

디기탈리스의 잎 절편으로부터 신초의 재분화

황성진*† · 이해정** · 황 백**

*동신대학교 식품생물공학과, **전남대학교 생물학과

Shoot Regeneration from Leaf Explants of *Digitalis purpurea* L.

Sung Jin Hwang*†, Hye Jung Lee**, and Baik Hwang**

*Department of Food and Biotechnology, Dongshin University, Naju 520-714, Korea.

**Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju 530-757, Korea.

ABSTRACT : *Digitalis purpurea* L. is a medicinal herb and have been used to congestive heart failure, myocardial infarction, edema, angina etc. A protocol has been developed for *in vitro* propagation of adventitious shoot buds directly from leaf segments of *D. purpurea* Leaf explants of *D. purpurea* directly formed shoot buds when cultured on a MS medium supplemented with 2 mg/l BA and 0.1 mg/l IAA for 5 weeks. Adventitious shoots were multiplied by subculturing on the B₅ medium and shoot elongation was developed by subculturing on the WPM medium. Root formation from the shoot regenerated was achieved on MS basal medium containing 1 mg/ IBA.

Key words : *Digitalis purpurea*, leaf explants, multiple shoots, rooting, plantlets

서 언

디기탈리스 (*Digitalis purpurea* L.)는 유럽이 원산지로서 7~8월에 홍자색의 종형의 꽃을 피우는 현삼과에 속하는 다년생 초본성 식물이다. 보통 1 m 높이까지 자라며 전체에 짧은 털이 나 있고, 잎은 호생하며 잎의 가장자리에는 파상의 톱니모양을 이루고 있다. 디기탈리스 속의 식물은 전세계적으로 관상용으로 널리 보급되어져 왔으나 최근 전초로부터 항암물질과 같은 고부가가치의 약리물질을 분리해 냈으로써 주요 약용자원식물로 그 가치를 인정받고 있다 (이, 1985). 유럽에서는 이미 200여년전에 *D. purpurea*와 *D. lanta*의 뿌리 추출물을 강심제로 사용한 바 있고, 한방에서는 고혈압, 동맥경화, 심기부종증, 심장판막증, 강심이노제등의 처방전에 사용되어지기도 한다. 특히, 잎은 창상(創傷) 치료제로서 육아(肉芽)의 형성을 촉진시키는 것으로 알려지고 있다. 주요성분으로는 강심 배당체의 주종인 genin glycoside와 *purpurea* glycoside A, B,

C, gitostin, glucodiglycoside 등이 있으며, 약리 성분으로 secondary glycoside에 속하는 digitoxin, gitoxin, gitaloxin을 생합성 하는 것으로 알려지고 있다 (이, 1994).

고등식물조직의 기내 (*in vitro*) 배양은 급속히 변화가는 생태환경으로부터 유용한 약용식물종의 보존은 물론 고품질의 신품종 육성, 그리고 천연약리소재의 획득을 위한 매우 획기적인 기술로 받아들여지고 있다 (Harn, 1984). 디기탈리스 속의 식물에 대한 기내 배양에 관한 연구는 *D. obscura*의 shoot tips의 배양에 의한 식물체의 재분화 (Gavidia & Pérez-Bermudez, 1997)를 비롯하여 *D. lanta*의 캘러스로부터 체세포배의 유도 (Kuberski et al., 1984), *D. obscura*의 기관분화에 의한 증식 (Perez-Bermudez et al., 1983), 그리고 *D. lanta*의 잎과 뿌리배양에 의한 기내 증식이 이루어 졌다. 또한 디기탈리스 속 식물의 기내 배양에 의한 약리물질 생산과 관련된 연구로서는 *D. lanta*의 유묘배양에 의한 cardenolide의 생산

