashige and Skoog)[10]를 기본으로 하여 sucrose 30 g/L와 한천 8 g/L를 첨가하였으며, 배지의 산도는 pH 5.8로 조정하였다. 분리된 약은 직경 5cm 샤페에 20-30개씩 치상하였으며, 배양조건은 27 $^{\circ}$ C 항온의 암상태로 하였다. 약의 저온처리 효과를 알아보기 위해 채취한 꽃을 수분이 포화된 상자에 넣어 5 $^{\circ}$ C 냉장고에 10일간 보관 후 치상하였다. 저온처리를 하지 않는 경우는 꽃을 수분이 포화된 상자에 상온 보관하면서 3일 이내에 치상하였다. 식물생장조절제는 cytokinin인 BA(benzylamino purine)와 kinetin, auxin인 2,4-D(2,4-dichlorophenoxy acetic acid)와 NAA(naphtalene acetic acid)를 사용하였으며, 농도는 0.01, 0.1, 1.0, 2.0 mg/L를 단독 또는 혼합처리하였다. 치상 8주 후에 약으로부터 유도된 캘러스, 배발생수 등을 조사하였다.

재분화 및 배발생 조건 구명

단일 약으로부터 유래된 건전한 캘러스를 MS 기본에

sucrose 30 g/L, 2,4-D 1.0 mg/L, 및 한천 10 g/L가 포함된 배지에 약 3개월간 증식 후 BA, kinetin, IAA(indole acetic acid) 및 NAA를 농도 0.1, 1.0 및 2.0 mg/L가 단독 또는 혼합된 배지에 치상하였다. 본 실험에서는 직경 9cm 샤페를 사용하였으며, 샤페당 약 50mg 정도의 캘러스를 9개씩 치상하였다. 치상 후 6주 째에 배발생, 재분화 또는 녹화된 캘러스 수를 조사하였다.

결과 및 고찰

약 배양

시호의 약으로부터 캘러스 유도과 배발생을 위한 약의 저온처리와 식물생장조절제의 효과를 조사하였다. 먼저 저온처리 효과를 보면, 생장조절제의 종류와 농도에 관계없이 저온처리 한 약이 처리하지 않은 약보다 캘러스 유도나 배발생율이 높았다. 저온처리를 하지 않은 약의 경우 2,4-D 단독처리배지에서 가장 효율적이었는데, 치상한 총 1,600개의 약 중에서 93개(5.81%)의 약에서만 캘러스가 유도되었고, 배발생된 약은 4개(0.25%)에 불과하였다. 그러나 저온처리를 한 약의 경우는 동일한 처리에서 각각 캘러스유도를 12.6%, 배발생율 0.71%로 나타나 시호의 약배양에는 저온처리 효과가 있었다(Table 1).

식물생장조절제인 cytokinin(BA 및 kinetin)과 auxin(2,4-D 및 NAA)의 조합에서 auxin으로 2,4-D를 혼용한 배지가 NAA를 혼용한 배지보다 캘러스 유도나 배발생 효과가 좋은 것으로 나타났다. 한편 캘러스 유도에서는 2,4-D나 NAA의 단독처리가 BA나 kinetin을 혼용처리한 배지보다 효과가 우수하였다. 약으로부터의 배발생률을 보면 2,4-D 단독처리에서 가장 효율적이었으나, 총 1,670개의 치상한 약 중에서 11개(0.71%)의 약에서만 배발생이 관찰되어 약으로부터의 직접배발생(direct embryogenesis) 효율은 전체적으로 저조하였다.

약의 저온처리가 약배양의 효율을 증가시킨다는 것은 오래 전부터 알려져 왔다. 저온의 정도는 식물에 따라 다르나 일반적으로 10 $^{\circ}$ C 이상보다는 4-5 $^{\circ}$ C가 더욱 효과적인 것으로 알려져 있으며[9], 저온처리 기간도 식물에 따라 4일에서 14일까지 다양하나 너무 짧은 기간을 처리할 경우는 저온의 효과가 없는 것으로 보고되어 있다[7,9].

