

## 천궁의 현탁배양에서 탄소원과 질소원이 체세포배 형성에 미치는 영향

채영암 · 박상언\*

### Effect of Carbon and Nitrogen Source on Somatic Embryogenesis in Suspension Culture of *Ligusticum chuanxiang* Hort.

Young-Am Chae and Sang-Un Park\*

**ABSTRACT** : This study was carried out to select the appropriate medium(especially, carbon and nitrogen source) for somatic embryogenesis in order to develop the rapid mass production system in suspension culture of *chuanxiang* Hort. Suitable medium for somatic embryo formation was MS medium. The half strength MS medium was effective for somatic embryo development. Sucrose was the most effective carbon source for somatic embryo formation, however, production of somatic embryos was reduced at higher concentration of sucrose. Effects of suger was the same as sucrose. Somatic embryo formation was higher as the decrease of  $NH_4NO_3$ , and optimum ratio of  $KNO_3 : NH_4NO_3$  was 825 : 238mg /1. Regenerated plant was obtained in MS basal medium and survival late of plantlet was 60-70% after transplanted directly to the vermiculite.

Key words : *Ligusticum chuanxiang*, Carbon and nitrogen source, Somatic embryogenesis, Suspension culture.

천궁은 미나리과에 속하는 우리나라 주요 약육작물의 하나로 개화는 하나 종자가 결실되지 않아 종자번식이 불가능하다(이, 1988). 현재 번식은 노두를 쓰고 있으나 증식율이 2~3배로 극히 낮아 대량 증식 방법의 개발이 시급하다. 유도한 캘러스의 현탁배양에서 체세포배 형성에는 여러가지 요인들이 관여하지만 이중에서도 탄소원과 질소원의 종류와 농도는 가장 큰 비중을 차지하고 있다. 탄소원으로

는 단당류와 이당류가 사용되지만 당근 현탁배양에서 체세포배 발생에는 sucrose가 가장 좋았으며 (Verma & Dougall, 1977), *Citrus* 배주에서 유래된 캘러스의 경우는 galactose가 배형성을 촉진한다고 보고하였다(Kochba 등, 1978). Shamouti orange의 배주에서 유래된 non-embryogenic 캘러스의 경우는 4주간 sucrose없이 배양하다가 sucrose가 첨가된 배지로 옮기면 배형성이 촉진된다

\* 서울대학교 농학과-농업생물신소재연구센터(Agronomy Department and Research Center for New Biomaterials in Agriculture of Seoul National University, Suwon, 441-744) <93.10.16. 接受>

고 보고하였다(Kochba & Button, 1974). 질소원으로는 nitrate가 첨가된 상태에서 casein-hydrolysate(Amirato & Steward, 1971), L-glutamine 또는 L-alanine(Wetherzell & Dougall, 1976) 등을 처리하거나 ammoniumion(Halperin, 1966 : Amirato & Steward, 1971) 등을 사용하였다.

본 실험실에서는 천궁의 캘러스 유도과 식물체 재생에 관한 실험을 선행하였으나 식물체 재생은 긴 시간이 요구되었으며, 생육도 불량하여 고품배지에서 실험은 비효율적이라고 판단하였다(채와 박, 1993).

따라서 천궁의 현탁배양에 의한 체세포배 대량생산 체계를 확립하기 위하여 배양배지의 최적화 실험의 일부로 체세포배 발생에 적합한 탄소원과 질소원의 종류와 비율 조건을 알아보고자 하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 배발생 캘러스의 유도와 유지

본 실험에서 사용한 재료는 작물시험장 약용작물 포장에서 재배하는 천궁의 미숙화기를 사용하였다. 채취한 미숙화기를 증류수로 수세 후 0.25% sodium hypochlorite에 tween 20 두 방울을 첨가한 용액속에서 15분 동안 흔들어 표면살균 후 0.5cm 크기로 절단하여 2,4-D 0.5mg/1이 처리된 Murashige-Skoog(1962) 기본배지(agar 0.8%, sucrose 3%)에 치상하였다. 8주간 배양하여 유도된 배발생 캘러스를 빠른 방법으로 증식하고 유지하기 위해 2,4-D, 0.1, 0.5, 1, 및 2mg/1를 처리한 MS 기본배지에 캘러스를 현탁배양하였다. 배양조

건은 형광등을 광원으로 사용하여 1000lux, 16시간 일장과 25℃에서 배양하였다.