† Corresponding author: (Phone) +82-61-330-3225 (E-mail) jinsci@lycos.co.kr

Received October 21, 2003 / Accepted November 14, 2003

(Eisenbei et al., 1999)을 비롯하여 *D. lanta*의 퀼러스로부터 anthraquinones의 생산 (Furuya et al., 1971; Furuya & Kojima, 1972; Imre & Sar, 1976), 그리고 *D. purpurea*의 퀼러스로부터 phenolic glycoside의 분리 (Matsumoto et al., 1987), *D. purpurea*의 현탁배양에 의한 saponin의 생산 (Pilgrim, 1997) 등이 있다. 그러나, 국내에서는 디기탈리스 속은 물론 *D. purpurea*의 기내 배양에 관련한 연구가 거의 없는 실정이며, 단지 *D. lanata*의 현탁세포배양에 의한 digoxin의 생산 (Kim et al., 1995) 연구만이 보고된 바 있다.

본 실험은 *D. purpurea*의 형질전환 및 유용물질의 생산을 위한 연구의 일환으로 기내배양을 통한 디기탈리스의 잎 절편으로부터의 직접 신초의 형성과 증식을 위한 최적 배양조건을 규명하기 위해 행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 배지조제

디기탈리스 (*Digitalis purpurea* L.) 종자는 Richters Herbs사 (Canada)로부터 분양을 받아 70% (v/v) ethanol과 0.5% (v/v) sodium hypochlorite 용액에서 각각 5분간 표면살균 처리 후 무균수로 3회 세척한 다음 MS (Murashige & Skoog, 1962) 배지 성분 중에서 무기염의 농도를 절반으로 줄인 1/2 MS 배지에서 무균적으로 발아를 유도 하였다. 유식물체는 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 MS 배지 (MSO)로 옮겨 4주간 배양한 후 실험에 이용하였다. 실험에 사용된 모든 배지는 탄소원으로 3% (w/v) sucrose를 첨가하고 pH는 5.7로 조정한 후 0.8% (w/v) 한천을 첨가하여 121°C에서 15분간 감압 멸균하여 사용하였다.

2. 신초의 유도

유식물체의 조직절편으로부터 직접 부정아를 유도하기 위해서 무균상태에서 발아된 유식물체의 잎과 줄기부분을 약 1.5 cm와 1.2~1.5 cm로 각각 절취한 후 식물생장조절물질인 BA가 0.5, 1, 2, 3 mg/l 농도로 단독 첨가되거나 NAA, IAA 그리고 2,4-D가 0.1, 1 mg/l 농도로 BA와 조합하여 처리된 MS배지에 치상 하였다. 모든 배양체는 암소에서 25±1°C로 배양하였으며, 배양 3주 후 explant로부터 부정아의 형성을 확인 하였다.

3. 신초의 증식

신초의 대량증식은 길이가 약 1.5 cm 정도 자란 신초만을 절취하여 MS, 1/2 MS, 무기염의 농도를 2배로 높인 2MS, WPM (Lloyd & McCown, 1981), 그리고 B₅

(Gamborg et al., 1968) 배지에 치상하였다. 모든 배양체는 광주기가 18:6으로 조절되는 배양실 (25±1°C)에서 광도 50 M m⁻² s⁻¹ 로 배양하였다.

4. 신초의 발근

기내에서 증식된 신초로부터 발근을 유도하기 위해서 MS 배지에 식물성장조절물질인 IAA, IBA, NAA를 각각 1, 2 mg/l 씩 단독 처리한 배지에 길이 약 2 cm 정도의 신초만을 절취하여 기저부가 배지에 접하도록 하여 치상 하였다.

