

식물생장조절물질, 무기물 농도 및 질소원 비율이 *Gymnema sylvestre* 세포 배양에 미치는 영향

이은정¹, 한은주¹, 백기엽^{1*}

¹충북대학교 첨단원예기술개발연구센터

Effects of Plant Growth Regulators, Medium Salt Strength and Nitrogen Ratio on Cell Culture of *Gymnema sylvestre*

Eun-Jung Lee¹, Eun-Joo Hahn¹ and Kee-Yoeup Paek^{1*}

¹Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Chungbuk National University, Cheong-ju 361-763, Korea

ABSTRACT This study was carried out to investigate the effects of plant growth regulators, medium salt strength and nitrogen ratio on cell culture of *Gymnema sylvestre*. Cell growth was inhibited by 2,4-D higher than 1.0 mg L⁻¹, but not by kinetin lower than 0.5 mg L⁻¹. Maximal cell growth was obtained at 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D and 0.1 mg L⁻¹ kinetin. Cell growth was greatest at 1x MS medium but high strength of MS medium inhibited cell growth due to low water potential in the medium. In NH₄⁺:NO₃⁻ ratio of 0:60 (i.e. 0.0 mM NH₄⁺ and 60.0 mM NO₃⁻), cells growth was highest but cells were smaller and whiter compared with those in other NH₄⁺:NO₃⁻ ratio. Reduced cell growth was observed with continuous culture. These results suggested that optimal cell culture of *G. sylvestre* could be achieved with 1x MS medium with 20:40 ratio of NH₄⁺:NO₃⁻ supplemented with 1.0 mg L⁻¹ 2,4-D and 0.1 mg L⁻¹ kinetin.

Key words: Bioreactor culture, cell culture, *Gymnema sylvestre*

서 론

Gymnema sylvestre R. Br.은 열대 및 아열대 지방에서 자생하는 다년생 덩굴식물로 박주가릿과 (Asclepiadaceae)의 gymnema속으로 분류된다 (Ashok Kumar et al. 2002). 최근 식물의 유효성분을 분리하고 이들의 약리효과를 규명하는 연구가 활발히 진행되면서 gymnema에 대한 연구도 이루어지고 있다. Gymnema의 주요 유효성분은 triterpenoid saponin 계열의 gymnemic acid라 불리는 물질로 인슐린의 분비와 합성에 관여하는 췌장의 β -세포 재생을 도와 체내의 인슐린 함량을 높여주며, 당뇨병으로 인해 파괴 또는 기능이 저하된 췌장의 기능도 회복시켜 준다 (Xie et al. 2003). 또한 체

내에 sucrose 투약시 당분해를 도와주고, 소장에서의 glucose 흡수억제와 glucan 합성을 저해하여 당뇨병 치료에 효과가 있는 것으로 밝혀졌다 (Ananthan et al. 2003). Chanwitheesuk 등 (2005)도 타이완의 식용 채소 43종 중 항산화물질로 알려진 비타민과 카로테노이드, 페놀화합물 등이 gymnema에 가장 많이 함유되어 있다고 보고하여 약용식물로의 가치를 밝힌 바 있으며, 기타 다양한 약리효과가 있음이 알려지면서 수요가 점차 증가하고 있다 (Selvanayagam et al. 1995; Sathive et al. 2003).

Gymnema는 종자로 번식하는데 생존율과 발아율이 낮고, 영양체 번식의 경우에도 발근율이 낮아 증식이 어렵다 (Komalavalli and Rao 2000). Gymnema의 상업적 가치가 알려지면서 과도한 채취로 (Choudhury 1988) gymnema의 보존과 증식 그리고 수요에 따른 효과적인 공급방식이 필요하게 되었다. 현재 gymnema속의 증식에 관한 연구는 제한적으로

*Corresponding author Tel 043-266-3245 Fax 043-272-5369

E-mail: paekky@cgnu.ac.kr

이루어지고 있다. Ashok Kumar 등 (2002)은 *G. sylvestre* 체세포 배를 이용한 증식실험 결과 83%의 체세포 형성률과 60%의 발아율을 나타낸다고 보고하였으며, Komalavalli 과 Rao (2000)는 삼목번식을 이용한 실험에서 액아를 이용하여 증식할 경우 84%의 식물체 형성률을 보고하였다. 그러나 증식된 식물체를 상토로 이식할 경우 발근률이 50% 이하로 낮아 *gymnema*속의 새로운 증식방법의 확립이 요구되고 있다.