### 2. 현탁배양에서 체세포배 발생에 미치는 요인

캘러스를 잘게 부수어 60mesh의 체를 통과시켜 현탁배양 시료로 사용하였고, 100ml 삼각플라스크에 배양액(MS 배지 농도를 반으로 줄인 1/2X MS배지) 20ml과 시료 3ml(약 0.01g)씩 가하여 배양하였다. 진탕속도는 100rpm으로 하였고, 10일간격으로 새로운 배지로 계대배양하였다. 배양조건은 형광등을 광원으로 사용하여 1000lux, 16시간 일장과 25℃에서 배양하였다. 현탁배양에서 체세포배 발생에 적합한 배지 종류와 배지농도 및 탄소원과 질소원 처리조건을 규정하기 위하여 배지로는 B5(Gambroget al), LS(Linsmaier-Skoog), MS(Murashige-Skoog), White배지를 사용하였으며, MS배지의 농도를 2X MS, 1X MS, 1/2X MS, 1/4X MS, 1/8X MS로 처리하였다. 탄소원은 1/2X MS 배지에 fructose, galactose, glucose, maltose, sucrose를 3%씩 처리하였고, sucrose와 상업용 sugar(삼양사)를 1/2X MS 배지에 1, 3, 5, 7, 9% 농도별로 처리하였다. KNO<sub>3</sub>와 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>의 처리량을 달리한 16개 조합을 처리하여 체세포배 발생에 적합한 조합을 조사하였다.

### 3. 식물체 재생과 순화

현탁배양에서 형성된 체세포배를 식물생장조절제를 첨가하지 않는 MS 기본배지에 치상후 4주간 배양하여 유식물체를 얻었고 이 식물체를 순화 과정없이 바로 재배될 수 있는지를 알기 위하여 비뮤큐라이트로 직접이식하였다.

Table 1. Growth of *Ligusticum chuanxiang* embryogenic callus in suspension culture using MS medium containing different concentrations of 2,4-D after 3 weeks.

2,4-D (mg/l)	Fresh weight (g/20ml medium)	Frequency of embryogenic callus(%)
0.1	1.2 ± 0.3	75
0.5	2.4 ± 0.5	75
1.0	1.8 ± 0.5	60
2.0	0.8 ± 0.2	40

Table 2. Effect of basal media on somatic embryos formation and development in suspension culture of *Ligusticum chuanxiang* after 3 weeks.

Basal media	Stages of somatic embryo development				Total F.W. of embryos(g±SE)
	Globular	Heart	Torpedo	Cotyledon	
B5(Gambrog et al)	17±5	7±2	6±1	3±1	0.3±0.1
LS(Linsmaier-Skoog)	29±7	16±4	13±4	10±3	1.1±0.3
MS(Murashige-Skoog)	35±11	19±8	17±5	14±5	1.3±0.4
White	16±6	5±1	4±2	2±0	0.3±0.1

Table 3. Effect of strength of MS medium on somatic embryos formation and development in suspension culture of *Ligusticum chuanxiang* after 3 weeks.

