

현삼의 액체배양에서 체세포배 형성에 대한 치상조직과 성장조절제의 영향

송지숙*·임완삼*·채영암**

Effects of Explants and Growth Regulators on Direct Somatic Embryogenesis in Liquid Culture of *Scrophularia buergeriana*

Ji Sook Song*, Wan Sang Lim* and Young Am Chae**

ABSTRACT : The factors affecting direct somatic embryogenesis from different parts of explant in liquid culture of *Scrophularia buergeriana* were investigated. Direct somatic embryogenesis was dependent on the explant tissues and stem was the most efficient explant. Rapid shoot development occurred on stem after 3-week culture but roots were not developed yet. Plantlets were not formed through somatic embryogenesis after 3-week culture of petiole. Though direct somatic embryo was not observed from leaf segment culture for 3 weeks, normal plantlets were developed after 8-week culture. BA played the main role for somatic embryogenesis in liquid culture and adding of either IAA or NAA caused rather adverse effects. Culture of stem segments in MS liquid medium with BA at 0.5 mg/l or 0.1 mg/l was proved to be the most efficient method for producing plantlets through direct somatic embryos.

Key words : *Scrophularia buergeriana*, direct somatic embryogenesis, liquid medium, plant growth regulators.

서 언

현삼은 현삼과에 속하는 다년생 초본으로 중요 약용작물 중의 하나이다. 현삼 괴근에 p-methoxycinnamic acid, harpagide, phytosterol 등이 함유되어 있어 소염, 인후염, 비염, 변비 등에 약효가 있는 것으로 알려지고 있다(육, 1990).

Sharp 등(1980)은 기내에서 체세포배 발생은 두 경로를 통하여 이루어진다고 하였다. 하나는 켈러

스 형성없이 조직으로부터 직접 배가 형성되는 직접 체세포배 발생으로 pre-embryogenic determined cells에서 유래하였으며, 다른 하나는 조직으로부터 켈러스가 형성된 후에 배가 발생하는 간접 체세포배 발생으로 non-embryogenic cells 또는 induced embryogenic determined cells에서 유래한다고 하였다.

체세포배 발생은 켈러스 형성 후 배가 발생하는 간접 체세포배 발생이 대부분이며, 직접 체세포배 발생에 관한 보고는 드문 편이다 (Conger et al.,

* 서울대학교 농학과 (Department of Agronomy, Seoul Nat'l Univ. Suwon 441 - 744, Korea)

** 서울대학교 농학과-농업생물신소재연구센터 (Research Center for New Biomaterials in Agriculture)

< '98. 9. 25 접수 >

1983; Decai et al., 1988; Mashewaran et al., 1986). 체세포배 발생은 높은 증식율과 키메라 식물체의 발생을 최소화하거나 제거할 수 있기 때문에 대량 증식 수단으로 중요하게 인식되고 있다 (Stefaniak, 1994).

최근 여러 작물에서 체세포배 발생에 관한 논문이 보고되고 있으며 (Ammirato, 1983), 더욱이 체세포배의 유도는 많은 개체를 확보할 수 있기 때문에, 특히 인공종자 개발에 효율적으로 이용할 수 있다고 하였다 (Redenbaugh et al., 1987). 그러나 지금까지 현삼에서 직접 체세포배 형성에 관한 보고는 Chae 등 (1993) 이 보고한 것 이외는 없다.

Chae 등 (1993)의 연구 결과 현삼에서도 조직배양을 통한 직접 체세포배 유래의 종묘 생산 가능성이 확인되었다. 그러나 고체 배지를 이용한 배양법은 배양을 위한 준비 과정이 번거롭고 공간적 확보가 요구되는 등 경제적인 면을 충족하기가 어렵다. 따라서 미생물 배양기와 같은 대량의 현탁배양이 가능한 생물반응기의 응용이 경제적인 측면은 물론이고 일정 시기에 원하는 정도의 묘를 생산해 낼 수 있는 방법이 될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 생물반응기를 이용하여 대량, 폐속번식 방법 개발의 전제 조건으로 액체배양에서 직접 체세포배 형성에 미치는 치상 조직과 식물 성장조절제의 상호 영향을 평가하여 직접 체세포배를 형성시키는 조건을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

현삼 종자를 0.25% sodium hypochlorite 용액에 15분간 표면 살균한 후 멸균수로 4~5회 세척하여 MS (Murashige & Skoog) 기본 배지 (3% sucrose, 0.8% agar)에서 발아시켰다. 발아한 유식물은 1개월마다 고체 MS 배지에서 무균적으로 증식시켜 실험 재료로 사용하였다.