결과 및 고찰

1. 종자의 발아 및 신초의 형성

표면살균된 디기탈리스의 종자를 무기염의 농도를 절반으로 줄인 1/2 MS 배지에서 치상하여 기내 발아를 유도하였을 때 98%의 발아율을 나타내었다 (data not shown). 발아된 유식물체는 동일 배지로 옮겨 5주 가량 배양한 후 식물조직 절편으로부터 직접 부정아를 유기 시키기 위해 잎과 줄기를 절취하여 MS배지에 BA 또는 BA와 IAA, NAA, 2,4-D가 혼합하여 처리된 MS 배지에 치상 하였다. 배양 3주 후 2 mg/l BA와 0.1 mg/l IAA가 조합 처리된 실험구에서 잎절편으로부터 부정아가 직접 유기되었다 (Table 1; Fig. 1). 그러나 줄기 절편으로부터는 모든 조건에서 부정아의 형성을 확인할 수 없었다. 일반적으로 식물조직의 절편으로부터 직접 부정아를 유기 시키는 경우에 있어서 무엇보다도 시토키닌류인 BA의 농도에 의해 좌우되는 경우가 많다 (Mandal et al., 1995). 그러나, BA의 단독처리 보다는 저농도의 NAA나 IAA와 같은 옥신류와 혼합하여 처리하였을 때 보다 효과적일 수 있다고 보는 경우도 있다 (Tripepi, 1997). 식물조직의 절편으로부터 직접 기관형성과 같은 변화를 유도하는데 있어서 이와 같은 차이를 보이는 것은 유전학적 차이나 성장 상태 등이 다르기 때문으로 볼 수 있기 때문에 결국 BA를 포함한 식물성장조절물질의 농도별 조합 처리를 통해서 이를 해결하는 수 밖에 없다 (Chengalayan et al., 1998). 디기탈리스의 경우에는 시토키닌류인 BA를 단독으로 처리하거나, NAA나 2,4-D와 함께 처리 하였을 때 잎이나 줄기 모두에서 부정아의 형성은 이루어지지 않았으며, 2,4-D 단독 처리구에는 조직의 괴사현상을 유발하였다 (data not shown). BA에 NAA를 조합하여 처리하거나 고농도의 BA 처리구에서는 퀼러스 형성을 보여주었다. 또한 같은 시토키닌류인 kinetin의 경우 IAA와 함께 처리하였을 때 부정근이 형성되었으며, kinetin과 NAA를 함께 처리할 경우에는 퀼러스가 형성되었다 (data not shown). 결과적으로 *D. purpurea*의 조직 절편으로부터 부정아의 직접적인

Table 1. Effect of BA and IAA on adventitious shoot buds formation from leaf segments of *D. purpurea* L.

PGRs (mg/l)		Responding explants (%) [†]
BA 1	IAA 0.1	33
	0.5	40
	1.0	ND [‡]
BA 2	IAA 0.1	95
	0.5	67
	1.0	33
BA 3	IAA 0.1	C [§]
	0.5	C [§]
	1.0	C [§]

[†] Experiments were repeated three times with 25~30 explants per treatment.

[‡] ND, not response. [§] C, callogenesis.

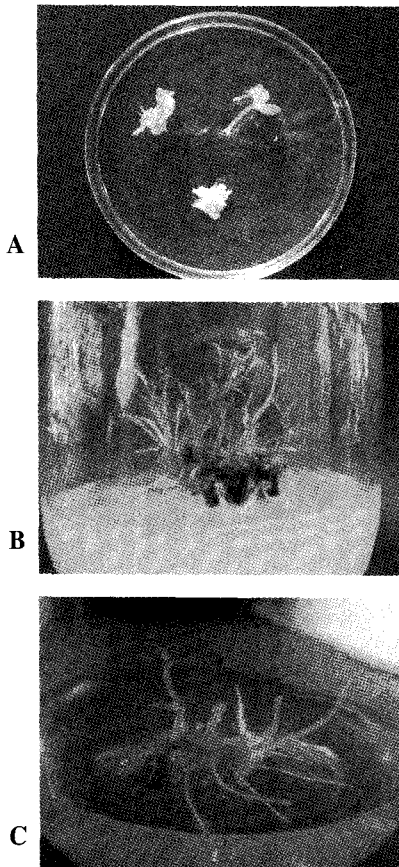


Fig. 1. Shoots regeneration from leaf explants of *D. purpurea* L. A, adventitious shoot buds regenerated from leaf explants on MS medium containing 2 mg/l BA and 0.1 mg/l IAA; B, multiplication of adventitious shoots on B₅ medium and C, Adventitious roots formation in a shoot after 4 weeks on MS medium containing 1 mg/l IBA.

