

# 식물생장조절제, 배지와 고형지지물이 반하의 기내 소괴경 생산에 미치는 영향

김용경\*<sup>1</sup> · 이지연\*\*<sup>1</sup> · 김응휘\* · 조동하\*\* · 박상언\*<sup>†</sup>

\*충남대학교 식물자원학부, \*\*강원대학교 생명공학부

## Effect of Plant Growth Regulators, Media and Gelling Agents on In Vitro Microtuber Production of *Pinellia ternata* Breit.

Yong Kyung Kim\*<sup>1</sup>, Ji Yeon Lee\*\*<sup>1</sup>, Eung Hwi Kim\*, Dong Ha Cho\*\*, and Sang Un Park\*<sup>†</sup>

\*Division of Plant Science & Resources, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

\*\*School of Bioscience & Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

**ABSTRACT :** The study was carried out to establish in vitro microtuber production from leaf and petiole explant cultures of *Pinellia ternata*. Culture conditions were optimized by investigating the effect of plant growth regulators, different media, and gelling agents on the efficiency of microtuber induction. Among the different combinations of plant growth regulators tested, the combination of 0.1 mg/l 2,4-Dichlorophenoxyacetic (2,4-D) and 0.5 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP) showed the highest yield for microtuber production from leaf (3.9) and petiole (4.7) explant culture on MS medium for 6 weeks. SH (Schenk and Hildebrandt) medium was the most effective medium for microtuber induction and the half strength SH medium was better than SH medium for microtuber production from both leaf and petiole culture. Gelrite was better than agar in the formation of microtubers and 4% Gelrite showed the highest number of microtubers per explant from leaf (5.9) and petiole (7.8) culture. Germination rate of microtubers after cold stored for one months long was 86% from in vitro culture and 43% from autoclaved soil.

**Key Words :** gelling agent, media, microtuber, *Pinellia ternata* Breit., plant growth regulators

### 서 언

반하 (*Pinellia ternata* Breit)는 천남성 (Araceae)과에 속하는 다년생 초본식물로 괴경을 생약재로 이용하는 주요약용 식물 중 하나이다. 주로 한반도와 중국, 일본 등 동북아시아에 분포하며, 우리나라 전국의 산야에 자생하는 약초이나 최근 제초제 사용으로 식생이 감소하고 있으며 재배되지 않고 국내 수요를 대부분 수입에 의존하고 있는 실정이다 (Zheng and Zhou, 1991).

반하는 sitosterol, triterpene계의 saponin 물질과 ephedrin 등의 물질을 함유하며, 또한 뿌리껍질에는 아린 맛이 있는 호모젠티신산을 함유한다. 최근에는 banxia, cytidine, adenosine, 항생물질인 pinelloside 과 인프렌자 백신으로 활용 가능한 pinellic acid 등과 같은 새로운 유효성분이 보고되었다 (Nagai et al., 2002; Chen et al., 2003; Chen et al., 2006).

예로부터 반하는 한방에서 거담, 진해, 해독, 진정 등의 효능

이 있어 구토증상을 멈추는 약으로 중요하게 사용되었으며 진정제, 기침, 어지럼증, 두통, 급성위염 등에 쓰이고 있다. 최근에는 비만을 억제하는 작용이 있다는 연구결과도 발표되었다 (Maki et al., 1987; Kurata et al., 1998; Nijjima et al., 1998; Kim et al., 2001; Chen et al., 2002; Kim et al., 2006).

반하의 번식은 종자번식을 못하고 지름 1 cm 정도의 알뿌리에서 1~2개의 잎이 자라고 잎자루는 길이 10~20 cm이며 밑부분이나 위쪽에 1개의 주아가 생겼다가 떨어져서 번식한다. 그래서 번식률이 저조한 편이므로 식물 조직배양 기술을 이용하여 기내에서 반하 식물체번식 연구가 많이 진행되어 왔다 (Shoyama et al., 1983a; Shoyama et al., 1983b; Hatano et al., 1986; Nishioka I, 1988; Tsay et al., 1989; Shinji & Okada, 1990). 하지만 선행연구 결과들은 기내에서 식물체로 재분화시켜 순화 과정을 거쳐 포장으로 옮겨야 한다. 따라서 본 연구에서는 반하의 기내 조직배양을 통해 소괴경 생산의 가능성을 알아보기 위하여 소괴경 생산에 적합한 식물생장조

