藥作誌(Korean J. Medicinal Crop Sci.) 6(4) : 323 - 327 (1998)

배양 기간이 다른 캘러스로부터 재분화된 시호 (*Bupleurum falcatum* L.) 체세포클론의 사이코사포닌 함량 변이

김은경* · 이미경* · 방재욱*

Saikosaponin Contents in Somaclones Derived from Different Aged Calli of *Bupleurum falcatum* L.

Eun Kyung Kim, Mi Kyung Lee and Jae Wook Bang

ABSTRACT : The contents of saikosaponin a, c and d in the root of somaclones and wild plants of *B. falcatum* L. were determined. The saikosaponin contents of wild plants collected from Chongson-gun, Kangwon Province and Yongdok-gun, Kyongbuk Province were higher than those of the somaclones derived from 3-month and 2-year aged calli. The mean values of saikosaponin content in 2 year-old somaclones derived from the callus cultured three months were higher than those in 1 year-old somaclones from 2-year aged callus. Variation of saikosaponin content depending on the culture periods was not found. Four plants among 1-year old somaclones showed saikosaponin content twice as much as wild plants had. This result implies the possible use of somaclonal variation for crop improvement.

Key words : *Bupleurum falcatum*, saikosaponin, somaclone, callus.

서 언

시호 (*Bupleurum falcatum* L.)는 미나리과 (Umbelliferae)에 속하는 다년초로서 뿌리를 생약재로 이용하는 유용한 약용식물이다 (Tomita and Umori, 1976; Lee, 1980). 시호 뿌리에 함유된 성분은 사이코사포닌, 지방 및 sterol이며, 주성분은 사이코사포닌 a, c 및 d이고, 해열, 진통 및 항염의 약리 작용을 갖는다 (Lee et al., 1993a, 1993b; Kim et al., 1995).

시호를 대상으로 수행된 연구로는 재분화체의 사이코사포닌 함량 변이 (Hiraoka et al., 1986), 체세포 배발생에 관한 연구 (Lee et al., 1988), 생육 지역에 따른 사이코사포닌 함량 비교 (Mizukami et al., 1991), 야생 시호의 품종과 재배 기간에 따른 사이코사포닌 함량 비교 (Park et al., 1992)와 캘러스 배양 기간에 따른 부정근의 형성과 사이코사포닌 함량 비교 (Kim et al., 1995), 효율적인 사이코사포닌의 정량 분석 방법 (Kim et al., 1995) 등이 보고된 바 있다.

식물의 조직 배양 과정에서 나타나는 변이를 체세포클론 변이라고 하며, 생산량과 질병에 대한 저항성 증가 등과 같은 형질의 변이는 작물 개량에 적

* 충남대학교 (Department of Biology, College of Natural Sciences, Chungnam National Univ. Daejon 305-764, Korea) 〈 '98. 10. 12 접수 〉

용될 수 있는 것으로 보고 (Larkin and Scowcroft, 1981)된 바 있으나, 시호 배발생 캘러스의 배양 기간이 체세포클론의 사이코사포닌 함량 변이에 미치는 영향은 아직 연구된 바 없다.

본 연구는 배양 후 3개월 된 캘러스에서 재분화시킨 체세포클론과 배양 후 2년간 유지한 캘러스로부터 재분화시킨 체세포클론에서 사이코사포닌 a, c 및 d의 함량 변이를 분석하고, 사이코사포닌의 함량이 높게 나타나는 우량 변이주의 선발 가능성을 탐색해 보고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 식물 재료

정선시호 종자를 발아시켜 얻은 유식물체의 하배축을 2-3mm 크기로 잘라 4mg/L의 2, 4-D를 첨가한 MS배지에 치상하여 체세포배를 유도한 후, 2mg/L의 2, 4-D가 첨가된 MS배지에서 한달 간격으로 계대 배양하면서 체세포클론을 생산하였다. 재분화 식물은 광도는 점차적으로 높여주고, 습도는 낮추어 주는 순화 과정을 거쳐 토양에 이식하여 재배하면서 재료로 사용하였다.

본 실험에서는 3개월간 배양된 캘러스에서 재분화하여 2년간 재배한 체세포클론과 2년간 배양된 캘러스에서 재분화하여 1년간 재배한 체세포클론을 분석 재료로 이용하였다. 대조구의 야생 시호로는 조직배양에 이용한 강원도 정선시호, 지리적 차이의 비교를 위해서는 경상북도 영덕에서 채집한 영덕시호가 이용되었다.