최근 주목, 인삼 등 다양한 약용식물 세포를 기내에서 배양하여 그로부터 유용물질을 획득하려는 실험이 활발하게 진행되고 있다 (Wu et al. 2005; Khosroushahi et al. 2006). Gopi와 Vatsala (2006)도 *G. sylvestre* 세포배양에 적합한 식물생장조절물질의 종류와 농도에 관한 실험을 수행하였으나 대량생산에 필요한 다양한 요인을 고려하지 않았다. 기내에서 배양 중인 세포의 생장에 영향을 주는 요인에는 크게 배지 내 함유된 식물생장조절물질, 무기염류, 탄소원 등과 같은 화학적 요인과 광, 온도, 공기 공급량, 세포 접종밀도 등과 같은 물리적 요인을 들 수 있다 (Kim et al. 2003). 이 중 식물생장조절물질은 세포의 생장과 분화 및 2차 대사산물 생산에 영향을 미치는 요인으로 이들의 종류와 농도의 선정은 세포의 대사 작용에 큰 영향을 미친다 (Rokem and Goldberg 1985). 또한 식물 세포가 기내라는 특수한 환경에서 생장, 증식하기 위해서는 다양한 무기염류가 필요하다. 무기염류의 요구도는 식물의 종류, 배양조직, 기관의 종류에 따라 다르며, 특정 배지 조성이 배양 효율을 증대시킬 수 있다. 식물 조직이나 세포, 원형질체 배양 등에 폭넓게 사용되고 있는 MS배지의 주성분은 암모니아태나 질산태 형태로 공급되는 무기질소이다. 이들 질소원은 식물세포 내에서 단백질, 핵산, 호르몬 및 엽록소를 포함한 많은 중요한 분자들의 구성 성분이며, 질산태 질소와 암모니아태 질소의 비율에 따라 세포증식이나 부정배 형성, 화아분화 및 2차 대사산물 합성 등이 영향을 받으므로 목적에 따라 균형 있는 농도조절이 필요하다 (Zhang et al. 1996).

본 연구는 약용가치가 우수한 *G. sylvestre*의 세포를 기내에서 대량생산 할 수 있는 방법의 확립을 위해 세포생장에 영향을 미치는 배지 내 식물생장조절물질, 무기물 농도, 질소원 비율에 관한 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

식물재료는 인도 Karnatak University 수목원에 있는 동일 모본의 *G. sylvestre* 종자를 사용하였다. 종자 소독을 위하여 5분간 흐르는 물에서 수세 후, 70% EtOH에 30초, 5% NaOCl에 20분 동안 소독 후 멸균수로 3회 수세하였다. 소독된 종자

를 sucrose 2%와 gelrite (Duchefa, Haarlem, The Netherlands) 0.23%가 함유된 MS배지 (Murashige and Skoog 1962)에 접종하고 이로부터 유도된 종자의 배축과 자엽 (종자발아 3일째 채취), 어린 잎 (종자발아 2주째 채취)을 절단하여 2,4-D 0.44 mg L⁻¹, BA 0.23 mg L⁻¹, sucrose 2%, gelrite 0.23%가 함유된 MS배지에 접종하여 캘러스를 유도하였다. 유도된 캘러스를 2,4-D 1.0 mg L⁻¹, kinetin 0.1 mg L⁻¹, sucrose 3%, gelrite 0.23%가 함유된 MS배지에서 유지, 증식시켜 실험재료로 이용하였다.

식물생장조절물질의 종류와 농도

유도된 세포의 대량증식에 적합한 2,4-D와 kinetin 농도를 조사하기 위하여 sucrose 3%가 함유된 MS배지에 각각 농도별로 처리하였다. 배양은 400 mL 삼각플라스크에 100 mL씩 배지 분주 후, 처리구당 6 g (wet weight 기준)의 캘러스를 접종하여 20±1 °C로 유지되는 암배양실에서 95 rpm 조건으로 3주간 액체진탕배양으로 수행되었다. 배양 3주 후 vacuum pump를 이용하여 세포 내 수분을 모두 제거한 뒤 생체중을 측정하였으며, 60°C로 고정시킨 건조기 (FO-600M, Jeio tech, Cheongju, Korea)에서 24시간 건조 후 건물중을 측정하였다.

