

액아배양을 통한 고추나물의 대량증식

김미란* · 남동우* · 안준철** · 황 백*†

*전남대학교 생물학과 및 자원식물연구소, *서남대학교 생명과학과

Micropropagation of *Hypericum erectum* by Axillary Bud Culture

Mei Lan Jin*, Dong Woo Nam*, Jun Cheul Ahn**, and Baik Hwang*†

*Department of Biology and Institute of plant Resources, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea.

**Department of Life Sciences, Seonam University, Namwon 590-170, Korea.

ABSTRACT : One of micropropagation methods was investigated by using a multiple-shoots protocol. Multiple shoot formation was obtained from excised axillary buds of *Hypericum erectum* on half-strength or basal MS medium supplemented with TDZ or BA. The optimal combination of shoot multiplication for the production of more shoots with a suitable size was MS medium supplemented with 0.005 mg · L⁻¹ TDZ (6.5 adventitious shoots per node). *In vitro* rooting was carried on half-strength MS medium with 1 mg · L⁻¹ GA₃ and 0.5 mg · L⁻¹ IBA treatment. In addition, the rooted cuttings were showed a better root growth in the greenhouse and survived in more than 90%. The results show that the species can be micropropagated effectively by the application of axillary bud culture systems.

Key word : micropropagation, shoot multiplication, *in vitro* rooting

서 언

고추나물 (*Hypericum erectum*)은 측막태좌목 물레나물과에 속하는 다년생 초본식물이다. 고추나물 속 식물은 전 세계적으로 약 300 여종이 분포되어 있고 한국에는 약 12종이 자라며 전국 각처의 산야지의 약간 습한 곳에서 자생하는데 주로 제주도와 남부 지방에 분포하고 있다. 좁고추나물, 진주고추나물, 애기고추나물, 채고추나물, 큰고추나물, 다복고추나물 등이 있는데 주로 식용, 관상용, 약용에 쓰이며 한방과 민간에서는 6~8월에 전초를 캐서 말린 것을 소연요(小蓮翹)라고 하고 토혈, 코피, 혈변, 월경불순, 외상출혈, 타박상, 증기 등에 약재로 쓴다 (김, 1999).

고추나물과 유사한 종으로 서양에서는 St. John's Wort (*Hypericum perforatum*)가 잘 알려져 있는데, 고대부터 신경질환, 우울증, 신경통 등 질병을 치료하는 전통적인 약용식물이다. St. John's Wort의 주요 유효성분은 hypericin인데, 주로 우울증 치료와 새로운 항암 화합물의 원료로 쓰이는데 이 식물을 원료로 시판되는 제품의 수요량이 급속히 증가함에 따라 그 연간시장은 미국에서만도 2억 1천만 달러, 그리고 전 세계적으로 5억 7천만 달러가 넘는다고 보고되었다 (Gibson, 2000; Schempp *et al.*, 2002).

최근 고추나물도 hypericin을 고함유한 것으로 알려져 St. John's Wort와 그 약효를 비교하려는 시도가 이루어지고 있다. RAPD 분석을 통해 고추나물이 물레나물보다는 St. John's Wort와 유연관계가 더 가깝다는 것이 확인되었고 (Kim *et al.*, 2005) 또한 병풍산 고추나물은 St. John's Wort보다 hypericin 함량이 높다고 보고되었다 (Kim *et al.*, 2005). 그러나 고추나물에 대한 기내 조직배양 연구는 거의 없었고 대량증식을 위한 조직배양법이 적용되었다는 보고는 아직 없는 실정이다. 액아배양은 세포배양을 통한 기관발생이나 체세포배 발생법에 비해 탈분화가 일어나지 않고 유전적으로 안정된 방법이며 유식물체의 획득에 필요한 시간도 짧기 때문에 대량증식 수단으로서 실용성이 높다. 따라서 본 연구에서는 고추나물을 실제 재배에 공급하기 위한 기초연구로서 hypericin 고함유 고추나물을 이용하여 액아배양을 통한 대량증식의 기내 배양조건을 확립하였다.

재료 및 방법

1. 식물재료

본 연구는 기내 배양종인 Kim 등 (2005)에 의해 선발된 hypericin 고함유 병풍산 고추나물을 실험재료로 사용하였다.