<sup>1</sup> These two authors contributed equally to this work

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-42-821-5730 (E-mail) supark@cnu.ac.kr

Received May 8, 2007/ Accepted May 30, 2007

절제 처리조건, 배지와 처리 농도, 고형지지물의 종류와 농도를 조사하였고 생산된 소과경을 직접 토양에 파종하여 번식용 종자로 활용 가능성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 무균 식물체 유도 및 배양

기내 무균 반하 식물체 유도를 위하여 충남대학교 부속 농장에서 자라는 반하 엽병 하단부의 주아를 채취하여 사용하였다. 반하 주아를 에탄올 70% (v/v) 용액에 30초간 침지한 뒤 1% (v/v) sodium hypochlorite 용액에 tween 20을 0.1 ml 첨가 후 10분간 표면살균 하였다. 멸균수에 3회 세척한 후 30 ml의 MS (Murashige & Skoog, 1962) 고형 배지가 든 배양용기 (magenta box; Sigma-Aldrich)에 4개의 반하 주아를 배양하였다. 배양은 내부 온도 25°C, 광도 5000 lux로 16시간 조사되는 배양기내에서 이루어졌다.

### 2. 기내 소과경 생산과 식물체 재분화

기내 소과경 형성에 적합한 호르몬 농도 조건을 알아보기 위하여 배지에 0.1, 0.5 mg/l 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)와 0.1, 0.5 mg/l BAP (6-benzylaminopurine)를 2,4-D 단독 또는 BAP와 혼합 처리를 하여 발아 후 20일 동안 성장한 반하 기내 식물체의 잎과 엽병을 1 cm × 1 cm와 1 cm 길이로 잘라서 6개 절편을 MS 고체 배지가 첨가된 페트리디쉬에 치상하였다. 호르몬 조건을 확립 후 기내 소과경 형성에 적합한 배지의 종류를 알아보기 위해 B5 (Gamborg *et al.*, 1968), MS (Murashige & Skoog, 1962), SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) 배지에 0.1 mg/l 2,4-D와 0.5 mg/l BAP를 처리 후 반하의 엽과 엽병 절편을 치상하였다. 또한 SH 배지의 최적 농도를 알아보기 위하여 배지 농도를 1/4, 1/2, 1, 2배로 달리하여 0.1 mg/l 2,4-D와 0.5 mg/l BAP를 처리 후 반하의 엽과 엽병 절편을 치상하였다. 배지와 배지 농도 조건을 조사 후 기내 소과경 생산에 적합한 고형지지물과 그 농도를 조사하기 위하여 0.1 mg/l 2,4-D와 0.5 mg/l BAP가 처리된 1/2 SH 배지에 Agar (6, 8, 10%)와 Gelrite (2, 4, 6%)를 첨가 후 반하의 엽과 엽병 절편을 치상하였다. 배양은 온도 25°C, 광도 5000 lux로 16시간 조사되는 배양기내에서 이루어졌으며, 배양 6주 후에 생산된 소과경의 수를 조사하였다. 기내에서 생산된 소과경은 5°C에서 1개월간 냉장 보관 후에 MS 고형 배지가 든 배양용기 (magenta box; Sigma-Aldrich)와 멸균 소독한 상토에 옮겨 발아율을 조사하고 순화를 시켰다.