무기물 농도

세포생장에 적합한 배지 내 무기물 농도를 조사하기 위하여 MS배지의 전체 무기물 농도를 1/4x, 1/2x, 1x, 2x로 각각 처리하였다. 모든 처리구는 2,4-D 1.0 mg L⁻¹, kinetin 0.1 mg L⁻¹, sucrose 3%를 함유하였으며, 생체중에 대한 건물중 비율 (% dry weight)은 Kim (2002)의 방법에 따라 아래 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{생체중에 대한 건물중 비율} = \text{건물중} / \text{생체중} \times 100$$

기타 배양조건과 성장조사는 이전 실험과 동일하게 실시하였다.

질소원의 비율

NH₄⁺:NO₃⁻ 비율이 *G. sylvestre* 세포생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 초기 총 질소원의 농도를 60 mM로 고정 후, NH₄⁺:NO₃⁻ 비율을 0:60, 10:50, 20:40, 30:30, 40:20, 50:10, 60:0으로 각각 처리하였다. NH₄Cl과 KNO₃를 이용하여 두 질소원의 비율을 조절하였으며, 모든 처리구는 질소원을 제외한 MS배지에 2,4-D 1.0 mg L⁻¹, kinetin 0.1 mg L⁻¹, sucrose 3%를 함유하였다. 배양 3주 후 배지를 채취하여 NH₄⁺, K, Ca, Mg은 원자흡광광도계 (AA-6710F, Shimadzu, Kyoto, Japan), NO₃⁻는 이온분석장치 (FIA star 5000, Foss tecator, Hoganas, Sweden)를 이용하여 배지 내 남아있는 무기원소들의 양을 측정하였

으며, P의 함량은 vanadate법 (Lim 2000)을 이용하여 470 nm 파장에서 분광광도계 (Uvikon-930, Kontron Instruments Co., Zurich, Switzerland)를 사용하여 배지 내 남아있는 양을 측정하였다. 기타 배양조건과 성장조사는 이전 실험과 동일하게 실시하였다.

통계처리

본 실험의 통계처리는 SAS 프로그램 (Statistical Analysis System, Cary, NC)을 이용하여 5% 유의범위 수준에서 Duncan 다중비교로 처리하였다 (SAS Institute 1989).

결과 및 고찰

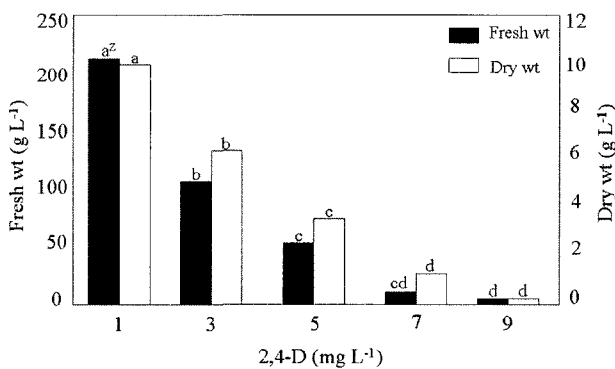
식물생장조절물질의 종류와 농도

G. sylvestre 세포생장에 적합한 2,4-D 농도를 조사한 결과 2,4-D 농도가 증가할수록 생체중과 건물중이 감소하였다. 2,4-D 1.0 mg L⁻¹ 처리구에서 생체중과 건물중이 220.1 g L⁻¹와 10.6 g L⁻¹로 가장 높게 나타났으며, 5.0 mg L⁻¹ 이상 처리구의 세포 성장량은 1.0 mg L⁻¹ 처리구의 성장량과 비교하여 50% 이하로 억제되었다 (Figure 1).

이는 2,4-D가 저농도로 사용될 경우 세포분열 주기과정 중 DNA 합성을 촉진하여 세포분열을 촉진시키지만 고농도로 사용될 경우 선택적 제초제로 이용이 가능할 정도의 독성을 가진 클로로페녹시산 그룹의 식물생장조절물질이기 때문이다 (Garcia et al. 2004). 따라서 타 옥옥신에 비하여 저농도에서도 작용력이 강하여 (Taguchi et al. 2001) 1.0 mg L⁻¹ 이상의 농도로 사용할 경우 독성에 따른 세포분열 감소로 세포 성장량이 낮게 나타난 것으로 생각되었다. 본 실험결과 최저