Table 1. Effect of growth regulators on callus induction and embryogenesis from anther cultures of *B. falcatum* L¹⁾

Treatments	Chilling 5°C for 10 days			No chilling		
	Anthers inoculated	Callus (%)	Embryo (%)	Anthers inoculated	Callus (%)	Embryo (%)
2,4-D only	1,690	12.60b	0.71a	1,600	5.81a	0.25a
2,4-D + BA	3,760	3.67a	0.10a	3,300	2.27a	0a
+ Kinetin	3,520	6.79a	0.11a	3,320	2.77a	0a
NAA only	1,840	2.77a	0.11a	1,600	1.13a	0a
NAA + BA	3,760	2.10a	0.05a	3,240	0.52a	0a
+ Kinetin	3,440	2.56a	0.23a	3,280	0.40a	0a

¹⁾Data were calculated by counting all anthers forming callus or embryo in 2,4-D and NAA at 0.01, 0.1, 1.0, 2.0 mg/L treatment, and BA and kinetin at 0.1 and 1.0 mg/L treatment, respectively. All data were determined at 8 weeks after anther inoculation.

Table 2는 본 실험에서 처리한 cytokinin과 auxin의 여러 가지 농도조합 중 캘러스 유도나 배발생을 위한 최적의 농도조합을 나타낸 것이다. 저온처리를 한 약으로부터 캘러스 유도를 위한 최적의 식물생장조절제는 2,4-D 1.0 mg/L를 처리한 배지로 19.53%의 캘러스 유도율을 보였으나, 2,4-D 농도를 1.0 mg/L보다 낮추거나 높이면 캘러스 유도율이 현저히 떨어지는 경향이였다. NAA는 2,4-D에 비해서 효과가 현저히 떨어지며 cytokinin인 BA나 kinetin을 혼용처리한 배지에서도 2,4-D 단독처리에 비해 저조한 것으로 나타났다. 약으로부터의 배발생율도 2,4-D 1.0 mg/L

처리에서 1.56%로 가장 양호하였다.

일반적으로 약으로부터의 배발생에는 캘러스 형성과정을 거쳐서 일어나는 경우와 화분이나 약벽에서 직접 나오는 경우가 있다[11,13]. 반수성 배를 획득하기 위해서는 화분으로부터 직접 배가 발생하는 것이 가장 바람직하나, 약벽에서 직접 배가 형성되면 배수성인 체세포배가 형성된다. 본 실험에서 조사된 캘러스나 배는 화분이 직접 약벽으로 돌출되어 형성된 것이며 약벽 유래의 캘러스는 거의 없었다.

식물체 조직이나 약으로부터 직접 배발생을 유도할 경우 2,4-D는 자극제 역할을 하므로 일부 식물에서는 고농도의 2,4-D 처리로 배발생 효율이 현저히 증가하는 것으로 알려져 있다[1]. 한편 일부 식물의 조직에서는 성장조절제를 처리하지 않아도 체세포 배발생이 일어날 수 있는 것으로 알려지고 있다[5,12]. Jo와 Soh[3]는 시호의 잎 조직 유래 체세포 배발생에 관한 연구에서 2,4-D 단독처리가 체세포 배발생에 가장 효과적이며 2,4-D에 BA를 첨가하면 체세포 배발생이 전혀 일어나지 않는다고 하여, 본 실험에서 cytokinin이 약 유래 배발생에 억제작용을 하는 것과 일치하는 결과였다.

배발생 및 재분화

약으로부터 유도된 캘러스를 2,4-D 1.0 mg/L가 함유된 배지에서 대량 증식하여 배발생과 재분화를 위한 식물생장조절제의 효과를 조사하였다.