## 결과 및 고찰

기내 소과경 생산 연구의 실험재료를 확보하기 위하여 반하

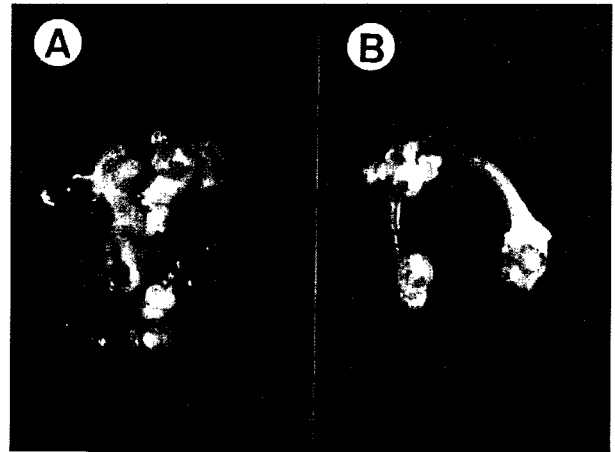


Fig. 1. Microtuber induction from leaf (A: X2) and petiole (B: X1.8) cultures of *Pinellia ternata* for 6 weeks on MS solid medium supplemented with 0.1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BAP.

엽병 하단부의 주아를 채취하여 표면살균 후 MS 고형 배지에서 배양을 하였다. 기내 소과경 형성에 적합한 호르몬 농도 조건을 알아보기 위하여 MS배지에 2,4-D (0.1, 0.5 mg/l) 단독 또는 BAP (0.1, 0.5 mg/l)와 혼합 처리를 하여 발아 후 20일 동안 성장한 반하 기내 식물체의 잎과 엽병을 배양하였다.

2,4-D와 BAP가 처리된 배지에서 배양한 결과 배양 약 3주 후 잎과 엽병 절편의 절단면으로부터 소과경 형성이 시작되는 것을 관찰할 수 있었고, 배양 6주 후에는 소과경들이 완전히 발달되었다 (Fig. 1).

배양 6 주후 기내 소과경 생산을 조사한 결과 잎과 엽병 배양 모두 2,4-D (0.1, 0.5 mg/l) 단독 처리보다 BAP (0.1, 0.5 mg/l)와 혼합 처리 시 더 많은 기내 소과경을 형성하였으며 또한 0.1 mg/l 2,4-D와 0.5 mg/l BAP 혼합처리에서 잎 (3.9개)과 엽병 (4.7개) 배양 모두 최고치의 소과경을 생산할 수 있었다. 잎과 엽병 배양시 기내 소과경 생산을 비교해 보면 모든 처리구에서 엽병 배양이 더 많은 소과경을 생산하였다 (Table 1). 감자 (*Solanum tuberosum* L.)의 기내 줄기배양에서 소과경 생산시 BAP와 2,4-D 단독처리 보다 혼합처리가 소과경 형성에 더 효과적이라는 본 연구와 유사한 결과가 보고되었다 (Muhamad & Villiers, 1997).

식물생장조절제 처리 조건을 확립 후 기내 소과경 형성에 적합한 배지의 종류를 조사하기 위해 0.1 mg/l 2,4-D와 0.5 mg/l BAP가 처리된 B5 (Gamborg *et al.*, 1968), MS (Murashige & Skoog, 1962)와 SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) 배지에 반하의 잎과 엽병 조직을 6주간 배양 후 소과경 형성을 조사한 결과 잎과 엽병 배양 모두 SH배지에서 가장 많은 4.5 와 5.2개의 소과경을 생산하였으며, B5배지가 가장 저조한 수의 소과경을 생산하였다 (Table 2).

**Table 1.** Effect of plant growth regulators on microtuber production in leaf and petiole cultures of *Pinellia ternata* for 6 weeks on MS medium culture

Explants	plant growth regulators (mg/l)	Mean number of microtubers per explant
leaf	2,4-D 0.1	2.6 ± 0.3
	2,4-D 0.5	2.3 ± 0.2
	2,4-D 0.1 + BAP 0.1	3.3 ± 0.3
	2,4-D 0.1 + BAP 0.5	3.9 ± 0.3
	2,4-D 0.5 + BAP 0.1	3.1 ± 0.2
	2,4-D 0.5 + BAP 0.5	3.6 ± 0.4
petiole	2,4-D 0.1	3.2 ± 0.2
	2,4-D 0.5	2.5 ± 0.2
	2,4-D 0.1 + BAP 0.1	4.1 ± 0.4
	2,4-D 0.1 + BAP 0.5	4.7 ± 0.4
	2,4-D 0.5 + BAP 0.1	3.4 ± 0.2
	2,4-D 0.5 + BAP 0.5	3.6 ± 0.2

Each value is the mean ± standard error of three repeated experiments with 30 explants used in each treatment.

