

용담 (*Gentiana scabra* var. *buergeri*)의 잎 절편 배양에서 체세포배발생에 의한 식물체 재분화

방재욱* · 이미경 · 정성현
충남대학교 자연과학대학 생물학과

Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Leaf Explant Cultures of *Gentiana scabra* var. *buergeri*

Jae-Wook BANG*, Mi-Kyung LEE, and Sung-Hyun CHUNG

Department of Biology, College of Natural Sciences
Chungnam National University, Taejon 305-764. *Corresponding author.

Plant regeneration system via somatic embryogenesis in leaf explant cultures of *Gentiana scabra* var. *buergeri* has been established. Leaf segments formed calli when cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/L 2,4-D and 2 mg/L BAP. After transferred to SH medium supplemented with 0.5 mg/L 2,4-D, 2 mg/L P-CPA and 0.5 mg/L kinetin, the callus became embryogenic. The embryogenic callus was subcultured every 3 to 4 weeks. Upon transfer onto SH basal medium, the embryogenic callus gave rise to numerous somatic embryos, which subsequently developed into plantlets. The regenerated plants were potted in an artificial soil with mixture (peatmoss : perlite : vermiculite = 2 : 1 : 1) and transplanted to the soil after kept under a high humidity for two weeks. A total of 78 plants out of 105 regenerated plants survived in the soil. Phenotypic variations in height, number of stems and the flowering time were observed in the regenerated plants. Cytogenetical analyses showed no chromosomal variation.

Key words: artificial soil, cytogenetical analyses, P-CPA, phenotypic variations

용담 (*Gentiana scabra* var. *buergeri*)은 용담과 (Gentianaceae)에 속하는 다년생 초본(Fig. 1A)으로 뿌리에 건위 효능이 있는 생약 성분인 gentiopicoside를 함유하고 있어 한방에서 식욕 부진이나 소화불량에 대한 내복약으로 처방되어 왔다. 용담은 gentiopicoside 특유의 맛과 향기 때문에, 최근 한방 음료의 원료로 이용되고 있어 수요가 증가하고 있으나, 공급의 거의 전량을 야생 용담의 뿌리를 채취하여 충당하고 있으므로 식물 자원이 고갈되고 있는 실정이다. 더우기 용담은 재배 초기에 생육이 부진하고, 잡초와의 경합이 약하여 경작이 어렵기 때문에, 조직 배양을 이용한 대량 증식과 함께 시설 재배를 통한 연중 생산 체계의 확립이 요구되고 있다. 그러나, 용담에서 배발생 캘러스를 통한 식물체의 재분화와 이를 이용한 균일 식물체의 대량 증식 체계는 연구된 바 없다.

용담의 조직 배양에 관한 연구로는 엽육 및 경편의 기내 배양을 통한 슈트의 증식과 BA와 2,4-D의 농도에 따른 체

세포 영양계의 변이 조사(Seong et al., 1993)와 GA₃와 BAP를 첨가한 MS 배지에서 액아의 배양을 통한 슈트의 증식(Yamada et al., 1991) 등이 있다. 절화용으로 이용되고 있는 큰용담 (*Gentiana axillariflora* var. *coreana*)을 대상으로 잎, 뿌리, 절간의 기내 증식에서 성장 조절제와 MES의 영

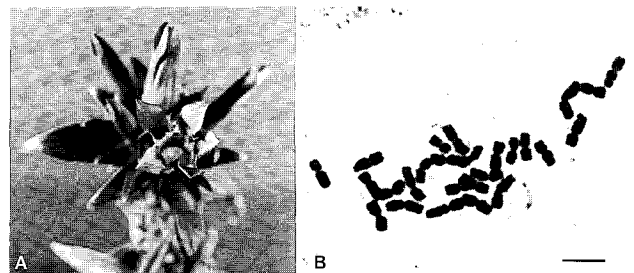


Figure 1. Plant of *Gentiana scabra* var. *buergeri* (A) and somatic metaphase chromosome complement (B). Bar, 5 μ m.