2. 직접 체세포배 형성

액체배지에서 직접 체세포배 형성에 영향을 미치는 식물 성장조절제의 종류와 농도 그리고 적합한 치상 조직을 결정하기 위한 조건은 MS 기본 배

지를 사용하였다. 사용한 옥신류의 식물 성장조절제는 NAA와 IAA이었으며, 이들의 농도는 0, 0.1, 0.5 및 1.0 mg/l 이었다. 사이토키닌류는 BA를 사용하였고, 농도는 0, 1.0, 2.0 및 5.0 mg/l 로 하였다. 식물 성장조절제는 단독 처리 효과와 옥신류와 사이토키닌류와의 혼용 효과도 아울러 조사하였다.

액체배양은 25℃의 16시간 조명 하에서 100ml Erlenmeyer 플라스크에서 100 rpm 속도로 배양하였다. 치상 조직으로는 잎, 엽병 및 줄기 조직을 사용하였다. 잎은 1cm x 1cm 크기로 절단하였고 엽병과 줄기는 1cm 길이로 절단하여 배지에 치상하였다.

결과 및 고찰

줄기, 엽병 및 잎 조직을 액체배지에 치상하여 3주간 배양한 후의 체세포배 발생의 정도를 상대적으로 비교한 결과, 직접 체세포배 발생에서 옥신류의 단독 처리는 효과가 없었으나, 부정근 발생에는 효과적임을 확인할 수 있었다 (Table 1). 이는 차후 유식물체의 기내 발근 유도시 적절하게 활용될 수 있을 것이다.

같은 배지 조성이라고 하더라도 식물체의 부위에 따라 전혀 다른 양상을 보였는데, 줄기가 가장 빠른 반응을 보였으며 다음이 엽병이었다 (Table 1). 그러나 이 기간 내에서 잎은 전혀 반응을 보이지 않았다. 이와 비슷한 결과는 *Begonia gracilis*를 재료로 한 실험에서도 알려졌다 (Castillo, 1997).

3주 배양 후 줄기로부터 유도된 체세포배는 빠른 속도로 유식물체로 성장이 이루어진 반면, 이 기간 내에 뿌리의 발달은 진행되지 않았다. 처음 3주간 액체배양한 잎 조직으로부터는 체세포배가 발생되지 않았다.

액체배양에서 체세포배 형성에는 BA가 주된 영향을 미쳤다. BA에 IAA 첨가는 큰 효과가 없었으며, 더욱이 NAA는 오히려 그 효과를 감소시키는 경향을 보였다. 특히 NAA를 0.5 mg/l 의 비교적 높은 농도로 첨가한 경우 억제효과가 더욱 커짐을 알 수 있었다 (Table 1).

액체배양시 식물체의 부위별로 반응하는 양상이 다르기 때문에 생물반응기를 이용한 대량 생산을

Table 1. Effect of BA and IAA/NAA combination on direct somatic embryogenesis from leaf, petiole and stem segments of *S. buergeriana* in MS liquid medium after 3 weeks.

Growth regulators (mg/l)	Formation of somatic embryo			Root formation		
	Leaf	Petiole	Stem	Leaf	Petiole	Stem
BA 0	auxin 0	-	-	-	-	-
	IAA 0.1	-	-	++	-	+++
	IAA 0.5	-	+	++	-	+
	NAA 0.1	-	+	++	+	+++
	NAA 0.5	-	+	-	+	+++
BA 0.5	auxin 0	-	+++	+++	-	-
	IAA 0.1	-	+++	+++	-	-
	IAA 0.5	-	+++	+++	-	-
	NAA 0.1	-	++	+++	-	-
	NAA 0.5	-	+	+	-	+
BA 1.0	auxin 0	-	++	+++	-	-
	IAA 0.1	-	+++	+++	-	-
	IAA 0.5	-	+++	++	+	-
	NAA 0.1	-	+	+++	-	+
	NAA 0.5	-	+	++	-	+
BA 2.0	auxin 0	-	+	+++	-	-
	IAA 0.1	-	+	+++	-	-
	IAA 0.5	-	+	++	-	-
	NAA 0.1	-	++	+++	-	-
	NAA 0.5	-	+++	++	-	-

- : none, + : 1~3 somatic embryos or roots per inoculated explant, ++ : 4~6 somatic embryos or roots per inoculated explant, +++ : 7 < somatic embryos or roots per inoculated explant.