**Table 2.** Effect of media on microtuber production in leaf and petiole cultures of *Pinellia ternata* for 6weeks on each medium with 0.1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BAP

Explants	Media	Mean number of microtubers per explant
leaf	B5	3.4 ± 0.3
	MS	3.9 ± 0.4
	SH	4.5 ± 0.5
petiole	B5	4.1 ± 0.4
	MS	4.7 ± 0.4
	SH	5.2 ± 0.5

Each value is the mean ± standard error of three repeated experiments with 30 explants used in each treatment.

SH 배지의 기내 소괴경 생산에 최적 농도를 알아보기 위하여 배지 농도를 1/4, 1/2, 1, 2배로 달리하여 0.1 mg/l 2,4-D 와 0.5 mg/l BAP를 처리한 후 반하의 잎과 엽병 절편을 6주간 배양하였다. 그 결과 잎과 엽병 배양 모두 SH 배지의 무기염류를 반으로 줄인 1/2 SH배지에서 가장 많은 4.9 와 5.7개의 소괴경을 생산하였으며, 1/4 SH배지에서는 소괴경 생산이 억제되었으며, SH 배지의 무기염류를 2배로 높인 2 X SH배지에서는 SH 배지에 비하여 더 적은 수의 소괴경을 생산하였다. 모든 처리구에서 엽병 배양이 잎 배양 보다 더 많은 소괴경을 생산하였다 (Table 3). *Cyclamen persicum* (Karam and Al-Majathoub, 2000), 감자 (Donnelly *et al.*, 2003), 마 (*Dioscorea rotundata*) (Klu *et al.*, 2005) 같은 다른 작물의 기내 소괴경 생산연구에서는 대부분 MS배지가 사용되었다. 하지만 본 연구에서는 반하의 기내 소괴경 생산에는 SH배지가 더 효율적인 것으로 나타났다.

**Table 3.** Effect of SH medium strength on microtuber production in leaf and petiole cultures of *Pinellia ternata* for 6 weeks on each medium with 0.1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BAP

Explants	Medium strength	Mean number of microtubers per explant
leaf	1/4 SH	2.7 ± 0.3
	1/2 SH	4.9 ± 0.5
	1 SH	4.5 ± 0.5
	2 SH	4.0 ± 0.3
petiole	1/4 SH	3.9 ± 0.4
	1/2 SH	5.7 ± 0.6
	1 SH	5.2 ± 0.5
	2 SH	4.6 ± 0.5

Each value is the mean ± standard error of three repeated experiments with 30 explants used in each treatment.

**Table 4.** Effect of gelling agents on microtuber production in leaf and petiole cultures of *Pinellia ternata* for 6weeks on 1/2 SH medium with 0.1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l BAP

Explants	Gelling agents (%)	Mean number of microtubers per explant
leaf	Agar 6	5.6 ± 0.5
	8	4.9 ± 0.5
	10	3.2 ± 0.2
	Gelrite 2	5.6 ± 0.5
	4	5.9 ± 0.6
	6	4.4 ± 0.4
petiole	Agar 6	6.7 ± 0.5
	8	5.7 ± 0.6
	10	4.4 ± 0.4
	Gelrite 2	7.2 ± 0.6
	4	7.8 ± 0.7
	6	6.9 ± 0.7

Each value is the mean ± standard error of three repeated experiments with 30 explants used in each treatment

기내 소괴경 생산에 적합한 고형지지물과 그 농도를 조사하기 위하여 0.1 mg/l 2,4-D와 0.5 mg/l BAP가 처리된 1/2 SH 배지에 Agar (6, 8, 10%)와 Gelrite (2, 4, 6%)를 첨가 후 반하의 잎과 엽병 절편을 6주간 배양하였다. Table 4에서 같이 잎과 엽병 절편 배양 모두에서 고형지지물은 agar보다 gelrite에서 소괴경 형성이 잘 되었으며, 특히 잎 조직 보다는 엽병 조직에서 소괴경 형성율이 높았다. 농도별로는 agar의 경우는 농도가 낮은 6% 처리에서 잎과 엽병 조직 모두에서 가장 많은 소괴경을 생산하였으며, Gelrite는 4% 처리에서 최고치의 소괴경을 생산할 수 있었다 (Table 4). 감자 (*Solanum tuberosum* L.)의 기내 소괴경 생산 연구에서 고형지지물의 종류가 소괴경 형성에 미치는 영향을 조사한 결과 agar 보다 gelrite가 더 효과적이었다는 본 연구와 유사한 결과가 보고되