향(Cho et al., 1992)과 *Gentiana kurroo*에서 줄기 마디의 배양을 통한 증식 체계(Sharma et al., 1993)가 보고된 바 있다. 본 연구는 야생 용담을 대상으로 잎 절편 배양을 통해 유도된 배발생 캘러스로부터 식물체의 재분화 체계를 확립하여 대량증식 체계의 기반을 마련하고자 수행되었다.

재료 및 방법

염색체 분석

용담(*Gentiana scabra* var. *buergeri*)의 체세포 염색체 관찰을 위해 근단을 채취하여 1-bromonaphthalene 포화수용액에 담가 5-6시간 처리 후 1:3 용액(acetic alcohol)에 고정하였다. 고정된 근단은 1N HCl (60°C)에서 5-6분간 연화시킨 후, Feulgen 용액에 담가 염색하여 압착법으로 프레파라트를 제작하여 염색체를 관찰하였다.

잎 절편 배양을 통한 배발생 캘러스의 유도

야생 용담의 잎을 95% 에탄올에서 1분, 1% 차아염소산 나트륨 용액에서 10분간 표면 살균 후, 멸균 증류수로 5회 수세하였다. 멸균된 잎 조직을 5 × 5 mm 크기로 잘라 20 mL의 MS 배지(Murashige and Skoog, 1962)가 담긴 지름 9 cm의 멸균 페트리 접시당 20개씩의 절편을 치상하여 배양하였다. 이 때, 캘러스의 유도와 증식은 가능하였으나, 배발생 캘러스는 얻을 수 없었기 때문에 MS 배지와 SH 배지(Schenk and Hilderbrandt, 1972)를 혼용하고, 성장조절제의 조합을 달리하여 배발생 캘러스의 분화를 시도하였다. 잎 절편 조직으로부터 캘러스의 유도는 2,4-D 0.5 mg/L와 BAP 2 mg/L가 첨가된 MS 배지에서, 배발생 캘러스는 P-CPA 2 mg/L, 2,4-D 0.5 mg/L 및 kinetin 0.1 mg/L이 첨가된 SH 배지에서 유도하였다. 배지에는 탄소원으로 30 g/L의 sucrose를 첨가하였고, pH는 5.8로 조정하였으며, 지지물질로는 3 g/L의 gelite를 첨가하였다. 배양은 25°C의 항온기에서 암상태로 수행하였으며, 3-4주 간격으로 계대 배양하였다.

조직학적 관찰

배발생 캘러스의 조직학적 관찰을 위해 SH 배지에서 왕성하게 증식하는 배발생 캘러스를 FAA에 고정하고, *n*-butyl alcohol에서 탈수한 후, paraplant에 매몰시켰다. 회전식 마이크로톰을 이용하여 10 μm의 박편으로 만든 후 Hematoxylin, Safranin, Light green으로 염색한 다음 영구프레파라트를 제작하여 조직을 관찰하였다.

배발생 캘러스로부터 식물체의 재분화와 순화

배발생 캘러스로부터 슈트의 발생과 증식 및 뿌리의 유도를 위하여 성장 조절제가 첨가되지 않은 SH 기본 배지로 배발생 캘러스를 이식하여 명배양하였다. 배양은 명기와 암기가 16시간/8시간, 광도가 4,000 lux로 조절된 배양실(25°C)에서 수행하였다. 슈트와 뿌리가 균형있게 발달한 재분화 식물체는 피트모스, 펠라이트, 버미큘라이트가 2:1:1의 비율로 혼합된 인공 토양에 옮겨 2주간 순화시킨 후 토양 활착을 수행하였다. 토양에 완전히 활착된 재분화 개체에서 표현형의 조사와 함께 염색체를 관찰하였다.