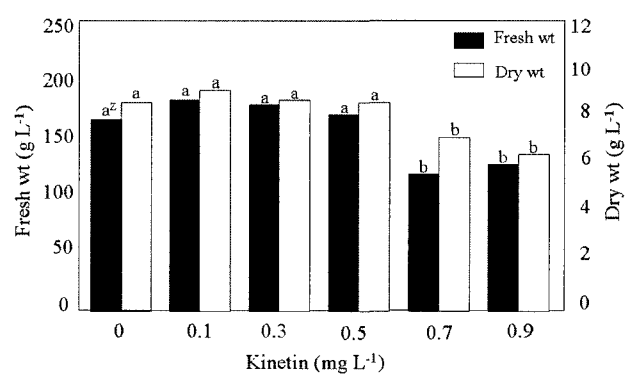
2,4-D 농도에서 가장 높은 성장량을 나타내었으며, Gopi와 Vatsala (2006)도 2,4-D 1.0 mg L⁻¹ 이상 처리시 *G. sylvestre* 세포 성장량이 감소한다고 보고하였으므로 2,4-D의 독성에 따른 세포 성장량 감소를 정확하게 확인하기 위해서는 1.0 mg L⁻¹ 이하 농도조건에서도 조사할 필요가 있다고 생각한다. Narayan 등 (2005)은 2,4-D 1.0 mg L⁻¹ 처리시 *Daucus carota* 세포 성장량이 가장 높게 나타났으며, 2.5 mg L⁻¹ 이상 처리시 생체중이 급격히 감소하였다고 보고하였다. 또한 Zhong 등 (1996)도 1.0 mg L⁻¹ 이상의 2,4-D 처리시 *Panax quinquefolium* 세포 성장량이 감소한다고 보고하였다.

고농도의 옥옥신과 함께 저농도의 사이토키닌을 혼용하여 사용할 경우 일반적으로 세포 성장량 증대를 가져온다 (Zhong et al. 1996). 따라서 2,4-D 1.0 mg L⁻¹와 혼용하여 사용할 경우 *G. sylvestre* 세포 성장량 증대에 적합한 kinetin 농도를 조사한 결과 0.5 mg L⁻¹ 이하 kinetin 처리구들은 옥옥신 단독 처리구와 비교하여 생체중과 건물중이 큰 차이가 없었다 (Figure 2). 비록 5% 유의범위 수준에서 네 처리구간에 차이가 없었지만 0.1 mg L⁻¹ 처리구에서 생체중과 건물중이 181.8 g L⁻¹와 9.2 g L⁻¹로 가장 높게 나타났으므로 최적 농도라 판단되었다. 0.7과 0.9 mg L⁻¹ 처리구의 경우 세포 성장양상은 타 처리구와 차이가 없었으나 세포 성장량이 감소하였다. 이는 고농도의 옥옥신 사용시 저농도의 사이토키닌 첨가는 일반적으로 세포 분열을 촉진하는 영향을 가지고 있지만, 함께 사용하는 옥옥신과의 비율에 따라 배양조직의 발달양상이나 형태형성의 방향 및 세포 분열율이 달라지기 때문에 식물종과 함께 사용하는 옥옥신의 종류 및 농도에 따라 적정농도가 달라지기 때문이라고 판단되었다. Narayan 등 (2005)은 IAA와 저농도의 kinetin을 함께 사용할 경우 *Daucus carota* 세포 성장량이 증가하며 0.2 mg L⁻¹ 이상의 농도를 사용할 경우 성장량이 오히려 감소한다고 보고하였다. Attard와 Scicluna-Spiteri (2001)도 옥옥신 단독 처리와 비교하여 옥옥신과 사이토키닌을 함께



²Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, 5% level.

Figure 1. Effect of 2,4-D concentrations on cell growth of *G. sylvestre* after 3 weeks in culture.



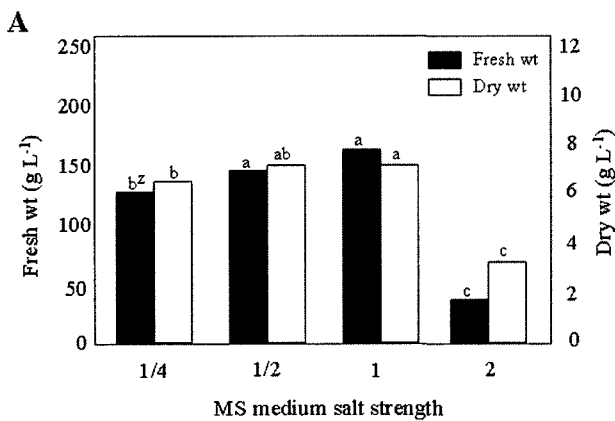
²Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, 5% level.

Figure 2. Effect of kinetin concentrations on cell growth of *G. sylvestre* after 3 weeks in culture.