었다 (Veramendi *et al.*, 1997; Uranbey *et al.*, 2004).

배양 6주후에 기내에서 생산된 소괴경은 5°C에서 1개월간 냉장 보관 후에 성장상에서 MS 고형 배지가 든 배양용기와 멸균 소독한 상토에 옮겨 발아율을 조사하였다. MS 고형 배지에서 자란 소괴경은 86%의 발아율을 보였으며, 멸균 소독한 상토에서는 43%의 발아율을 보였다. 앞으로 기내 생산된 반하 소괴경의 발아율과 토양 적응성을 높이는 연구를 보강하여 토양에 소괴경을 직접 토양에 파종하여 번식용 종자로 활용할 수 있는 방안을 모색할 예정이다.

## 적 요

반하의 기내 조직배양을 통해 소괴경 생산을 하고자 적합한 식물생장조절제 처리조건, 배지와 처리 농도, 고형지시물의 종류와 농도를 조사하였다. 기내 소괴경 형성에 적합한 식물생장조절물질과 농도 조건을 연구 한 결과 0.1 mg/l 2,4-D와 0.5 mg/l BAP 혼합처리에서 잎 (3.9개)과 엽병 (4.7개) 배양 모두 최고치의 소괴경을 생산할 수 있었다. 기내 소괴경 형성에 적합한 배지는 SH배지로 나타났으며 잎과 엽병 배양에서 4.5와 5.2개의 소괴경을 생산하였으며, 최적 농도는 SH 배지의 무기염류를 반으로 줄인 1/2 SH배지가 가장 효과적이었다. 기내 소괴경 생산에 적합한 고형지시물과 그 농도를 조사한 결과, 잎과 엽병 배양 모두 agar보다 gelrite에서 소괴경 형성이 잘 되었으며, 농도별로는 agar 6%, Gelrite는 4% 처리에서 최고치의 소괴경을 생산할 수 있었다. 기내에서 생산된 소괴경은 5°C에서 1개월간 냉장 보관 후에 성장상에서 MS 고형 배지가 든 배양용기와 멸균 소독한 상토에 옮겨 발아율을 조사한 결과, MS 고형 배지에서 자란 소괴경은 86%의 발아율을 보였으며, 멸균 소독한 상토에서는 43%의 발아율을 보였다. 추후 반하 소괴경의 발아율과 토양 적응성을 높이는 연구 보강으로 소경을 번식용 종자로 활용할 수 있는 방안을 모색할 예정이다.