결과 및 고찰

염색체 분석

용담의 근단에서 체세포 염색체는 $2n=26$ 으로 관찰되었다(Fig. 1B). 염색체의 조성은 3쌍의 차중부 염색체와 이보다 길이가 짧은 10쌍의 중부 염색체로 구분되었으며, 수적 변이나 다형현상은 관찰되지 않았다.

배발생 캘러스의 유도

용담의 잎, 뿌리 및 줄기 절편을 다양한 조합의 성장 조절제가 첨가된 MS 배지에서 배양한 경우 캘러스의 유도와 증식은 가능하였으나, 배발생 캘러스의 유도나 캘러스로부터 식물체의 재분화는 가능하지 않았다. 또한 잎 조직이나 뿌리 조직의 배양시 증식된 캘러스로부터 뿌리가 발생하는 경우가 관찰되기는 하였으나, 캘러스에서 발생한 뿌리는 사이토키닌 함량을 달리 조합한 배지에 이식하여 슈트의 발생을 시도하였음에도 불구하고, 슈트의 분화는 관찰할 수 없었다. 이러한 현상은 큰용담의 뿌리 절편 배양(Cho et al., 1992)과 수영의 자엽과 하배축의 배양(Culrafic et al., 1987) 등에서도 보고된 바가 있다.

이와 같은 MS 배지에서의 배양 결과를 고려하여 배발생 캘러스의 유도에 적합한 배지와 성장 조절제 조합을 탐색

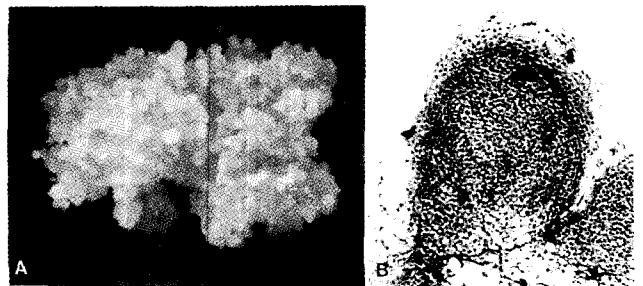


Figure 2. Embryogenic callus on SH medium supplemented with 0.5 mg/L 2, 4-D, 2 mg/L P-CPA and 0.5 mg/L kinetin (A) and section of embryogenic callus (B).