처리하였을 때 세포 성장량이 증가한다고 보고하여 본 실험과 일치하는 결과를 나타내었다. 따라서 *G. sylvestre* 세포배양의 경우 2,4-D 1.0 mg L⁻¹ 와 kinetin 0.1 mg L⁻¹를 함께 사용하는 것이 세포 성장량 증대에 효율적이라 판단된다.

무기물 농도

G. sylvestre 세포생장에 적합한 MS배지 무기물 농도를 조사한 결과 1/4x MS에서 1x MS까지는 무기물 농도와 비례하여 세포 성장량이 증가하였다 (Figure 3). 1x MS 처리구에서 생체중과 건물중이 156.9 g L⁻¹와 7.7 g L⁻¹로 가장 높았으며, 2x MS 처리구의 경우 생체중과 건물중이 45.8 g L⁻¹과 3.5 g L⁻¹로 성장량이 급격히 감소하였다. 생체중, 건물중 결과와 달리 생체중에 대한 건물중 비율은 1/4x MS, 1/2x MS, 1x MS에서 큰 차이를 보이지 않은 반면, 2x MS 처리구에서 7.64%로 50% 이상 증가하였다. 배지의 수분포텐셜은 세포가 배지로부터 물과 무기양분을 흡수, 이용하는데 영향을 준다 (Gueon et al. 2001). 따라서 2x MS 처리구의 경우 배지 내에 존재하는 고농도의 염에 의해 생리적 가뭄의 한 가지 형태인 수분포텐셜이 낮아져 세포가 배지로부터 세포분열과 팽창에 필요한 수분 흡수가 억제되어 성장량 감소와 함께 세포 내 수분 감소



Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, 5% level.

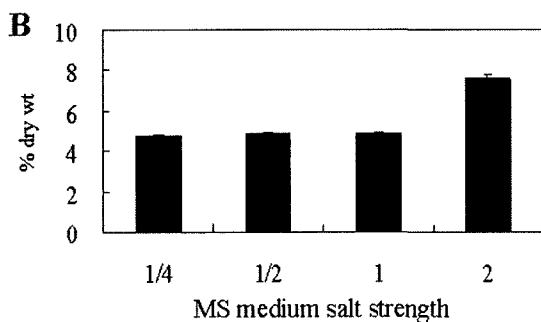


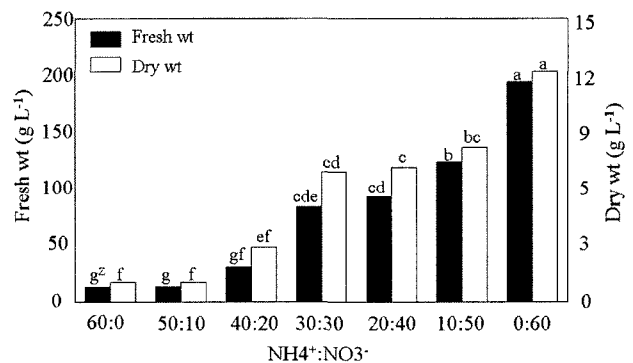
Figure 3. Effect of medium salt strength on cell growth of *G. sylvestre* after 3 weeks in culture. A, Fresh and dry weight. B, Percent dry weight.

로 인한 상대적인 저장양분의 비율 증가로 인하여 생체중에 대한 건물중 비율이 증가한 것으로 생각되었다.

질소원 비율

NH₄⁺:NO₃⁻ 비율이 *G. sylvestre* 세포생장에 미치는 영향을 조사한 결과 배지 내 NO₃⁻ 비율이 높아질수록 생체중과 건물중이 증가하였다 (Figure 4). NO₃⁻ 단용 처리시 생체중과 건물중이 191.5 g L⁻¹와 12.6 g L⁻¹로 가장 높았고, NH₄⁺ 비율이 높았던 처리구의 생체중과 건물중은 NO₃⁻ 단용 처리구에 비하여 25% 이하로 크게 감소하였다. 배양 3주 후 세포들은 배지 내 NO₃⁻ 비율이 높아질수록 크기가 작고 백색을 나타내었으며, NO₃⁻ 단용 처리구의 경우 세포의 크기가 NH₄⁺:NO₃⁻ 비율이 20:40 처리구의 1/2 이하로 관찰되었다. 또한 배지 내 NH₄⁺ 비율이 높았던 처리구의 세포일수록 세포들이 짙은 갈색을 나타내며 덩어리지고 경화되는 것을 관찰할 수 있었다 (data not shown).