형성을 위해서는 kinetin 보다는 BA를 사용하되 단독처리 보다는 IAA를 함께 처리하는 것이 보다 효과적임을 알 수 있었다. 이는 Perez-Bermudez *et al.* (1983)이 *D. obscura*의 자엽 조직절편으로부터 기관분화를 유도하는데 있어서 BA와 함께 NAA나 IAA를 처리함으로써 보다 효과적 이었다는 연구결과와 유사하나, Park *et al.* (1998)은 같은 현삼과 식물인 지황에 있어서 BA의 단독 처리나 IAA보다는 NAA를 조합하여 처리하는 것이 조직절편으로부터 직접 부정아를 유기 시키는데 있어서 효과적이었다는 연구결과와는 약간 차이를 보여주고 있다.

2. 신초의 증식

잎 조직절편으로부터 재분화된 부정아로부터 형성된 신초의 대량증식을 위한 적정 배양배지를 탐색하기 위하여 동일 배지에서 배양 5주 후 성장이 양호한 길이 1.5 cm 정도의 유도묘를 선별하여 MS 배지를 포함한 4종의 기본배지에 옮겨 치상 하였다. 4종의 기본배지에서 배양 5주 후 재분화된 신초의 수는 B₅ 배지에서 explants 당 평균 21.6 개로 18개의 MS 배지에 비해 신초의 재분화율이 다소 높게 나타났다 (Fig. 2). 그러나, 신초의 생장에 있어서는 약간 다른 양상을 보여주었는데 WPM 배지에서 배양 5주 동안에 최고 약 5.9 cm까지 길이 신장을 나타내었으나 (Table 2), MS 배지에 비해 줄기가 가늘고 잎의 수나 생장에 있어서는 낮게 나타났다 (data not shown). 한편, 무기염농도를 2배로 높여준 2 MS 배지나 무기염을 반으로 줄인 1/2 MS 배지에서는 신초의 형성은 물론 신초의 생장이 억제 되거나 정지되었다. 기내에서 신초의 증식과 생장은 식물생장조절물질 뿐만아니라 배지성분에 의해서도 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 이는 배지성분의 차이에 따른 식물종별 생육조건이 다르기 때문일 것으로 사료된다. 가령 본 연구결과와 유사한 경우로는 Kayo *et al.* (1988)의 *Cephaelis ipecacuanha*의 기내증식에 관련한

Table 2. Effect of media on shoots multiplication and growth in *D. purpurea* L. [†]

Media	No. of shoots/explant	Shoot length (cm)
1/2 MS	13.0	2.5
MS	18.0	2.3
2 MS	- [‡]	-
WPM	2.6	5.8
B ₅	21.0	2.4

[†] Experiments were repeated three times with 25~30 explants per treatment.

[‡] -, necrosis.

연구에서도 찾아볼 수 있다. 그러나 현삼과 식물인 지황의 경우는 본 실험결과와 달리 MS 배지에서 기내 유묘의 증식과 생장이 가장 좋게 나타났으며 (Park *et al.*, 1998), 산수유 경우에는 WPM 배지를 수정한 DKW 배지가 적절한 것으로 나타났다 (Seong *et al.*, 1993). 본 연구결과 *D. purpurea*의 대량증식을 위해서는 B₅배지에서 부정아의 형성을 유도한 다음 MS 배지로 옮겨 신초의 증식을 유도하는게 매우 효과적일 것으로 판단되었다.