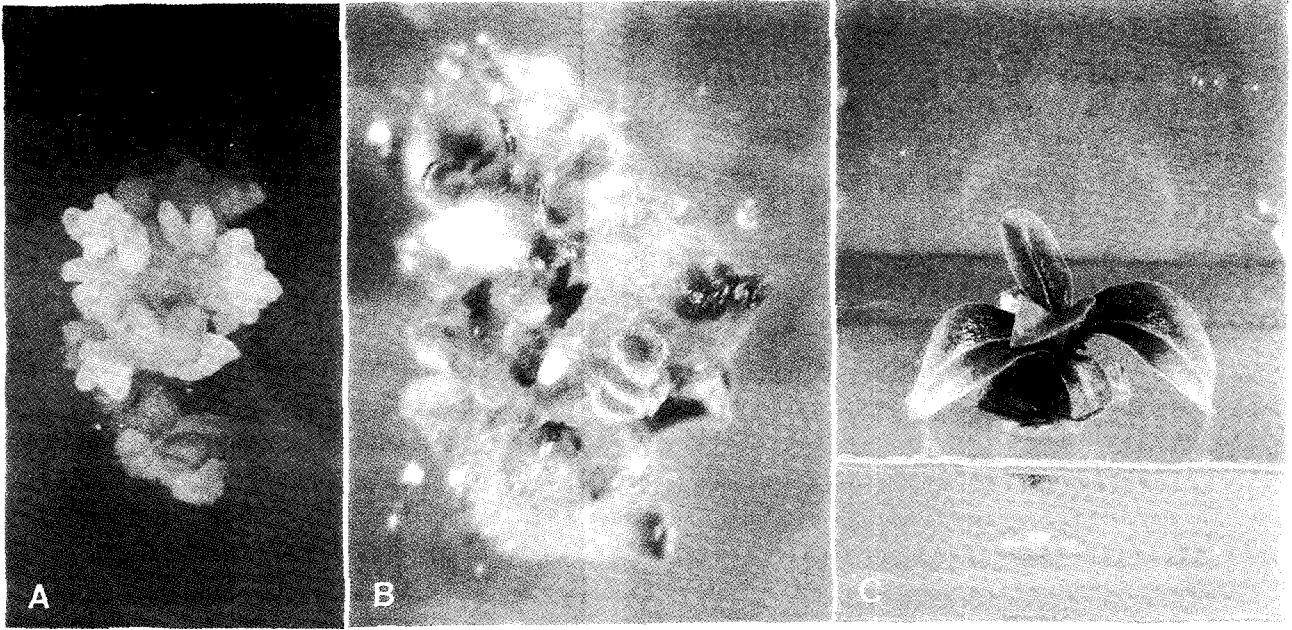


Figure 3. Development and growth of shoots from embryogenic callus on SH basal medium. A, embryogenic callus forming somatic embryos; B, plantlets converted from somatic embryos; C, a regenerant with well-developed leaves.

한 결과 캘러스의 유도시에는 2,4-D 0.5 mg/L, BAP 2 mg/L가 첨가된 MS 배지에서 2주간 암배양하고, 이 캘러스를 P-CPA 2 mg/L, 2,4-D 0.5 mg/L 및 kinetin 0.1 mg/L이 첨가된 SH 배지에 이식하여 암배양한 결과 2주 후부터 캘러스의 증식과 함께 분리가 잘 되는 특징을 지닌 배발생 캘러스를 얻을 수 있었으며(Fig. 2A), 배발생 캘러스의 형성율은 조사된 546개 캘러스 중 396개로 72.5%였다. 배의 발생은 조직학적 분석을 통해 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 배발생 캘러스의 증식과 유지는 SH 배지에서 3-4주 간격으로 계대 배양함으로써 가능하였다.

배발생 캘러스로부터 식물체의 재분화와 순화

배발생 캘러스의 증식과 유지에는 P-CPA 2 mg/L, 2,4-D 0.5 mg/L 및 kinetin 0.1 mg/L이 첨가된 SH 배지에서 효과적인 계대 배양이 가능하였으나, 슈트로의 분화는 진행되지 않았다. 슈트의 발생을 위해 증식이 왕성한 배발생 캘러스를 성장 조절제가 첨가되지 않은 기본 배지에 이식하여 암배양한 결과 1주가 경과하면서 캘러스의 표면 전체에 슈트가 발생되었다(Fig. 3A). 발생한 슈트는 16시간의 광조건 하에서 빠른 성장을 보였으며(Fig. 3B), 슈트를 분리하여 이식한지 2주 후에는 잎의 형태를 완전히 갖춘 슈트로 발달하였다(Fig. 3C). 슈트의 성장 후 약 2주가 경과하면서 슈트로부터 뿌리가 발생되어 인공토양에 이식이 가능한 재분화 식물체를 얻을 수 있었다. 뿌리의 발생은 배발생 캘러스를 SH 기본 배지로 이식 후 슈트가 성장한 다음 발생하는 경우가 일반적이었으나, 슈트의 성장보다 뿌리의 생장이 더

빠른 경우도 관찰되었다. 슈트보다 뿌리의 생장이 빠른 재분화 식물체는 인공 토양에서 순화시 거의 고사하였다.

재분화 식물체는 인공 토양에서 약 2주 적응시킨 후 사질양토에 이식할 경우 완전한 활착이 가능하였다. 재분화 식물체의 순화시에는 버미큘라이트가 주로 이용되나, 용담의 순화시에는 부적합하였으며, 피트모스, 펄라이트, 버미큘라이트가 2:1:1의 비율로 혼합된 인공 토양에서 순화 과정을 수행하는 것이 가장 효과적인 것으로 나타났다. 토양으로의 완전한 활착에는 2주 정도가 소요되었다.