Medium strength		Stages of somatic embryo development				Total F.W. of embryos(g±SE)
		Globular	Heart	Torpedo	Cotyledon	
2	MS	11±3	6±2	4±1	6±1	0.5±0.1
	MS	35±9	19±7	17±4	14±6	1.3±0.4
1/2	MS	43±14	21±11	17±5	19±7	1.7±0.3
1/4	MS	12±3	7±2	5±1	5±0	0.5±0.1
1/8	MS	9±2	3±1			0.1±0.0

## 結果 및 考察

### 1. 배발생캘러스 유도과 유지

배발생캘러스를 유도하기 위해 2,4-D 0.5mg /l 이 처리된 MS배지에 미숙화기를 배양한 결과 4주 후에 절편부위로 부터 캘러스가 형성되기 시작하였으며 8주 후에는 조직이 연하고, 하얀 캘러스와 노르스름하면서 단단하고 둥글둥글한 배발생캘러스가 유도되었다. 배발생 캘러스를 빠른 방법으로 증식하기 위하여 2,4-D를 농도별로 처리하여 3주간 현탁배양한 결과는 표1과 같이 2,4-D 0.5mg /l에서 배발생캘러스 성장과 발생빈도가 가장 양호하였다.

### 2. 배지 종류와 배지농도가 배발생에 미치는 효과

배발생캘러스를 배지별로 처리하여 3주간 현탁배양한 결과는 표2처럼 MS배지가 체세포배형성과 생육에 가장 효과적이었고 LS배지에서도 체세포배발생이 양호하였으나 MS배지에 비하면 효율이 약간 떨어졌다. B5와 White배지는 체세포배 형성에 적합하지 않았다. Evans등(1981)은 농작물에서 체세포배 발생을 시키는데 약 70%의 경우는 MS배지, 또는 MS 개량배지를 쓰는 수가 많다고 하였다.

배발생캘러스를 MS배지 농도별로 처리하여 3주간 현탁배양한 결과는 표3에서 처럼 MS기본배지의 농도를 반으로 줄인 1/2X MS배지가 배형성과 생육에 더 효과적이었으며 2X MS, 1/4X MS에서는 배형성이 억제되는 경향이였다. 1/8X MS배지에서는 심장형배 이상으로 발육이 되지않았다. Litz와 Conover(1983)는 *carica*를 현탁배양 할 때 MS배지에서 캘러스 유도 및 증식을 시킨 후 1/2X MS배지로 옮겨 체세포배를 형성시키는 것이 효율적이라고한 반면 *Triticum aestivum* L.의 체세포배 발생에서는 MS배지의 무기염류 농도를 2배로 하였을때 더 효과적이라고 하였다(John 등, 1988).

### 3. 탄산원과 질소원이 배발생에 미치는 효과

탄소원이 체세포배발생에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1/2X MS배지에 탄소원 종류별로 처리한 결과 표4와 같이 sucrose가 가장 효과적이었으며 glucose처리는 sucrose처리 보다 효과가 약간 떨어졌다. Galactose와 maltose에서도 체세포배형성이 이루어졌지만 형성율이 적었으며, fructose 처리에서는 구형배 이상 발달하지 못하였다. Levi와 Sink(1990)는 fructose, glucose, man-

nose, sucrose 등을 첨가하여 아스파라거스의 체세포배 형성을 조사한 결과 sucrose와 glucose가 가장 좋은 결과를 보였다고 하였다.

1/2X MS 배지에 sucrose와 sugar의 농도별 처리에서는 표5에서 보는 것과 같이 sucrose보다 sugar(삼양사)가 체세포배 발생에 효과적이었으며 1% 처리가 가장 양호하였다. 농도가 높아짐에 따라 체세포배 형성이 억제되었다. 체세포배의 발달 형태도 그림1과 같이 sucrose 1% 처리에서 성숙한 체세포배의 크기와 수가 가장 양호하였으며, 농도가 3, 5%로 높아갈수록 배발달(체세포배의 크기와 수)이 억제되었다. 7%와 9%처리에서는 배발달이 이루어지지 않았고 세포덩어리만 형성되었다. 에너지의 급원이나 삼투압의 조절을 목적으로 배지에 첨가하는 sucrose는 첨가농도에 따라 체세포배 형성 양상에 영향을 미치며 sucrose 농도는 일반적으로 3-6%가 적당하고, 6% 이상의 높은 농도에서는 체세포배 발생도 잘 안되며 비정상적인 배의 발생

이 많다고 하였다(김등 1987 : Ammirato, 1977).