먼저 배발생을 위한 IAA와의 혼합효과를 보면, IAA와

Table 2. Optimal concentration of auxin and cytokinin for callus induction and embryogenesis from anther cultures of *B. falcatum* L

Treatments ¹⁾	Callus induction		Embryogenesis	
	Optimal conc. (mg/L)	Frequency (%)	Optimal conc. (mg/L)	Frequency (%)
2,4-D only	1.0	19.53	1.0	1.56
2,4-D+BA	1.0+0.1	8.28	2.0+0.1	0.31
2,4-D+Kinetin	1.0+0.1	13.16	1.0+0.1	0.50
NAA only	2.0	4.68	2.0	0.32
NAA+BA	2.0+0.1	4.03	2.0+1.0	0.32
NAA+Kinetin	1.0+0.1	4.48	2.0+0.1	0.98

¹⁾Concentrations of growth regulators tested were 0, 0.01, 0.1, 1.0 and 2.0 mg/L for auxins(2,4-D and NAA), and 0, 0.1 and 1.0 mg/L for cytokinins(BA and kinetin), respectively. Anthers were treated with 5°C for 10 days. All data were determined at 8 weeks after anther inoculation.

BA 1.0 mg/L 또는 kinetin 1.0 mg/L 혼합처리한 배지에서 배발생률이 현저히 증가하였고, IAA를 혼합하지 않고 BA나 kinetin을 단독처리한 배지에서도 배발생률이 높았다 (Table 3). 특히 IAA 0.1 + kinetin 1.0 mg/L 배지에서는 치상한 캘러스의 48%에서 배발생이 관찰되었고, IAA 0.1 + BA 1.0 mg/L 처리에서도 배발생률이 44%로 상당히 효과적이었다. IAA를 혼용처리하지 않고 BA 1.0 mg/L나 kinetin 1.0 mg/L 단독처리에서도 각각 42% 및 44%의 배발생률은 보여 시호의 약으로부터 유래한 캘러스로부터 효율적인 배발생을 위해선 auxin보다 cytokinin의 농도가 더 결정적인 역할을 하는 것으로 나타났다. 한편 고농도인 IAA 2 mg/L의 처리에서는 배발생의 효율이 현저히 감소하였다.

NAA는 IAA와는 달리 BA나 kinetin의 배발생 효과를 오히려 감소시켰다 (Table 3). BA농도가 낮은 0.1 mg/L 처리에서는 BA 단독처리보다 NAA 0.1 mg/L를 혼용한 처리에서 배발생률이 증가하나, BA 1.0 mg/L과 NAA의 혼용 처리는 배발생에 있어 BA의 단독처리효과를 감소시키는 것으로 나타났다. Kinetin도 단독처리가 NAA와 혼용처리한 배지에 비해서 배발생에 효과적이었다. 따라서 약으로부터 유래한 캘러스로부터 배발생을 통한 식물체의 재분화를 위해서는 MS 기본배지에 sucrose 30 g/L, agar 10 g/L를 첨가하고, kinetin 1.0 mg/L 또는 BA 1.0 mg/L를 단독 처리 하거나 kinetin 1.0 + IAA 0.1 mg/L 또는 BA 1.0 + IAA 0.1 mg/L 처리가 가장 효과적인 것으로 나타났다.

조제배양에 있어서 재분화 효율은 주로 배지에 첨가된

식물생장조절제의 함량에 따라 결정되어 지는데, 외부에서 처리한 왜생 성장조절제외에 식물자체가 함유하고 있는 내생 물질의 함량과 균형에 따라 성장조절제에 대한 반응이 식물 종에 따라 차이가 나는 것으로 알려져 있다 [1]. 본 실험에서 시호의 약유래 캘러스로부터 배발생의 효율을 증가시키는데 auxin인 IAA나 NAA보다 cytokinin인 BA나 kinetin이 더 결정적인 역할을 하는 것으로 나타났다.