용담의 염육 절편과 줄기 절편 배양시 MS 배지를 이용한 경우 슈트의 형성율이 각각 8%와 24%로 낮게 나타나는 것으로 보고되었으며(Seong et al., 1993), GA₃와 BAP를 첨가한 MS 배지에 액아를 배양하여 액아당 평균 18.5개의 슈트를 발생시킨 결과도 있으나(Yamada et al., 1991), 본 연구에서와 같이 MS 배지와 SH 배지를 혼용하여 배발생 캘러스를 유도하여 식물체를 재분화시킬 경우 기내 대량 증식은 더욱 효율적으로 이루어질 수 있을 것이다. 본 연구에서 확립한 재분화 체계에서는 잎 절편으로부터 배발생 캘러스의 유도 및 증식에 약 4주, 슈트의 유도와 뿌리의 발생에 5주, 재분화 식물체의 대량 생산에 직접 이용될 수 있으며, 특히 본 실험에서 유도한 배발생 캘러스를 이용하여 식물체를 재분화시킬 경우 부정 슈트의 발생을 이용하는 것보다 더 많은 체세포클론을 얻을 수 있을 것으로 예상하고 있다.

토양에 완전히 활착되는 재분화 식물체의 적응율은 토양 활착은 시도한 105개체 중 78개체가 생존하여 평균 75%로 나타났다. 토양에 적응하지 못하고 고사한 재분화 식물체는 슈트와 뿌리가 정상적인 발달에 미치지 못하는 재분화체들

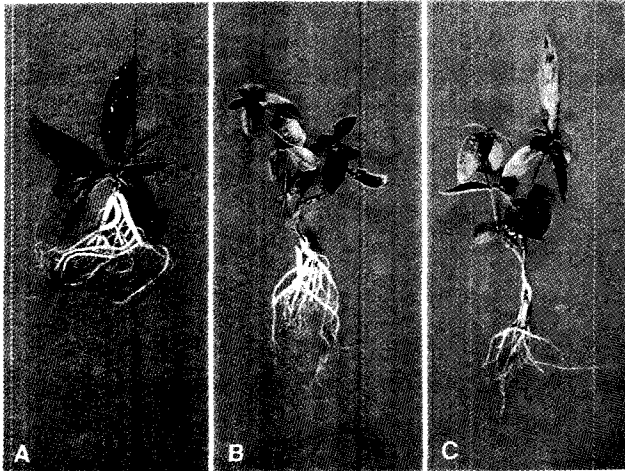


Figure 4. Phenotypic variation in regenerated plants.

인 것으로 미루어 보아 토양 활착율의 증진을 위해서는 슈트와 뿌리가 균형있게 발달한 재분화 식물체를 대량으로 육성할 수 있는 체계의 확립이 요구된다. 기내에서 표현형적인 변이를 나타낸 재분화 식물체에서는 토양에 이식하여 재배한 결과 키, 줄기의 모양이나 수 및 개화기 등에서의 변이가 유지되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4)

용담의 재분화 식물체의 염색체를 관찰한 결과 $2n=26$ 으로 배양에 적합한 모식물체에서와 동일하게 나타났다(Fig. 5). 이와 같이 재분화 식물체에서 염색체 수의 변이가 나타나지 않는 것은 본 재분화 체계가 비교적 안정하다는 간접적인 증거이며, 용담의 경우 재분화 식물체에서 표현형적인 변이에도 불구하고, 염색체의 수는 모식물체와 동일하게 나타나는 것으로 보아 본 연구에서 적용된 재분화 과정은 균일한 재분화 식물체를 얻는 안정된 체계라고 사료된다(Ezura et al., 1993). 표현형적인 변이를 보이는 개체는 유용한 체세포 클론의 선발을 위해 유전적 분석을 진행 중에 있다.