일반적으로 배지 내 전체 질소원 중 NO₃⁻를 기준으로 NH₄⁺ 비율이 낮을수록 세포의 질소 이용률이 증가된다 (Hdider et al. 1994). 따라서 상대적으로 배지 내 NO₃⁻ 비율이 높은 처리구들의 경우 단기동안 탄 처리구들에 비하여 배지로부터 흡수한 NO₃⁻를 바로 세포 분열과 확장에 이용하여 세포 성장량이 증가한 것으로 생각되었다. 또한 NH₄⁺ 단용 처리시 세포가 배지로부터 NH₄⁺ 공급원을 흡수하면서 수소이온을 방출하여 배지가 산성으로 변하고 (Behrend and Mateles 1975) 그로 인하여 Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ 등과 같은 양이온의 흡수가 억제 (Leidi et al. 1991)되어 세포 성장량이 감소한 것으로 보인다. Zhong와 Wang (1998)은 배지 내 NH₄⁺ 비율이 높을 경우 상대적으로 선호도가 낮은 질산태 질소의 흡수가 억제된다고 하였으며, Wakiuchi 등(1971)과 Bryne와 Hasek (1979)도 배지 내 NH₄⁺가 많으면 수산화 이온과 결합하여 독성을 가진 NH₃



Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, 5% level.

Figure 4. Effect of NH₄⁺:NO₃⁻ ratio on cell growth of *G. sylvestre* after 3 weeks in culture.

를 형성하여 세포의 성장을 억제시킨다고 보고하였다. 또한 Ahn 등 (2003)도 배지 내 높은 NH_4^+ 농도가 NH_4^+ 대사 작용과 관련 있는 glutamate 생합성 효소의 활성에 영향을 미치고, 배지의 pH를 낮추기 때문에 세포 성장에 필수적인 특정 효소의 활성을 감소시켜 세포 성장을 억제시킨다고 가정하였다. 하지만 NO_3^- 단용으로 장기간 세포배양을 할 경우 배지의 pH 상승, 음이온 흡수억제와 같은 문제점들이 발생하게 되며 (Park et al. 1998), 이러한 현상들은 세포 성장량을 점차 감소시킨다 (Lee 2005). Fonseka 등 (1997)도 NH_4^+ 와 NO_3^- 를 단용으로 사용하는 것보다 두 형태를 함께 사용 할 때 세포 내 흡수율이 높게 나타난다고 보고하여 세포배양의 경우 질산태질소와 암모니아태질소를 함께하여 사용하는 것이 연속배양에 바람직하다고 보고하였다. 따라서 *G. sylvestre* 세포를 연속 배양할 경우 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 를 20:40으로 함께하여 사용하는 것이 안정적인 세포 성장량 확보를 위해서 효과적이라고 판단되었다.

실제 세포가 배지로부터 흡수한 무기원소들의 양을 알아보고자 배양 3주 후 배지 내 남아있는 무기원소들의 양을 확인하였다. 그 결과 NH_4^+ 와 NO_3^- 의 양은 초기 주입한 양과 비례하는 유의차를 나타내었으며, P의 경우는 생장이 많이 이루어진 처리구에서 상대적으로 적은 양이 남아 있었다. 본 실험에서는 NO_3^- 의 공급원으로 KNO_3 를 사용하였으므로 배지 내에 남아있는 K의 양은 NO_3^- 양과 동일한 유의차 수준으로 존재하였으며, Ca과 Mg은 모든 처리구에서 큰 차이를 나타내지 않았다 (Table 1). 이는 세포의 생장이 진행됨에 따라 당인산, ATP, 핵산, 인지질 및 여러 가지 보조 효소의 구성성분으로 P이 소모되어 배지에서 세포로의 흡수가 많이 이루어졌기 때문으로 생각되었다. Ca, Mg 이온 역시 세포 생장이 많이 이루어진 처리구에서 배지에서 세포로의 흡수가 많이 이루어져 배지 내에 상대적으로 적은 양이 남아있었으나 다량 원소인 N, P, K에 비하여 세포 성장시 적은 양을 필요로 하여 (Gueon et al. 2001), *G. sylvestre* 세포배양의 경우 배양기간이 짧고 초기에 주입해준 양이 충분하여 배양 3주 후 배지 내 남아있는 양이 큰 차이를 나타내지 않은 것으로 생각되었다.

Table 1. Mineral contents in the medium as affected by nitrogen ratio after 3 weeks in culture.