위해서는 식물체의 부위에 따른 생장조절제의 종류나 농도 등은 물론 배양 기간에 차이를 두어야 할 것으로 보인다. 본 실험 결과, 짧은 배양 시간 동안 많은 량의 유식물체를 얻을 수 있는 최적 조건은 BA를 0.5 mg/l 혹은 1.0 mg/l 로 첨가한 MS 액체배지에 줄기 부위를 치상조직으로 이용하는 것이 가장 효과적임을 알 수 있었다(Table 1).

Fig. 1은 줄기 조직의 액체배양 3주 후의 상태를 나타내는 것으로 고체배지에서 6주 정도 배양된 크기와 같은 상태로 발달하여, 고체배지에서 배양된 것보다 3주 정도의 배양 기간이 단축되었다. BA를 단독 처리한 경우 0.5 mg/l 에서 1.0 mg/l 나 2.0 mg/l 에서 보다 shoot의 성장이 좋고 많은 것으

로 보였다. 그러나 IAA를 0.1 mg/l 로 첨가한 경우는 BA 농도 0.5 mg/l 보다는 상대적으로 높은 1.0 mg/l 또는 2.0 mg/l 가 shoot 형성에 좋은 것으로 나타나, 같은 농도라고 하여도 NAA는 IAA보다 효과가 크지 않은 것으로 보였다.

특히 BA 1.0 mg/l 와 IAA 0.1 mg/l 의 조합 처리구에서는 20개 이상의 shoot가 형성되었으며, 균일한 성장 속도를 보여 액체배양을 통한 대량의 유식물체의 획득 방법으로 가장 효과적인 식물 생장조절제 처리구인 동시에 가장 적절한 치상조직인 것으로 나타났다. IAA 및 NAA가 단독으로 처리된 경우는 체세포배의 형성이 진행되지 않고 발근이 유도되었으며, IAA 보다는 NAA 단독 처리구에

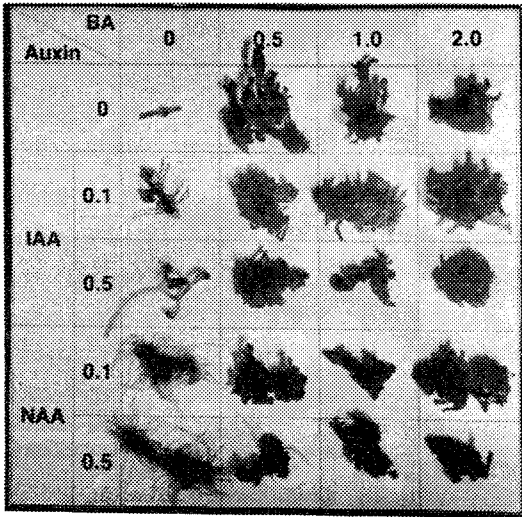


Fig. 1. Effect of BA and IAA/NAA combination on direct somatic embryogenesis from stem segment of *S. buergeriana* in liquid media after 3-week culture.

서 부정근의 발생이 월등히 많았다.

엽병 부위를 접종 재료로 사용하였을 때는 줄기 조직에 비해 3주간의 배양으로는 직접 체세포배를 통한 완전한 식물체의 발생을 볼 수 없었다. 접종 절편체는 전체적으로 치밀한 형태로서 체세포배 형성이 진행되는 과도기의 것 과 이미 형성된 것이 함께 존재하는 형상을 나타내었으며, 배양 5주 후가 되어서부터 BA 단독 처리구와 BA와 IAA 및 NAA와의 조합 처리구에서 완전한 식물체의 발현이 시작되었으나 줄기를 이용하였을 때 보다 약 2주 정도의 배양기간이 더 소요되었다. 그러나, IAA와 NAA의 단독 처리구에서는 부정근이 발생하였으며, 심지어 NAA 0.5 mg/l 단독 처리구에서는 배양기간이 4주 이상 진행될수록 캘러스의 생성이 진행되었다(그림 제시 않음).

잎 부위를 접종 재료로 사용하였을 때는 엽병과 마찬가지로 3주간의 배양으로는 직접 체세포배를 육안을 통해 구분하는 것이 불가능하였다. 접종 절편체의 절단면 부위는 치밀한 형태로 체세포배 형성이 진행되는 과도기의 형상을 나타내었다. 그러나 8주간 배양을 지속한 결과 BA 단독 처리구와 BA와 IAA 및 NAA의 조합 처리구에서도 그림 2와

같은 완전한 식물체 재분화가 이루어져, 줄기와 엽병보다 체세포배 형성에 상대적으로 많은 시간을 필요하여, 약 5주가량이 필요하였다. IAA와 NAA의 단독 처리구는 체세포배 발생은 진행되지 않았으며 뿌리 발생도 역시 엽병이나 줄기 부위에 비하여 미숙한 상태를 나타내었다(그림 제시 않음).