적 요

용담의 잎 절편 배양을 통하여 유도된 배발생 캘러스로부터 식물체의 재분화 체계를 확립하였다. 캘러스는 0.5 mg/L 2,4-D, 2 mg/L BAP가 첨가된 MS 배지에서 유도되었으며, 이 캘러스를 2 mg/L P-CPA, 0.5 mg/L 2,4-D 및 0.5 mg/L kinetin이 첨가된 SH 배지에 옮겨주었을 때 배발생 캘러스의 유도가 가능하였다. 배발생 캘러스는 SH 기본 배지에 옮겨 슈트의 증식 및 뿌리 발생을 유도하였다. 재분화 식물체는 피트모스, 펄라이트, 버미큘라이트가 2:1:1의 비율로 혼합된 인공 토양에서 순화시킨 후 토양에 활착시켰다. 토양에 활착된 재분화 식물체는 키, 줄기의 모양과 수, 개화기 등에서 표현형적 변이를 나타냈다. 세포유전적 분석에서 모

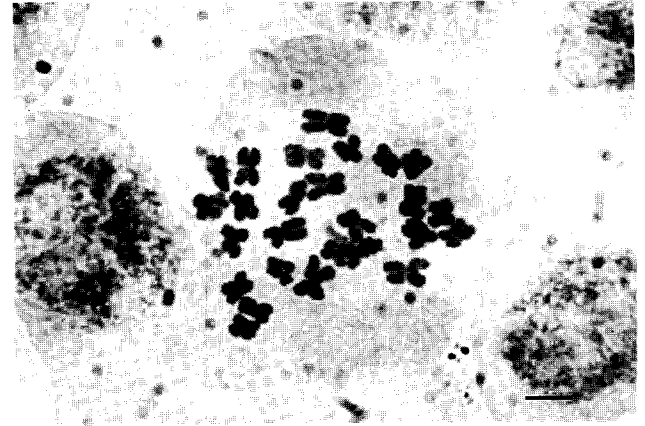


Figure 5. Metaphase chromosome complement observed in the regenerated plant. Bar, 5µm.

식물체와 재분화 식물체의 염색체는 $2n=26$ 으로 안정성을 보였는데, 이는 본 연구에서 적용된 재분화 체계가 안정하다는 것을 시사한다.

사 사

본 연구는 1992-1993년 과학기술처 선도기술개발사업연구비의 지원에 의하여 수행되었음.

인 용 문 헌

- Cho MS, Chang JJ, Kwon ST (1992) Effects of culture conditions on micropropagation of *Gentiana axillariflora* var. *coreana*. Korean J Plant Tissue Culture 19: 357-362
- Calafic L, Samofalova A, Neskovic M (1987) In Vitro organogenesis in two dioecious species, *Rumex acetosella* L. and *R. acetosa* L. (Polygonaceae). Plant Cell Tissue Organ Culture 11: 125-131
- Ezura H, Nishimiya S, Kasumi M (1993) Efficient regeneration of plants independent of exogenous growth regulators in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Reports 12: 676-680
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Schenk RU, Hilderbrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot 50: 199-204
- Seong NS, Park CH, Lee ST, Kim SM (1993) Plant regeneration and multiplication of *Gentiana scabra* Bunge through leaf and stem culture. Korean J Medicinal Crop Sci 1: 129-136.
- Sharma N, Chandel KPS, Anderson P (1993) In vitro propagation of *Gentiana kurroo* - an indigenous threatened plant of medicinal

importance. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 34: 307-309

Yamada Y, Shoyama Y, Nishioka I, Kohda H, Namera A, Okamoto T
(1991) Clonal micropropagation of *Gentiana scabra* var. *buergeri* Maxim
and examination of the homogeneity concerning the gentiopicroside

content. *Chem Pharm Bull* 39: 204-206

(1994년 9월 1일 접수)