†Corresponding author: (Phone) +82-62-530-3392 (E-mail) bhwang@chonnam.ac.kr

Received November 22, 2005/ Accepted January 20, 2006

2. 액아로부터 multiple shoot의 유도

기내배양 중인 고추나물의 줄기에서 액아를 포함한 마디를 약 1 cm의 길이로 잘라 0.001, 0.005, 0.010 mg · L⁻¹ TDZ와 0.1, 0.5, 1.0 mg · L⁻¹ BA를 농도 별로 각각 첨가한 MS 고체 배지와 무기염의 농도를 1/2로 줄인 1/2MS 고체배지 (3% sucrose, 0.3% gelitel, pH 5.7)를 사용하였다. 절편은 각 처리 구당 5반복씩 치상하여 광조건 50 μmol m⁻²s⁻¹, 광주기 16/8 h, 온도 25 ± 1°C에서 6주간 배양한 후 신초의 발생 수와 길이 및 신초의 발생 양상을 관찰하였다.

3. 뿌리 유도

액아로부터 발생한 신초의 생장 및 발근을 위한 적정 배지, 생장조절제의 종류 및 농도를 규명하기 위해 액아로부터 발생된 3~4 cm 정도로 자란 신초를 하나씩 절단하여 1/2MS 고체 배지에 1.0 mg · L⁻¹ GA₃와 0.1, 0.5, 1.0 mg · L⁻¹ IAA, IBA를 조합 첨가된 배지에 각 처리구 당 5반복씩 치상하였다. 배양 조건은 광조건 50 μmol m⁻²s⁻¹, 광주기 16/8 h, 온도 25 ± 1°C으로 하여 4주 배양 후 신초의 길이, 뿌리의 발생수, 길이를 측정하였다.

4. 기외순화

기내에서 발근된 식물체를 조심스럽게 꺼내어 수돗물로 뿌리에 묻은 gelrite를 깨끗이 씻어내고 준비된 상토가 담긴 포트에 옮긴 후 wrap으로 덮고 충분히 관수하여 수분을 포화 상태로 유지하면서 순화하였다. 2주 후부터는 wrap을 완전히 벗기고 외부에 점차 순화하도록 하였다. 포트에서 3주간 순화 처리된 식물체는 온실로 이식한 후 건조하지 않도록 관수하면서 재배하였다.

결과 및 고찰

1. 액아로부터 multiple shoot의 유도

배양 2주 후부터 절편의 액아로부터 신초의 생장이 시작되었고 배양 3주 후에는 multiple shoot가 유도되었다. Multiple shoot의 유도 기본배지로는 MS 처리구가 1/2 MS보다 양호하여 염의 농도에 따른 신초의 발생 양상이 다르게 나타났으며, 생장조절제로는 TDZ가 BA보다 효과적이었다 (Table 1). TDZ처리구나 BA 처리구에서 모두 낮은 농도에서는 잎의 발달이 좋고 신초가 굵고 튼튼하게 자랐고, 농도가 증가될수록 신초는 많이 발생하였으나 크기가 작고, 잎의 색깔이 연녹색으로 변하였으며 또 절편의 기부에 직경이 0.5 cm 정도의 녹색의 밀집형 캘러스가 발생하였다. 고농도의 cytokinin에 의해 유도된 캘러스가 줄기신장을 억제한다는 것은 이미 많은 연구에서 보고되었다 (Shim & Ha, 1997; Kim *et al.*, 1997). 한편 1/2 MS에 고농도의 BA가 첨가된 처리구에서는 신초의 크기가 매우 작고 엽록체의 발달이 미약하여 색소의 침적이 많아 전체적으로 붉은 색을 띠다가 배양 후기에는 갈변되는 것을 관찰할 수 있었다. 1/2 MS 배지에 0.010 mg · L⁻¹의 TDZ를 첨가한 처리구에서 평균 7.8개의 신초를 형성하여 가장 높은 수치를 보였지만, 신초의 생장이 매우 저조하였다. 전반적으로 신초의 발생빈도와 크기를 고려할 때 최적의 조건은 신초의 수가 6.5개, 크기가 1.4 cm인 MS 배지에 0.005 mg · L⁻¹ TDZ가 첨가된 처리구로 가장 양호한 생장을 보였다 (Fig. 1).