3. 발근

증식된 유묘들 중에서 전장이 약 2 cm 정도 자란 신초만을 선별하여 절취한 후 MS 배지에 오옥신류를 농도별로 첨가하여 발근을 유도 하였다. 신초로부터 발근은 IBA와 IAA 처리구에서 98% 이상 발근이 이루어 졌으며, 식물성장조절물질이 첨가되지 않은 배지에서는 발근이 거의 이루어지지 않았다 (Table 3). 발근은 1 mg/l IBA의 처리구에서 배양 6주 후 21.5개로 가장 많이 형성되었으며, 식물성장조절물질의 농도가 증가될 수록 발근은 억제되었다 (Table 3). 또한, NAA 처리구에서는 배지와 접한 기저부에서 모두 캘러스화되는 현상을 확인할 수 있었다. Nand & Paramvir (1989)도 Indian rhubarh의 잎절편과 유묘로부터 신초의 증식에 대한 연구에서 IBA에 의해 효과적으로 발근을 유도됨을 보고한 바 있다. 그러나, Pal *et al.* (2002)에 의해 이루어진 아프리카에 자생하는 약용식물인 *Spilanthes mauritiana*의 측아로부터 기내 유묘의 증식에 관한 연구와 인도에 자생하는 약용식물인 *Nothapodytes foetida*의 경우에는 IAA를 단독으로 처리하거나 IAA와 IBA를 혼합하여 발근을 유도하였고 (Ravishankar, 2002), *Taraxacum mongolicum* (Lee *et al.*, 2002)의 경우에는 NAA가 오히려 IBA보다 발근을 유도하는데 효과적 이라고 보고한 바 있다. 이와같은 연구결과들을 놓고 볼 때 기내에서 재분화된 유묘로부터의 발근 유도는 식물

의 유전학적 특성에 기인하여 식물성장물질인 오옥신류를 소량 첨가하거나 식물성장조절물질이 완전히 제거된 배지에서도 이루어질 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

적 요

심장질환 및 암치료에 약제로 사용되어지는 *D. purpurea*의 잎 절편으로부터 신초의 재분화와 증식을 시도하였다. MS 배지에 2 mg/l BA와 0.1 mg/l IAA를 조합하여 처리하였을 때 잎절편으로부터 부정아가 형성되었다. 유기된 부정아로부터 신초의 증식은 식물성장조절물질이 첨가된 B₅ 배지에서 배양 5주 후 약 21개의 신초가 분화되었으며, 신초의 길이 신장과 생육은 WPM 배지와 MS 배지에서 가장 양호한 것으로 나타났다. 한편 기내 증식된 신초로부터의 발근은 1 mg/l IBA를 첨가된 MS 배지에서 신초당 21.5개가 형성되었다.

LITERATURE CITED

Chengalrayan K, Mhaske VB, Hazra S (1998) Genotype control of peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 17:522-525.

Eisenbei M, Kreis W, Reinhard E (1999) Cardenolide biosynthesis in light and dark grown *Digitalis lanta* shoot cultures. *Plant Physiol. Biochem.* 37:13-23.

Furuya T, Kojima H, Katsuta T (1972) 3-Methylpurpurin and other anthraquinones from callus tissues of *Digitalis lanta*. *Phytochemistry* 11:1073-1076.

Furuya T, Kojima H (1971) 4-Hydroxydigitolitein, a new anthraquinone from callus tissue of *Digitalis lanta*. *Phytochemistry* 10:1607-1610.

Gavidia I, Perez-Bermudez P (1997) Cardenolides of *Digitalis obscura*: The effect of phosphate and manganese on growth and productivity of shoot-tip cultures. *Phytochemistry* 45:81-85.

Harn CY (1984) Fundamental studies on plant breeding. RDA Res. Bull. p. 245-356.

Imre S, Sar S, Thomson RH (1976) Anthraquinones in *Digitalis species*. *Phytochemistry* 15:317-320.

Jiang LC, Mao WY (1979) Callus formation and plantlet regeneration of *Rehmannia glutinosa*. *Chin. Med. Herb. Lett.* 2:42.

Kayo Ideda, Daisuke Teshima, Toshinobu Aoyama, Motoyoshi Satake, and Koichiro Shimomura (1988) Clonal propagation of *Cephaelis ipecacuanha*. *Plant Cell Rep.* 7:288-291.