2. 사이코사포닌 정량 분석

시호의 뿌리를 채취하여 수세 후, 50±5℃에서 24시간 건조하고 40 mesh로 마쇄한 다음 0.03-1 g을 취하여 분석 재료로 사용하였다. 사이코사포닌 성분의 추출을 위하여 75±3℃에서 30 ml의 80% MeOH 용액으로 1시간씩 3회에 걸쳐 가온 환류 후, 추출액을 총 100 ml로 적정하였다. 성분 분석을 위해 상온에서 0.5-2% 염산으로 산처리한 다음, 그 중 10 μl를 취하여 분석에 사용하였다. 분석 조건으로 column은 -Novapak C18 (3.9×150 mm)을 이용하였고, 이동상은 MeOH와 H_2O (80:20, v/v)로 하였으며, 유속은 0.9 ml/min으로 하여 고속 액체 크로마토그래피를 수행하였다. 사이코사포닌의 검출은 254 nm 자외선 하에서 수행하였고, 각 peak 성분의 함량은 표준품의 사이코사포닌 검량선으로부터 구하였다 (Fig. 1).

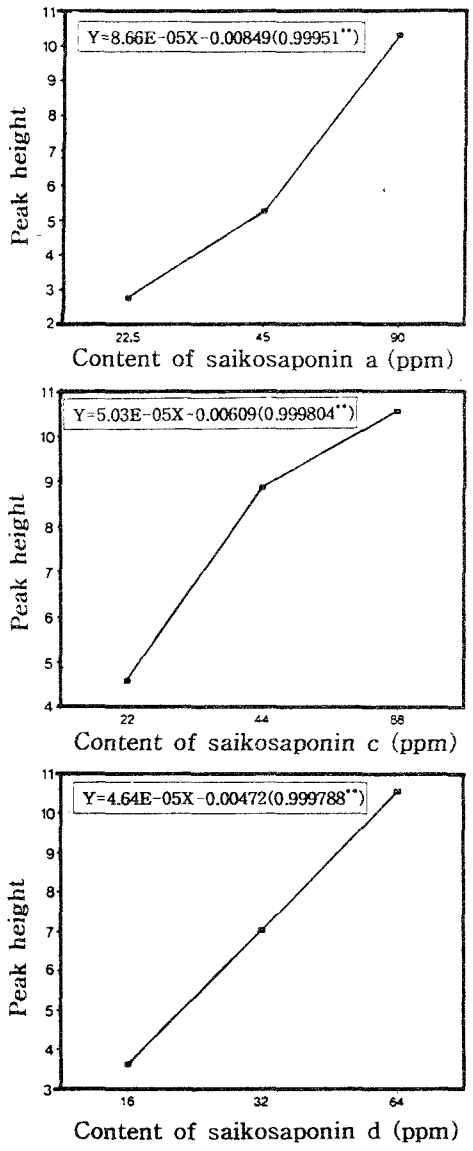

Fig. 1. Calibration curves of saikosaponin a, c and d in HPLC analysis.

결과 및 고찰

시호 체세포클론과 야생 개체의 사이코사포닌 함량을 정량한 결과 사이코사포닌 a, c 및 d의 분리가 뚜렷하게 나타났다 (Fig. 2, Fig. 3). 시호의 사이코사포닌 성분 평가시 가온 추출하여 산처리하는 방법을 이용한 정량법이 적절하다고 보고 (Kim et al., 1995) 된 바 있는데, 본 연구에서도 가온 환류로 추출하여 염산으로 처리한 결과 사이코사포닌의 함량을 효율적으로 분석할 수 있었다.

사이코사포닌 a와 c는 체세포배 유래 1년생 체세포클론에서 높게 나타났으며, 사이코사포닌 d는 기관 배양시 부정근에서 높게 나타나는 것으로 보

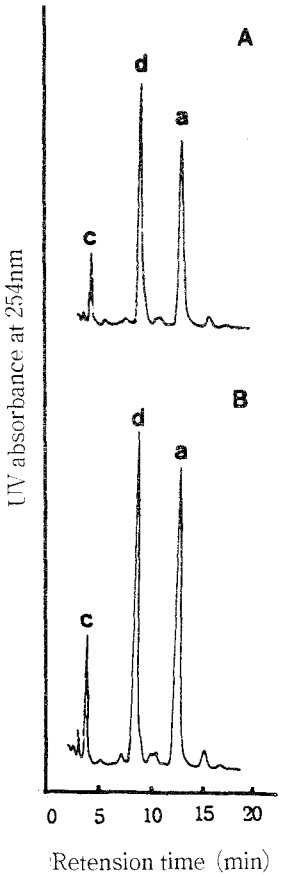

Fig. 2. HPLC chromatograms of saikosaponin in standard material (A) and plant from Yungduk-gun (B).