TDZ는 치환 페닐우레아 화합물로서 구조적인 면에서 auxin이나 purine 계통의 cytokinin과는 다르지만 배양된 절편의 생장이나 분화촉진에 있어서 다른 cytokinin보다 효과적인 것으로 밝혀져 여러 식물의 조직배양에 있어 TDZ의 사용이 증가

Table 1. Effect of TDZ or BA on shoot multiplication from axillary buds culture of *H. erectum* after 6 weeks culture.

Media	PCRs (mg · L ⁻¹)		No. of shoot/ axillary bud	Shoot length (cm)	Callus formation (%)	
	TDZ	BA				
MS	0		1.2 ± 1.2	2.9 ± 0.7	-	
	0.001		2.6 ± 0.8	1.9 ± 0.9	-	
	0.005		6.5 ± 1.2	1.4 ± 1.1	10	
	0.010		7.2 ± 2.4	0.9 ± 0.9	20	
		0	1.0 ± 1.7	2.8 ± 0.7	-	
		0.1	2.1 ± 0.9	1.5 ± 1.1	10	
		0.5	3.2 ± 0.8	0.9 ± 0.8	30	
		1.0	3.8 ± 1.9	0.7 ± 1.1	50	
	1/2MS	0		1.0 ± 0.0	2.7 ± 1.1	-
		0.001		1.2 ± 1.2	1.6 ± 0.7	10
0.005			4.5 ± 1.3	1.4 ± 0.8	20	
0.010			7.8 ± 1.9	0.8 ± 0.5	80	
		0	1.1 ± 1.2	2.0 ± 1.1	-	
		0.1	2.3 ± 1.3	1.3 ± 1.7	10	
		0.5	5.5 ± 1.5	0.7 ± 1.4	80	
		1.0	-	-	-	

※ Mean ± standard deviation.

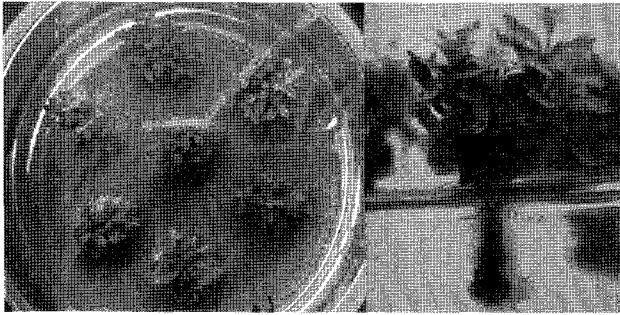


Fig. 1. Micropropagation of *H. erectum* through axillary buds culture on MS medium containing $0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ.



Fig. 2. Rooting on the 1/2 MS medium containing $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA_3 and $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA.

하는 추세에 있다 (Murthy *et al.*, 1998). Kang 등 (2003)의 보고에 의하면 히어리나무의 기내번식에서도 TDZ 처리가 multiple shoot의 유도에 효과적이었다고 한다. BA는 액아배양에서 가장 보편적으로 사용해진 cytokinin인데 (Shim *et al.*, 1997; Moon *et al.*, 2003), 본 실험의 경우 multiple shoot의 유도에 특별한 효과가 없었다.

2. 신초의 생장 및 뿌리 유도

$0.005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TDZ에서 발생된 신초를 절단하여 뿌리 유도 배지에 치상해 본 결과, 배양 2주부터 절편에 따라 뿌리가 유도되기 시작하였으며 유도된 뿌리는 검푸른색으로 세균이 없이 곧은 뿌리로 여러 방향으로 잘 발달되었다 (Fig. 2). 전반적으로 IBA 처리가 IAA보다 발근에 다소 효과적이었으며, 두 처리구 모두에서 첨가된 농도에 비례하여 발생된 뿌리의 수는 증가한 반면에 뿌리의 신장 및 신초의 생장은 억제되는 것으로 나타났다 (Table 2). 잎이 정상적으로 전개되고 투명화가 안 된 줄기라면 유도배지의 농도에 관계없이 거의 발근이 이루어져 고추나물의 기내 발근은 문제가 없는 것으로 나타났

다. Moon 등 (2002)은 음나무의 액아유래 기내줄기는 6주 이상 계대배양이 늦어지면 일부의 절편에서 직접 발근이 된다고 보고되었다. 본 실험의 경우도 TDZ가 처리된 배지에서 배양기간이 경과하면서 절편에 따라 발근되는 개체가 관찰할 수 있었는데 이는 아마 내생 auxin의 함량이 높은 원인으로 추측된다.