생장조절제의 처리에 의한 캘러스의 녹화는 재분화를 위한 전 단계로 엽록소가 형성되면서 광합성이 가능한 자가영양체 (autotroph)로 발달하는 과정이다. 본 실험에서 사용한 식물생장조절제의 처리로는 기관발생, 즉 무정형의 캘러스가 뿌리나 신초와 같은 독립된 기관으로 재분화하는 효율은 상당히 저조하였고 엽록소가 형성된 녹화캘러스는 상당히 관찰되었다. 캘러스의 녹화는 BA 1.0 mg/L를 처리한 배지에서 가장 양호하였고, IAA나 NAA의 혼용은 캘러스의 녹화에 오히려 억제적으로 작용하였다 (Table 3).

Fig. 1은 본 실험에서 캘러스로부터 배발생 혹은 재분화가 관찰된 것을 사진으로 나타내었다. 미약하나마 일부 캘러스에서 눈이나 신초의 발생이 관찰되었고, 상당히 효율적인 배발생이 관찰되었다.

이상의 결과를 종합하면, 시호의 약배양을 위해서는 약을 치상하기 전에 저온처리를 하는 것이 효과적이며, 여러 가지 식물생장조절제의 단독 또는 혼용처리에서도 약으로부터 직접 배발생이 되는 효율은 상당히 저조하였다. 약유래 캘러스에서 식물체를 재분화하기 위해서는 신초나 뿌리를 발생시켜 식물체를 얻는 것보다 배발생을 유도하는 것

Table 3. Effect of various concentrations of auxins (IAA or NAA) and cytokinins (BA or kinetin) on embryogenesis and green callus formation from anther derived callus of *B. falcatum* L.

Treatments (mg/L)	Embryogenic callus(%)					Green callus(%)				
	No cytokinin	BA		Kinetin		No cytokinin	BA		Kinetin	
		0.1	1.0	0.1	1.0		0.1	1.0	0.1	1.0
No auxin	0.8	16.0	42.0	24.0	44.0	0.0	6.5	44.5	2.0	28.5
IAA 0.1	4.3	26.5	44.0	30.7	48.0	2.0	2.0	36.0	2.5	12.7
1.0	18.0	16.0	32.7	24.5	32.5	2.5	0.3	24.7	6.0	14.3
2.0	10.5	16.0	18.5	6.3	6.3	0.3	0.5	14.5	0.3	6.5
NAA 0.1	18.0	30.3	42.0	4.5	36.0	0.0	0.1	8.5	2.0	10.5
1.0	10.0	18.5	16.5	12.0	20.5	0.0	0.5	6.3	8.5	12.0
2.0	8.5	6.7	34.0	2.0	8.7	0.0	0.5	2.7	12.0	0.3

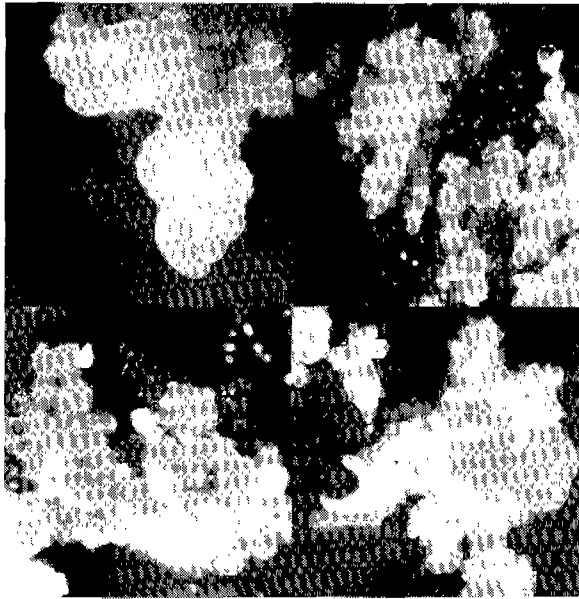


Fig. 1. Organogenesis and embryogenesis from anther derived callus of *B. falcatum*. Bud regeneration (upper left), shooting(upper right), embryogenesis from green callus(lower left) and embryogenesis from white callus(lower right)

이 효과적이었다. 약배양에 의해 재생된 식물체의 배수성 및 반수체 유래 식물체의 특성과 육종 소재로의 이용가능성에 관하여는 계속 연구 중에 있다.