$\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (mM)	NH_4^+ (mg L ⁻¹)	NO_3^- (mg L ⁻¹)	P (mg L ⁻¹)	K (mg L ⁻¹)	Ca (mg L ⁻¹)	Mg (mg L ⁻¹)
60:0	852.9 a ²	19.3 g	0.25 ab	172.9 g	93.9 c	39.1 ab
50:10	740.3 b	144.4 f	0.28 a	537.0 f	104.5 ab	40.1 a
40:20	587.1 c	200.4 e	0.18 bc	756.3 e	108.6 a	39.1 ab
30:30	409.9 d	314.8 d	0.13 bd	1121.9 d	104.6 ab	37.6 ab
20:40	248.4 e	395.1 c	0.08 d	1336.7 c	99.4 bc	38.5 ab
10:50	116.3 f	490.2 b	0.10 cd	1643.7 b	104.4 ab	38.6 ab
0:60	178.0 g	572.9 a	0.14 cd	1827.9 a	98.2 bc	36.6 b

²Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, 5% level.

적 요

배지 내 식물생장조절물질, 무기물 농도, 질소원 비율이 *G. sylvestre* 세포배양에 미치는 영향을 알아보고자 실험을 수행하였다. 1.0 mg L⁻¹ 이상 2,4-D 처리시 세포 성장량이 급격히 감소한 반면, 0.5 mg L⁻¹ 이하 kinetin 처리구들은 세포 성장량이 큰 차이가 없었다. 따라서 *G. sylvestre* 세포배양의 경우 2,4-D 1.0 mg L⁻¹와 kinetin 0.1 mg L⁻¹를 함께 사용하는 것이 세포 성장량 증대에 효율적이라고 판단되었다. 무기물 농도가 *G. sylvestre* 세포 성장량에 미치는 영향을 조사한 결과 1x MS에서 세포 성장량이 가장 높았으며, 배지 내 무기물 농도가 1x MS 이상일 경우 배지의 낮은 수분포텐셜로 인해 세포 생장이 크게 억제되었다. $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 비율이 0:60에서 가장 높은 성장량을 나타내었으나 세포의 크기가 작고 백색을 나타내었으며 연속배양시 성장량이 점차 감소하므로, *G. sylvestre* 세포를 연속 배양할 경우 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ 를 20:40으로 사용하는 것이 효과적이라고 생각되었다.

사 사

본 과제 (결과물)는 교육인적자원부, 산업자원부, 노동부의 출연금으로 수행한 최우수실험실지원사업의 연구결과입니다.

인용문헌

- Ahn JK, Lee WY, Park SY (2003) Effect of nitrogen source on the cell growth and production of secondary metabolites in bioreactor cultures of *Eleutherococcus senticosus*. Kor J Plant Biotechnol 30: 301-305
- Ananthan R, Baskar C, NarmathaBai V, Pari L, Latha M, RamKumar KM (2003) Antidiabetic effect of *Gymnema montanum* leaves: effect on lipid peroxidation induced oxidative stress in experimental diabetes. Pharm Res 48: 551-556
- Ashok Kumar HG, Murthy HN, Paek KY (2002) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Gymnema sylvestre*. Plant Cell Tiss Org Cult 71: 85-88
- Attard EG, Scicluna-Spiteri A (2001) *Ecballium elaterium*: an in vitro source of cucurbitacins. Fitoterap 72: 46-53
- Behrend J, Mateles IR (1975) Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. Plant physiol 56: 584-589
- Bryne TG, Hasek RF (1979) Poinettia leaf injury associated with NH_4^+ fertilization and low soil pH. Flor Rev 165: 65-68
- Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Rakariyatham N (2005) Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. Food Chem 92: 491-497
- Choudhury BP (1988) Assessment and conservation of