TDZ의 처리는 고추나물의 multiple shoot 유도에는 효과가 있었으나, 줄기의 신장에는 저조한 것으로 나타나 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA_3 를 auxin과 혼합 처리하였다. 기내배양 시 줄기의 생장촉진에는 지베렐린의 처리가 효과적이는데 특히 왜소한 식물에는 현저한 생장의 촉진을 일으킨다고 보고되었는데 (Daykin *et al.*, 1997) 본 실험에서도 GA_3 첨가구는 비첨가구에 비해 절간의 길이가 길어지는 것을 관찰할 수 있었다. $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA_3 와 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 IBA가 조합 첨가된 1/2MS 배지에서 뿌리의 발

Table 2. Effect of GA_3 and IAA and IBA on shoot elongation and root induction of *H. erectum* after 4 weeks culture.

Media	PGRs ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)			No. of root/explant	Root length (cm)	Shoot length (cm)	
	GA_3	IAA	IBA				
1/2MS	0	0.1		1.7 ± 0.8	2.2 ± 0.5	3.1 ± 1.1	
		0.5		2.5 ± 1.4	1.7 ± 0.9	2.2 ± 0.8	
		1.0		4.8 ± 1.3	1.6 ± 1.2	2.4 ± 1.2	
		0.1		2.1 ± 1.3	3.1 ± 0.8	5.7 ± 0.8	
		0.5		2.9 ± 0.9	1.8 ± 1.0	4.8 ± 1.4	
		1.0		4.5 ± 1.3	2.0 ± 1.0	4.6 ± 0.9	
	1			0.1	2.2 ± 1.4	2.9 ± 0.8	3.6 ± 0.8
				0.5	3.6 ± 0.8	2.2 ± 0.9	2.8 ± 1.4
				1.0	5.6 ± 1.6	1.5 ± 0.9	1.5 ± 0.9
				0.1	1.9 ± 1.5	2.8 ± 1.0	7.3 ± 0.9
				0.5	3.3 ± 0.9	2.2 ± 0.8	5.8 ± 1.1
				1.0	5.5 ± 1.6	2.2 ± 1.2	5.1 ± 1.4

※ Mean ± standard deviation.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21사업과 산업기술재단 지역혁신인력양성사업의 지원에 의하여 수행되었습니다.

LITERATURE CITED

Daykin A, Scott IM, Francis D, Causton DR (1997) Effect of gibberellin on the cellular dynamics of dwarf pea internode development. *Planta* 203:526-535.

Gibson DM (2000) Boosting the quality and potency of St. John's wort, in: *Agricultural Research*, July 2002. Ithaca, NY, Camilo Cannel. Oxford University Press. p. 12-13.

Kang HJ, Moon HK, Yi JS (2003) Micropropagation of *Corylopsis coreana* by thidiazuron treatment. *Korean J. Plant Biotechnology* 30(3):263-267.

Kim KS, Seung NS, Kim MW, Pyo BS, Hwang B. (1997) Micropropagation of *Achyranthes Japonica* through axillary bud culture. *Korean. J. Plant Tissue Culture* 24(6):357-360.

Kim SH, Jung YJ, Ahn JC, Hwang B (2005) Hypericin contents of *Hypericum erectum* Thunberg. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 13(3):101-104.

Kim SH, Kim ES, Kim SH, Ahn JC, Hwang B (2005) Analysis of genetic relationships in *Hypericum erectum* Thunb. by RAPD. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 13(4):141-145.