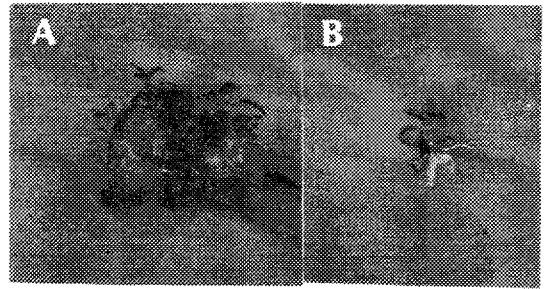


Fig. 2. Regenerated plant from leaf explant in liquid media after 8-week cultivation showing complete morphological development(A). Direct regeneration of leaf and root is visible from the initial explant (B).

이상의 결과를 종합하여 볼 때 현삼에서 직접 체세포배를 형성시키기 위해서는 줄기 조직을 BA 0.5 mg/l 를 첨가한 MS 배지에 치상하는 것이 경제적이고 효율성이 높다고 판단되었다.

적 요

생물반응기를 이용한 대량 번식 방법 개발의 기반을 마련하고자 현삼 조직의 액체배양에서 직접 체세포배 발생에 미치는 치상조직과 식물 생장조절제의 상호영향을 조사하였다.

식물체의 부위에 따라 전혀 다른 양상을 보였는데, 잎, 줄기 및 엽병조직을 치상한 후 체세포배 발생 정도를 살펴본 결과 줄기 절편을 배양하였을 때 체세포배 발생율이 가장 높았다. 또한, 유식물체로 발달되기까지 약 3주의 기간이 소요되어 빠른 속도로 성장이 이루어진 반면, 뿌리의 형성은 이루어지지 않았다. 엽병을 접종 재료로 하여 3주간 배

양하였을 때는 직접 체세포배를 통한 shoot는 형성은 되었으나 줄기 절편에 비해 체세포배 발생율은 낮았으며, 뿌리 발생도 이루어지지 못하였다. 잎 조직을 액체배지에 치상하였을 경우 체세포배발생에 소요되는 기간이 줄기와 엽병에 비해 상대적으로 길었으며, 배양 8주 후에는 완전한 식물체로 발달하였다. 액체배양에서 체세포배 형성에 영향하는 성장조절제로는 BA 효과가 컸으며, BA에 옥신류인 IAA와 NAA를 첨가함에 따라 탈분화가 진행되어 체세포배 발생을 감소시키는 경향을 보였다. 짧은 배양 시간 동안 많은 유식물체를 얻을 수 있는 최적의 조건은 BA 0.5 mg/l 나 1.0 mg/l 로 첨가시킨 MS 액체배지에 줄기 부위를 치상 조직으로 이용하는 것이 가장 효과적이었다.

LITERATURES CITED

- Ammirato, P. V. 1983. Embryogenesis. In Handbook of plant cell culture. (Evans, D. et al. eds.) Macmillan. pp 82-123.
- Castillo, B., 1997. Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracillis* explants. Plant Cell Report 16 : 385-388.
- Chae, Y.A., S.U. Park and H.H. Kim. 1993. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explant of *Scrophularia buergeriana*. Kor. J. Plant Tissue Culture. 20 : 125-128.
- Conger, B.V., G.E. Hanning, D.J. Gray, and J.K. Danile. 1983. Direct embryogenesis from mesophyll cells of orchard. Science 221 : 850-851.
- Decai, C., J.R. Mayers, G.B. Collins, and P.A. Lazzeri. 1988. In vitro regeneration. 1. Direct somatic emnryogenesis in *T. rubens*. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 15 : 33-45.
- Masheswaran, G. and E.G. Williams. 1986. Direct secondary somatic embryogenesis from immature sexual embryos of *T. rubens* in vitro. Ann. Bot. 57 : 107-117.
- Redenbaugh K., D. Slade, P. Viss, and J. A. Fujii. 1987. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. Hortscience 22 : 803-806.
- Sharp, W.R., M.R. Sondahl, L.S. Caldas, and S.B. Maraffa. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. Hort. Rev. 2 : 268-310.
- Stefaniak, B., 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration gladiolus. Plant Cell Report 13 : 386-389.
- 육창수. 1990. 원색한국약용식물도감. 아카데미서적. p 494.