## 사 사

이 논문은 2005년도 충남대학교 학술연구비의 지원에 의하여 연구되었음

## LITERATURE CITED

- Chen D, Wu CF, Huang L, Ning Z (2002) Effect of the aqueous extract of xiao-ban-xia-tang on gastric emptying in mice. *Am J Chin Med.*, 30:207-14.
- Chen JH, Cui GY, Liu JY, Tan RX (2003) Pinelloside, an antimicrobial cerebroside from *Pinellia ternata*. *Phytochemistry*, 64:903-906.
- Chen P, Li C, Liang S, Song G, Sun Y, Shi Y, Xu S, Zhang J, Sheng S, Yang Y, Li M (2006) Characterization and quantification of eight water-soluble constituents in tubers of *Pinellia ternata* and in tea granules from the Chinese multiherb remedy Xiaochaihu-tang. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 843:183-193.
- Donnelly DJ, Coleman WK, Coleman SE (2003) Potato microtuber production and performance: a review. *Am J Potato Res.*, 80:103-115.
- Gamborg OL, Miller RO, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50:151-158.
- Hatano K, Shoyama Y, Nishio I (1986) Multiplication of *Pinellia ternata* by Callus Culture of Leaf Segment. *Shoyakugaku Zasshi*, 40:188-192.
- Karam NS1, Al-Majathoub M (2000) Direct shoot regeneration and microtuberization in wild *Cyclamen persicum* Mill. using seedling tissue. *Scientia Horticulturae*, 86:235-246.
- Kim SH, Jeong H, Kim YK, Cho SH, Min KU, Kim YY (2001) IgE-mediated occupational asthma induced by herbal medicine, Banha (*Pinellia ternata*). *Clin Exp Allergy*, 31(5):779-81.
- Kim YJ, Shin YO, Ha YW, Lee S, Oh JK, Kim YS (2006) Anti-obesity Effect of *Pinellia ternata* extract in Zucker Rats. *Biol Pharm Bull.*, 29:1278-81
- Klu GYP, Asare EK, Blay ET, Ng SYC (2005) Effect of medium type and incubation duration on improved in vitro tuberization in three *Dioscorea rotundata* Poir cultivars. *PGR Newsletter*, 144:24-29.
- Kurata K, Tai T, Yang Y, Kinoshita K, Koyama K, Takahashi K, Watanabe K, Nunoura Y (1998) Quantitative analysis of anti-emetic principle in the tubers of *Pinellia ternata* by enzyme immunoassay. *Planta Med.*, 64:645-648.
- Maki T, Takahashi K, Shibata S (1987) An anti-emetic principle of *Pinellia ternata* tuber. *Planta Med.*, 53:410-414.
- Muhamad AA, Villiers TA (1997) Induction of microtubers in vitro from stem segments of *Solanum tuberosum* L., *S. commersonii* Dun. and *S. acaule* Bitt. *Scientia horticulturae*, 70:231-235.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15:473-497
- Nagai T, Kiyohara H, Munakata K, Shirahata T, Sunazuka T, Harigaya Y, Yamada H (2002) Pinellinic acid from the tuber of *Pinellia ternata* Breitenbach as an effective oral adjuvant for nasal influenza vaccine. *Int Immunopharmacol.*, 2:1183-1193.
- Nijima A, Kubo M, Hashimoto K, Komatsu Y, Maruno M, Okada M (1998) Effect of oral administration of *Pinellia ternata*, *Zingiberis rhizoma* and their mixture on the efferent activity of the gastric branch of the vagus nerve in the rat. *Neurosci Lett.*, 258:5-8.
- Nishioka I (1988) Clonal Multiplication of Medicinal Plant by Tissue Culture. *Shoyakugaku Zasshi*, 42:1-11.
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and technique. for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 50:199-204.
- Shinji H, Okada M (1990) The Role of the Medium Constituents

- on the Growth of Cultured *Pinellia ternata* Plant (1) The Role of Sucrose. *Shoyakugaku Zasshi.*, 44:304-310.
- Shoyama Y, Hatano K, Nishioka I** (1983a) Clonal Multiplication of *Pinellia ternata* by Tissue Culture. *Planta Medica.*, 47:14-16.
- Shoyama Y, Hatano K, and** (1983b) Rapid and Simple Multiplication of *Pinellia ternata* by Tissue Culture. *Planta Medica.*, 47:103-105.
- Tsay HS, Gau TG, Chen CC** (1989) Rapid Clonal Propagation of *Pinellia ternata* by Tissue Culture. *Plant Cell Reports*, 8:450-454.
- Uranbey S, Parmaksiz İ, Sancak C, Çöçü S, Özcan S** (2004) Temperature and gelling agent effects on in vitro microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biotech. and Biotech. Equip.* 18:89-94.
- Veramendi J, Villafranca MJ, Sota V, Mingo-Castel AM** (1997) Gelrite as an alternative to agar for micropropagation and microtuberization of *Solanum tuberosum* L. cv. Baraka. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 33:195-199.
- Zheng B and Zhou L** (1991) Status of Yunnan drug banxia and its botanical origin. *Journal of Chinese Traditional Drugs*, 16:135-136.