요 약

시호의 약으로부터 캘러스유도와 배발생을 위해서는 약을 5℃에 10일간 저온처리를 한 후 MS기본염류에 sucrose 30 g/L, 2,4-D 1.0 mg/L 및 agar 8 g/L을 첨가한 배지에 치상하는 것이 가장 효과적이었다. 약유래 캘러스로부터 배발생을 위한 최적의 식물생장조절제는 IAA 0.1+kinetin 1.0 mg/L 또는 IAA 0.1+BA 1.0mg/L가 첨가된 MS배지로 각각 48% 및 44%의 배발생률을 보였다. 한편 BA 1.0 mg/L 단독처리나 kinetin 1.0mg/L 단독처리에서도 각각 42% 및 44%의 배발생률은 보여 시호의 약유래 캘러스로부터 효율적인 배발생에는 auxin보다 cytokinin의 농도가 더 결정적인 역할을 하는 것으로 나타났다. 녹화 캘러스의 형성에는 BA 1.0 mg/L가 단독 처리된 배지가 가장 효과적었고 auxin의 첨가는 오히려 캘러스의 녹화를 억제시켰다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 교육부 학술진흥재단 과학기술중점 연구과제 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis. pp. 82-123, In D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada(ed.) *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol 1. MacMillan Publishing Co., New York.
2. Bae, H. H., D. Y. Cho, S. G. Kim, W. Soh and R. S. Seoung. 1994. Effect of 2,4-D on adventitious root formation from callus of *Bupleurum falcatum* L. and its histological observation. *Korean J. Plant Tissue Culture* **21**, 41-46.
3. Cho, D. Y. and W. Y. Soh. 1995. Morphological observation of somatic embryogenesis in leaf explant cultures of *Bupleurum falcatum* L. *Korean J. Plant Tissue Culture* **22(5)**, 291-297.
4. Hiraoka, N., T. Kodama, M., Oyanagi, S. Nakano, Y. Tomita, N. Yamada, O. Iida, and M. Satake. 1986. Characteristic of *Bupleurum falcatum* plants propagated through somatic embryogenesis of callus cultures. *Plant Cell Report* **5**, 319-321.
5. Hu, C. Y. and I. M. Sussex. 1971. In vitro development of embryoids on cotyledon of *Ilex aquifolium*. *Phytomorphology* **21**, 103-107.
6. Jo, P. H., R. S. Seong, H. H. Bae, W. Y. Soh and D. Y. Cho. 1990. Saikosaponin contents in *Bupleurum falcatum* root produced by tissue culture. *Korean J. Pharmacogn* **21**, 205-209.
7. Kang, T. J. 1996. Plant regeneration from anther culture of spring wheat(*Triticum aestivum* L.). *Korean J. Plant Tissue Culture* **23(6)**, 367-370.
8. Kim, S. K., D. Y. Cho and W. Y. Soh. 1995. Saikosaponin content in adventitious root formed from callus of *Bupleurum falcatum* L. *Korean J. Plant Tissue Culture* **22(1)**, 29-33.
9. Lazar, M.D., G. W. Schaeffer and P. S. Baenziger. 1985. The physical environment in relation to high frequency callus and plantlet development in anther cultures of wheat(*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Physiology* **121**, 103-109.

10. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-479.
11. Sharp, W. R., M. R. Sondahl, L. S. Caloas, S. B. Maraffa. 1980. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Horticultural Review* **2**, 268-310.
12. Smith, D.L. and A. D. Krikorian. 1989. Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. *Amer. J. Botany*: 1832-1843.
13. Williams, E. G. and G. Mahaswaran. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Anal. of Botany* **57**, 443-462.

(Received June 18, 2001; Accepted July 22, 2001)