질소원이 체세포배 발생에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1/2X MS배지에 KNO<sub>3</sub>와 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>의 처리량을 달리한 결과 표6과 같이 KNO<sub>3</sub>와 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 단독처리에서는 배형성이 억제되었으며, KNO<sub>3</sub>양을 고정하거나 2배로 처리한 다음 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 양을 줄여 나갈수록 배발생이 효과적이었다. KNO<sub>3</sub> 825mg /l와 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 238mg /l 처리가 배발생에 가장 효과적이었다. NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>양을 고정하거나 2배로 처리한 다음 KNO<sub>3</sub>양을 줄여 나갈수록 배발생은 억제되었다. 천궁의 체세포배발생에는 암모늄태 질소보다 질산태 질소가 더 효과적이라 생각된다. Halperin(1966)은 당근의 체세포배 발생에 질산태와 암모늄태 질소의 비율이 중요한 영향을 미쳐 질산태 보다 암모늄태의 비율이 높은 배지에서 캘러스들이 배발생 능력을 가지며, 질산태만으로 키운 캘러스는 체세포배를 형성하지 않는 것으로 보아 체세포배의 유기에는 암모늄태가 필요하고 이렇게

Table 4. Effect of carbon source on somatic embryos formation and development in suspension culture of *Ligusticum chuanxaong* after 3 weeks.

Carbon source	Stages of somatic embryo development				Total F.W. of embryos(g±SE)
	Globular	Heart	Torpedo	Cotyledon	
Fructose	11±5	—	—	—	
Galactose	31±9	13±4	9±3	4±1	0.3±0.1
Glucose	38±8	20±6	15±4	17±3	1.6±0.5
Maltose	26±5	15±4	7±2	3±1	0.3±0.1
Sucrose	43±14	21±11	17±5	19±7	1.7±0.3

Table 5. Effect of sucrose and sugar concentration on somatic embryos formation and development in suspension culture of *Ligusticum chuanxiang* after 3 weeks.

Concentration(%)		Stages of somatic embryo development				Total F.W. of embryos(g±SE)
		Globular	Heart	Torpedo	Cotyledon	
Sucrose	1	39±11	17±4	19±7	21±5	1.9±0.5
	3	43±14	21±11	17±5	19±7	1.7±0.3
	5	24±8	11±5	7±2	4±1	0.5±0.1
	7	16±6	5±1	—	—	0.1±0.0
	9	—	—	—	—	0.1±0.0
Sugar	1	35±13	19±7	15±4	23±9	2.0±0.4
	3	41±12	23±15	19±6	20±5	1.8±0.5
	5	29±7	13±6	9±3	5±1	0.5±0.2
	7	22±4	6±2	—	—	0.1±0.0
	9	—	—	—	—	0.1±0.0

Table 6. Effect of  $KNO_3$  and  $NH_4NO_3$  on somatic embryos formation and development in suspension culture of *Ligusticum chuangxion* after 3 weeks.