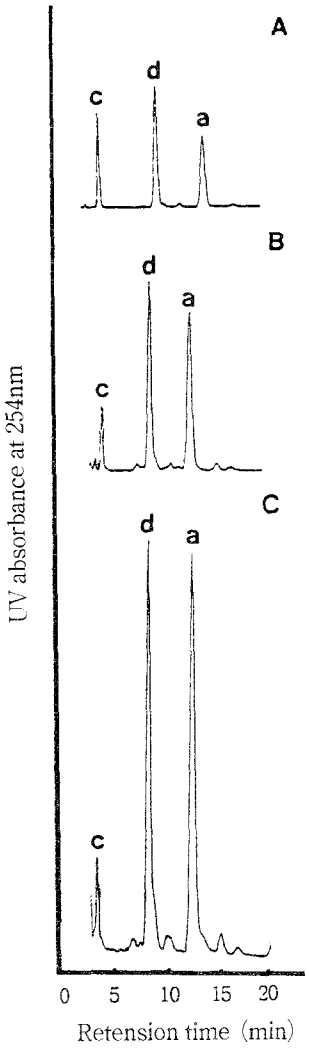

Fig. 3. HPLC chromatograms of saikosaponin in wild plant from Jeongsun-eup (A), 1-year-old regenerant (B) and 2-year-old regenerant (C).

고 (Jo et al., 1990) 된 바 있는데, 본 연구에서는 1년생 및 2년생 체세포클론에서 a > d > c순으로 나타나 차이를 보였다 (Table 1).

사이코사포닌의 총 함량은 1년생 체세포클론, 영덕시호, 정선시호, 2년생 체세포클론의 순서로 높았는데, 2년생 체세포클론에서보다 1년생에서 함량이 높게 나타난 것은 사이코사포닌이 뿌리의 피질 부위에 분포하고 있기 때문인 것으로 사료된

Table 1. Saikosaponin contents of regenerants and wild plants of *B. falcatum* L. by HPLC.

Regenerant and wild plant	No. of plants examined	Root dry weight (g)		Saikosaponin contents (%)							
				a		c		d		Total	
		Mean	CV(%)	Mean	CV(%)	Mean	CV(%)	Mean	CV(%)	Mean	CV(%)
Regenerant (1 year)	71	0.11	68.6	0.48	53.9	0.21	33.9	0.40	49.6	1.10	43.7
Regenerant (2 year)	13	3.41	54.0	0.37	57.4	0.07	48.1	0.27	64.2	0.70	57.1
Wild plant (Jeongsun)	3	2.16	13.2	0.39	14.6	0.08	0.8	0.31	13.2	0.78	12.3
Wild plant (Yungduk)	3	1.65	36.23	0.50	16.7	0.05	19.7	0.32	20.1	0.87	18.0

다 (Park et al., 1992). 재배 년수가 동일한 체세포클론과 야생 시호의 사이코사포닌 함량의 비교에서는 2년생 체세포클론에서보다 야생 시호에서 더 높은 함량을 나타났는데 (자료 미제시), 이는 체세포클론의 사이코사포닌 함량이 야생 시호의 함량보다 높게 나타난 보고와는 일치하지 않는 결과였다 (Hiraoka et al., 1986). 그러나 1년생 체세포클론에서 사이코사포닌의 총함량이 야생 시호 (Table 1)에서보다 2배 이상 높은 1.90%, 1.92%, 1.97% 및 2.43%의 함량을 보이는 체세포클론이 4개체 나타났는데, 이는 조직배양을 통한 체세포클론 변이를 이용하여 우량 변이주의 선발이 가능함을 시사해 주는 것이다.

집단내 개체 간의 사이코사포닌 함량의 변이는 1년생 체세포클론보다 2년생 체세포클론에서, 야생 정선시호보다 1년생 체세포클론에서 더 높게 나타났다. 이는 2차 대사산물의 생산이 배양 기간이 짧은 캘러스에서 유래한 1차 체세포클론 식물에서보다 배양 기간이 더 긴 캘러스에서유래한 2차 체세포클론이 안정성을 나타낸다는 보고와 일치하였다 (Bariaud-Fontanel and Tabata, 1988). 또한 이 결과는 시호의 캘러스에서 유도한 부정근에서 사이코사포닌의 총 함량이 배양 기간이 길어짐에 따라 증가한다는 보고 (Kim et al., 1995)와도 유사하였다.