- medicinal plants of hubaneswar and its neighbourhood. Indigenous Medicinal Plants, Today and Tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi, pp 211-219
- Fonseka HD, Asanuma KI, Ichii M (1997) Changes in nitrate reductase activity of leaf and nitrogen distribution with growth in potato plants. *Jap J Crop sci* 65: 669-674
- Garcia G, Tagliaferro P, Ferri A, Evangelista AM, Duffard R, Brusco A (2004) Study of tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons in neonate rats lactationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Neurotoxicol* 25: 951-957
- Gopi C, Vatsala TM (2006) In vitro studies on effects of plant growth regulators on callus and suspension culture biomass yield from *Gymnema sylvestre* R. Br. *Afr J Biotechnol* 5: 1215-1219
- Gueon DY, Park YI, Jun SS, Jin CD, Hong YN (2001) Plant physiology. In: Hopkins WG, (eds), Introduction to plant physiology, Eulyoo publishing company Ltd, Seoul, pp 69-86
- Hdider CH, Vezina LP, Ahn CH (1994) Short-term studies of NO_3^- and NH_4^+ uptake by micropropagated strawberry shoots cultured with or without CO_2 enrichment. *Plant Cell Tiss Org Cult* 37: 185-191
- Khosroushahi AY, Valizadeh M, Ghasempour A, Khosrowshahli M, Naghdibadi H, Dadpour MR, Omile Y (2006) Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biology International* 30: 262-269
- Kim GW, Kim CG, Park YG, Soo WY, Soon SH, Soon JG, Shim GB, Ahn YH, Eun JS, Lee YB, Lee JS, Lee CH, Lim HT, Jung JD, Ji SY, Hahn BH, Hahn EJ, Hang P (2003) Plant tissue culture. In: Paek KY, (eds), Plant tissue culture - technology, Hyang moon sa, Seoul, pp 59-63
- Kim YS (2002) Production of ginsenosides through bioreactor cultures of adventitious roots in ginseng (*Panas ginseng* C.A. Meyer). PhD thesis, Chungbuk National University, Cheongju
- Komalavalli N, Rao MN (2000) In vitro micropropagation of *Gymnema sylvestre* - A multipurpose medicinal plant. *Plant Cell Tiss Org Cult* 61: 97-105
- Lee EJ (2005) Effect of chemical and physical environment on cell culture of *Gymnema sylvestre*. MS thesis, Chungbuk National University, Cheongju
- Leidi EO, Silberbush M, Lips SH (1991) Wheat growth as affected by nitrogen type, pH and salinity. I. Biomass production and mineral composition. *J Plant Nut* 14: 235-246
- Lim JN (2000) Methods of plant analysis. In: Lim JN, (eds), Methods of soil and plant analysis, National institute of agricultural science and technology, Seoul, pp 139-140
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Narayan MS, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N (2005) Interplay of growth regulators during solid-state and liquid-state batch cultivation of antocyanin cell line of *Daucus carota*. *Proc Biochem* 40: 351-358
- Park CH, Seong NS, Paek KY, Lee CH (1998) Micropropagation through callus culture in chinese foxglove (*Rehmannia glutinosa*). *Kor J Plant Tiss Cult* 25: 171-175
- Rokem JS, Goldberg J (1985) Secondary metabolites from plant cell suspension cultures: methods for yield improvement. In: Mizrahi A, Van Wezel AL, (eds), Advances in Biotechnological Processes, Ed 4, Alan R. Liss. Inc., New York, pp 241-274
- SAS Institute (1989) SAS / STAT User's Guide, Ed 4, Vol. 6, SAS Inst., Cary, NC
- Satdive RK, Abhilash P, Fulzele DP (2003) Antimicrobial activity of *Gymnema sylvestre* leaf extract. *Fitoterapia* 74: 699-701
- Selvanayagam ZE, Gnanavendhan SG, Chandrasekhran P, Balakrishna K, Rao RB (1995) Plants with antisnake venom activity - a review on pharmacological and clinical studies. *Fitoterapia* 65: 99-111
- Taguchi G, Yoshizawa K, Kodaira R, Hayashida N, Okazaki M (2001) Plant hormone regulation on scopoletin metabolism from culture medium into tobacco cells. *Plant Sci* 160: 905-911
- Wakiuchi N, Matsumoto H, Takahashi E (1971) Changes of some enzyme activities of cucumber during ammonium toxicity. *Plant Physiol* 24: 248-258
- Wu JY, Wong K, Ho KP, Zhou LG (2005) Enhancement of saponin production in *Panax ginseng* cell culture by osmotic stress and nutrient feeding. *Enzyme Microb Tech* 36: 133-138
- Xie JT, Wang A, Mehendale S, Wu J, Aung HH, Dey L, Qiu S, Yuan CS (2003) Antidiabetic effects of *Gymnema yunnanese* extract. *Pharm Res* 43: 323-329
- Zhang YH, Zhong JJ, Yu JT (1996) Enhancement of ginseng saponin production in suspension culture of *Panax notoginseng*. manipulation of medium sucrose. *J Biotechnol* 51: 49-56
- Zhong JJ, Bai Y, Wang SJ (1996) Effects of plant growth regulators on cell growth and ginsenoside saponin production by suspension cultures of *Panax quinquefolium*. *J Biotechnol* 45: 227-234
- Zhong JJ, Wang SJ (1998) Effects of nitrogen source on the production of ginseng saponin and polysaccharide by cell cultures of *Panax quinquefolium*. *Proc Biochem* 33: 671-675

(접수일자 2006년 4월 26일, 수리일자 2006년 6월 4일)