KNO <sub>3</sub> : NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (mg/l)	Stages of somatic embryo development				Total F.W. of embryos(g ± SE)
	Globular	Heart	Torpedo	Cotyledon	
825 : 950	43 ± 14	21 ± 11	17 ± 5	19 ± 7	1.7 ± 0.3
825 : 475	48 ± 7	23 ± 7	17 ± 6	21 ± 9	1.8 ± 0.4
825 : 238	39 ± 9	17 ± 5	19 ± 6	25 ± 8	2.2 ± 0.5
825 : 0	41 ± 11	18 ± 4	14 ± 4	13 ± 3	1.1 ± 0.3
413 : 950	37 ± 9	15 ± 5	18 ± 4	17 ± 5	1.5 ± 0.4
206 : 950	32 ± 6	14 ± 5	13 ± 5	11 ± 3	0.9 ± 0.3
0 : 950	28 ± 7	12 ± 4	16 ± 2	9 ± 3	0.6 ± 0.2
1650 : 1900	38 ± 9	18 ± 7	15 ± 8	17 ± 5	1.5 ± 0.5
1650 : 950	35 ± 5	16 ± 3	17 ± 7	16 ± 4	1.4 ± 0.4
1650 : 475	41 ± 12	22 ± 9	16 ± 5	18 ± 7	1.6 ± 0.3
1650 : 238	45 ± 9	24 ± 7	18 ± 8	23 ± 6	2.1 ± 0.6
1650 : 0	36 ± 9	16 ± 3	14 ± 7	15 ± 7	1.2 ± 0.3
825 : 1900	37 ± 11	15 ± 7	16 ± 5	17 ± 4	1.4 ± 0.4
413 : 1900	33 ± 9	15 ± 5	14 ± 6	15 ± 5	1.2 ± 0.2
206 : 1900	28 ± 8	14 ± 6	12 ± 5	11 ± 5	0.8 ± 0.3
0 : 1900	25 ± 9	15 ± 7	13 ± 7	10 ± 3	0.8 ± 0.2

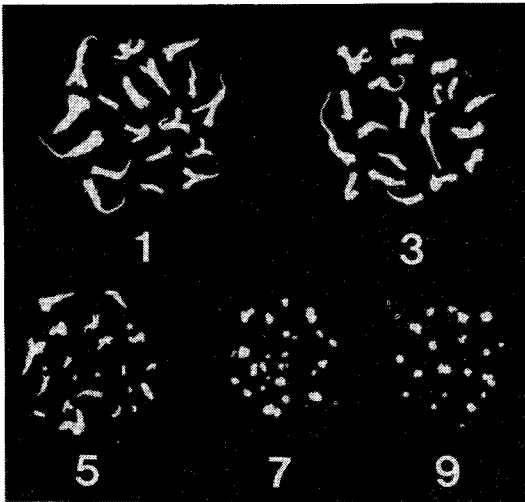


Fig. 1. The effects of sucrose concentration(1, 3, 5, 7, 9%) on somatic embryos formation and development in suspension culture of *Ligusticum chuangxiang*.

유기된 체세포배를 성숙시키는 데는 상대적으로 더 많은 양의 질산태를 필요로 한다고 하였다. Wetherell와 Dougall(1976)도 이와같은 결과를 보

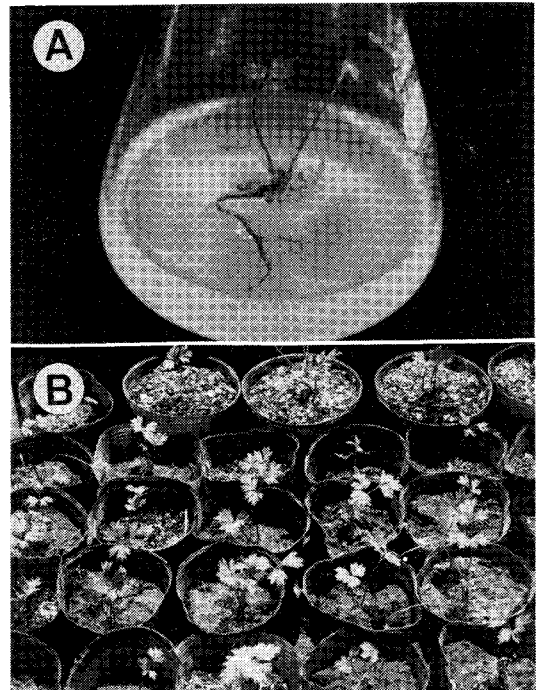


Fig. 2. Plant regeneration of *Ligusticum chuangxiang*.  
A) Regenerated plant.  
B) Transplanted on pot.