1년생 체세포클론은 2년생 체세포클론에 비하여 변이가 적었다. 일반적으로 기내 배양 기간이 길어질수록 체세포클론 변이는 증가되지만, 본 실험에서는 캘러스의 배양 기간이 체세포클론의 사이코사포닌 함량 변이에 미치는 영향이 적게 나타난 것이 특징이었다.

적 요

시호 재분화 체세포클론과 야생 개체의 뿌리에서 사이코사포닌 함량을 정량하여 비교 · 분석하였다. 사이코사포닌 함량은 1년생 체세포클론, 경상북도 영덕시호, 강원도 정선시호, 2년생 체세포클론 순으로 높게 나타났다. 사이코사포닌 함량 변이는 3개월간 배양한 캘러스에서 유도되어 2년간 재배된 체세포클론에서 2년간 배양한 캘러스에서 유도되어 1년간 재배된 체세포클론에서보다 높게 나타났다. 이러한 결과는 시호의 경우 사이코사포닌 변이가 캘러스 배양 기간에 별로 영향을 받지 않는다는 것을 보여주는 것이다. 1년생 체세포클론에서 야생 개체에서보다 사이코사포닌 함량이 2배 이상 높은 4개의 체세포클론이 발견되었는데, 이러한 결과는 체세포클론 변이를 이용한 우량 변이주 선발의 가능성을 보여주는 것이다.

사사 : 본 연구는 1995년 교육부 대학부설 유전공학연구소 연구비 지원에 의해 수행되었음.

LITERATURE CITED

Bariaud-Fontanel, A. and M. Tabata. 1988. Somaclonal variation in the berberine-producing capability of a culture strain of *Thalictrum minus*. Plant Cell Reports 7 : 206 - 209.

Hiraoka, N., T. Kodama, M. Oyanagi, S. Nakano,

Y. Tomita, N. Yamada, O. Iida and M. Satake. 1986. Characteristics of *Bupleurum falcatum* plants propagated through somatic embryogenesis of callus cultures. Plant Cell Reports 5 : 319 - 321.

Jo, P. H., R. S. Seung, H. H. Bae, W. Y. Soh and D. Y. Cho. 1990. Saikosaponin contents in *Bupleurum falcatum* root produced by tissue culture. Korean J. Pharmcogn. 21 : 205 - 209.

Kim, K. S., S. T. Lee, N. S. Seong, J. I. Lee and Y. A. Chae. 1995. Comparison of analytical methods for saikosaponins in *Bupleurum falcatum* L. Korean J. Medicinal Crop Sci. 3 : 226 - 232.

Kim, S. G., D. Y. Cho and W. Y. Soh. 1995. Saikosaponin content in adventitious root formed from callus of *Bupleurum falcatum* L. Korean J. Plant Tissue Culture 22 : 29 - 33.

Larkin, P. J. and W. R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation-a novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60 : 197 - 214.

Lee, C. B. 1980. *Illustrated Flora of Korea.* Hyangmoonsa, Seoul. pp. 577 - 578.

Lee, J. S., C. K. Lee and J. W. Choi. 1993a. Pharmacologic activities of saikosaponins (I). Kor. J. Pharmacogn. 24 : 69 - 77.

Lee, J. S., C. K. Lee and J. W. Choi. 1993b. Pharmacologic activities of saikosaponins (II). Kor. J. Pharmacogn. 24 : 153 - 158.

Lee. S. Y., T. S. Kim, H. S. Kim and Y. T. Lee. 1988. Somatic embryogenesis of *Bupleurum falcatum* L. Korean J. Breeding 20 : 15 - 22.

Mizukami, H., K. Matsunaga, H. Ohashi, A. Amano, T. Maekawa and K. Fujimoto. 1991. Variation in saikosaponin content of *Bupleurum falcatum* L. of different geographical origins. Shoyakugaku Zasshi 45 : 342 - 344.

Park, Y. J., H. S. Suh, J. W. Shim and S. K. Lee. 1992. Comparative saikosaponin determination due to cultivars and root ages in *B. falcatum* L. Res. Rept. RDA 34 : 121 - 124.

Tomita, Y. and A. Umori. 1976. Production of *Bupleurum* radix. Japan Patent (Kokai) 76 - 16440.