Kim HK, Hong HJ, Kim DI (1994) Digoxin production by using biotransformation in *Digitalis lanata* cell suspension cultures. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22:651-658.

Kuberski C, Scheibner H, Steup C, Diettrich B, Luckner M (1984) Embryogenesis and cardenolide formation in tissue cultures of *Digitalis lanta*. *Phytochemistry* 23:1407-1412.

Lee MY, Yoon ES, Jung SJ, Bae KH, Seo JW, Choi YE (2002)

Table 3. Effect of PGRs on *in vitro* rooting of *D. purpurea* L.

PGRs (mg/l)	No. of roots/explant
Non-treatment	ND [†]
NAA 1	C [†]
2	C [†]
IBA 1	21.5
2	16.0
IAA 1	6.5
2	6.3

[†] ND, no response. [†] C, callogenesis.

- Plant regeneration and effect of auxin and cytokinin on adventitious shoot formation from seedling explant of *Taraxacum platycarpum*, Korean J. Plant Biotech, 29:111-115.
- Mandal AKA, Gupta SD** (2001) Direct shoot organogenesis and plant regeneration in safflower. *In vitro Cell, Dev. Biol.-Plant*, 37:50-54.
- Masumoto M, Koga S, Shoyama Y, Nishioka I** (1987) Phenolic glycoside composition of leaves and callus cultures of *Digitalis purpurea* L. *Phytochemistry* 26:3225-3227.
- Masumoto M, Shoyama Y, Nishioka I** (1988) Effect of bacterial and virus infection on iridoid glycoside contents in *Rehmannia glutinosa* Libosch. var *purpurea* Makino. *Shoyakugaku Zasshi*, 42:329-332.
- Nand L, Paramvir SA** (1989) Propagation of Indian rhubarb (*Rheum emodi* Wall.) using shoot-tip and leaf explant culture. *Plant Cell Rep.* 8:493-496.
- Pal BH, Green JB, Walker TS, Okemo PO, Vivanco JM** (2002) *In vitro* propagation of *Spilanthes mauritiana* DC., an endangered medicinal herb, through axillary bud cultures. *In vitro Cell, Dev. Biol.-Plant*, 38:598-601.
- Park CH, Seong NS, Park KY, Lee CH** (1988) Micropropagation through callus culture in Chinese foxglove (*Rehmannia glutinosa*). *Korean J. Plant Tissue Cult.* 25:171-175.
- Perez-Bermudez P, Cornejo MJ, Segura J** (1983) *In vitro* propagation of *Digitalis obscura* L. *Plant Sci, Lett.* 30:77-82.
- Pilgrim H** (1977) Saponin in suspension cultures of *Digitalis purpurea* L. *Phytochemistry* 16:1311-1312.
- Ravishankar RV** (2002) Rapid clonal propagation of *Nothapodytes foetida* (Wight)-A threatened medicinal tree. *In vitro Cell, Dev. Biol.-Plant* 38:347-351.
- Rha ES, Kim JK** (1996) Plant regeneration in leaf explant cultures of *Rehmannia glutinosa*. *Korewan J. Plant Tissue Cult.* 23:299-302.
- Seong NS, Lee ST, Park KY, Chae YA, Park CH, Park SI** (1993) Micropropagation of *Aconitum carmichaeli* and *Rehmannia glutinosa* through the plant tissue culture techniques. *RDA Special Res. Rep.* p. 46.
- Tripepi RR** (1977) Adventitious shoot regeneration. p. 45-71. *In* Geneve RL, Preece JE, Merkle SA (eds), *Biotechnology of ornamental plants*. Wallingford, UK.
- 李昌福** (1985) *大韓植物圖鑑*. 鄉文社. p. 680.
- 李正日, 桂鳳明** (1994) *藥用植物의 利用과 新栽培技術*. 先進文化社. p. 147.