Kirdmanee C, Kitaya Y, Kozai T (1995) Effects of CO₂ enrichment and supporting material in vitro on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets in vitro and ex vitro. *In Vitro Cell Dev Biol-plant* 31:144-149.

Moon HK, Kim JA, Lee HS, Kang HD (2003) Micropropagation via axillary bud induction of *Eucalyptus pellita*. *Korean J. Plant Biotechnology* 30(3):269-273.

Moon HK, Kim SH, Kim BK (2002) Micropropagation of *Kalopanax pictus* Nakai via axillary bud culture. *J. Korean For. Soc.* 91(6):775-780.

Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1998) Review-thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 34:267-275.

Schempp CM, Krikin V, Smion-Haarhaus G, Kersten A, Kiss J, Termeer CC, Gilb B, Kaufmann T, Borner C, Sleeman JP, Simon JC (2002) Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene* 21:1242-1250.

Shim KK, Ha YM (1997) Mass propagation of Korean navie *Styrax japoni* through axillary bud culture. *J. Korean. Soc. Hort. Sci.* 38(5):575-580.

Shim KK, Ha YM, Lee SJ, Shim KB (1997) Mass propagation of *Betula pendula* 'Purpurea' through axillary bud culture. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 38(6):776-782.

김태경 (1996) 한국의 자원식물. 서울대학교 출판부. p. 116-118.

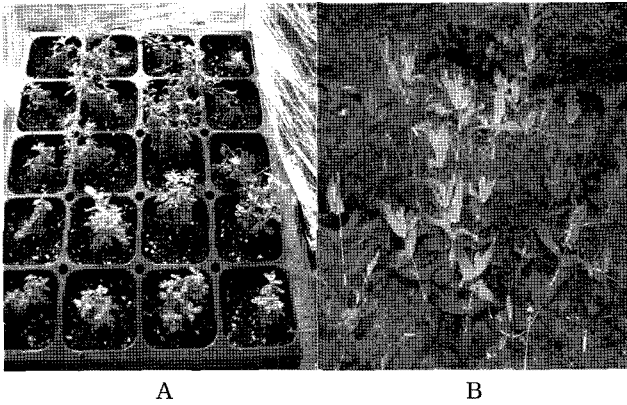


Fig. 3. A, Regenerated plants transferred into pots containing the soil. B, Acclimated plants cultivated under greenhouse.

생 및 줄기의 신장과 전개된 잎의 수 등 전반적인 식물체의 생육이 왕성하였다.

3. 기외순화

기내에서 발근된 식물체를 포트에 이식하여 3주간의 순화 처리과정을 거쳐 95%가 활착되었다 (Fig. 3A). 포트에서 순화 처리된 식물체를 온실로 이식하였을 때 90%에 가까운 높은 생존율을 보였고 유묘는 균일하게 그리고 비교적 건실하게 성장하였고 3개월 후에는 지상부의 길이가 60 cm 정도로 자랐으며 꽃이 피고 열매가 맺는 것까지 관찰할 수 있었다 (Fig. 3B). Kridmanee 등 (1995)은 기내번식의 성공여부는 생산된 식물체를 온실로의 이식결과를 통해 평가되어야 한다고 제시하였는바 이상의 실험결과는 고추나물의 기내번식 실용화의 가능성을 제공해준다.

적 요

기관배양을 통한 대량증식 방법의 일환으로 액아배양을 이용한 multiple shoot 유도 조건을 조사하였다. 기내 배양 중인 식물체로부터 액아를 절취하여 TDZ와 BA를 각각 농도 별로 첨가한 MS배지와 1/2 MS배지에서 6주간 배양한 결과, MS 기본배지에 0.005 mg · L⁻¹ TDZ가 첨가된 처리구에서 효과가 가장 양호하였다. 한편 발생된 싹초를 1 mg · L⁻¹ GA₃와 0.5 mg · L⁻¹ IBA가 첨가된 1/2 MS 배지에 배양했을 때 뿌리의 발생과 신장이 가장 양호하였다. 발근된 식물체를 포트에서 순화시켜 온실로 이식하였을 때 90%에 가까운 생존율을 보였으며 형태적인 변이 없이 성장하였다. 이상의 결과는 액아유도를 통한 대량번식의 가능성을 제시한다.