고하였다.

### 3. 식물체 재생과 순화

현탁배양에서 형성된 체세포배를 식물생장조절제를 첨가하지 않은 MS 기본배지에 치상하여 4주간 배양 후 분화 식물체(그림2-A)를 얻을 수 있었으며 순화 과정을 거치지 않고 직접 머브큐라이트로 이식하여 온실에서 재배하여도 60~70%의 토양활착율을 보였다(그림2-B). 천궁은 다른 작물에 비교하여 비교적 토양활착율이 높은 것으로 생각되었다.

## 摘 要

1. 2,4-D 0.5mg/l에서 배발생캘러스 성장과 발생 빈도가 가장 양호하였다.
2. 배지 중에서 MS배지가 체세포배 형성과 생육에 좋았으며, 1X MS배지 보다 1/2X MS배지가 배형성에 더 효과적이었다.
3. 탄소원으로는 sucrose가 효과적이었다. 농도는 1% 처리가 가장 양호하였으며 농도가 높아짐에 따라 체세포배 형성이 억제되었다.
4. Sucrose 대신 sugar 처리에서도 체세포배 형성이 양호하였다.
5. 질소원으로는 KNO<sub>3</sub> 825mg/l와 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 238mg/l 처리가 배발생에 가장 효과적이었다.

## 引用 文 獻

1. Ammirato, P.V.1977. Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway. *Plant Physiol.* 59 : 579-586
2. Ammiroto, P.V. Fc Steward 1971. Some effects of the environment on the development of embryos from cultured free cells *Bot. Gaz.* 132 : 149-158
3. 채영암, 박상언 1993. 천궁에서 캘러스 유도과 식물체재생. *한국육종 학회지* 25(3) : 230-234.
4. Evans, D.A, WR, Sharp, Flick CE 1981.

Growth and behavior of cell cultures : Embryogenesis and organogenesis. In : *Plant Tissue Culture : Methods and Applications in Agriculture*(TA Trope, ed.) pp.45-113. Academic Press, New York.

5. Halper in W 1966. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. *Am.J.Bot.* 53 : 443-453
6. John, G.C. EJ, Nancy, William FC 1988. Induction of embryogenic *Triticum aestivum* L. calli. I. Quantification of genotype and culture medium effects. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 12 : 83-95
7. Kim, Y.H. TY Chang, WY choi 1987. Effects of sucrose and ABA on somatic embryogenesis in celery(*Apium graveolens* L.), *Korean J. Plant Tissue Culture* 14 : 123-130
8. Kochba J, Button J 1974. The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the Shamouti orange(*Citrus sinensis*) as affected by tissue age and surose concentration. *Z Pflanzenphysiol* 73 : 415-421
9. Kochba J, Spiegel-Roy P, Neumann H, Saad S 1978. Stimulation of embryogenesis in *Citrus* ovular callus by ABA, ethephon, CCC and alar and its suppression by GA. *Z Pflanzenphysiol* 89 : 427-432
- 10.李世君, 范林편저 1988. 중국약용식물재배학. pp 395-401.
11. Levi A and Sink KC 1990. Differential effects of sucrose, glucose and fructose during somatic embryogenesis in asparagus. *Plant Physiol.* 137 : 184-189
12. Litz RE and Conover RA 1983. High frequency somatic embryogenesis from *carica* suspension cultures. *Ann. Bot.* 51 : 683-686.
13. Murashige T, Skoog F 1962. A revised me

- dium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15 : 473-497
14. Verma DC, Dougall DK 1977. Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. *Plant Physiol* 59 : 81-85
15. Wetherell DF & Dougall DK 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiol. Plant.* 37 : 97-103