

## 지황의 현탁배양에서 체세포배 형성에 관여하는 요인분석과 체세포배의 Encapsulation

박주현 · 박상언 · 채영암\*

### Studies on Proper Medium for Somatic Embryogenesis in Suspension Culture of *Rehmania glutinosa* and Encapsulation of Somatic Embryos

Ju-Hyun Park, Sang-Un Park and Young-Am Chae\*

**ABSTRACT** : This study was conducted to find the factors affecting somatic embryogenesis in suspension culture of *Rehmania glutinosa* and investigate the possibility of artificial seed production by encapsulation of somatic embryos. Linsmeier-Skoog medium was appeared as proper for somatic embryogenesis. Sucrose with 3~5% as carbon sources was good for somatic embryogenesis, and both ammonium and nitrate nitrogen were necessary for normal somatic embryo production. BA with NAA or kinetin with NAA were better than the use of cytokinin alone for both somatic embryogenesis and numbers of somatic embryos. AgNO<sub>3</sub> as protectant for vitrification of seedlings in vitro culture had no harmful effect on somatic embryos. Sphericity of encapsulated seeds was good at 3% gel of sodium alginate but germination was better at 2.5% sodium alginate level. Artificial seeds were germinated and developed normal shoots and roots under in vitro condition.

Key words : 지황, 현탁배양, 체세포배, Sodium alginate, Encapsulation, 인공종자

지황은 우리나라에서 오래 동안 재배하여 온 중요한 생약재의 하나로 수요가 계속 증가하고 있다. 그러나 지황은 뿌리나누기로 번식하기 때문에 번식력이 3~5배로 극히 낮다. 또한 번식용 종근은 수확 후 움저장으로 저장하여 이듬 해 봄에 종묘로 사용하고 있다. 그러나 저장하는 동안 병원균의 오염율이 커서 재배에 많은 어려움을 주고 있다.

지황 엽육조직에서 multiple shoot를 유도하여 대량증식(Matsumoto et al, 1986)과 頂莖培養에 의한 무병주 생산(Nishioka et al, 1988)에 관한 보고가 있지만 대량증식 체계는 아직 확립되

지 못하고 있다. 이와 관련하여 체세포배를 효율적으로 유도하기 위한 배발생 캘러스의 유도과 식물체 재생에 관한 연구 결과를 발표한 바 있다(채, 박, 1993). 인공종자는 무성번식을 통한 종묘의 대량 증식 방법의 하나로 과거 10년 동안에 상당한 발전을 하여왔다. 이러한 발전은 토양 조건에서는 극히 적지만 기내에서는 상당한 빈도로 식물체 재생이 가능하기 때문에 체세포배의 이용을 높일 수 있었기 때문이었다.

처음으로 보고된 인공종자는 셀러리에서 다배성인 체세포배를 encapsulation시킨 것을 보고한 것이고(Kitto and Janick, 1982) 단체세포배를

\* 서울대학교 농학과-농업생물신소재연구센터(Department of Agronomy and Research Center for New Biomaterials in Agriculture, Suwon 441~744, Korea)

encapsulation시킨 것은 갑종 알팔파에서였다(Redenbaugh et al, 1984). 알팔파와 셀러리의 체세포배는 sodium alginate로 encapsulation시켰다(Redenbaugh et al, 1986). 현재 피복재료는 sodium alginate와 polyoxyethylene이 주종을 이루고 있는데 Sodium alginate로 encapsulation시킨 당근 인공증자의 발아율은 45%라고 보고하였다(Jain, 1987).

알팔파, 셀러리 및 당근 인공증자를 배양기 내에서 토양 mix에 파종한 경우 좋은 재생을 보였으나 Lutz 등(1985)은 셀러리의 체세포배는 계통에 따라 재생율에 차이가 있다고 하였다. Redenbaugh 등(1987)은 토양에서 재생은 encapsulation시킬 때 배양액에 sucrose와 항생제를 첨가하여 성장상에서 배양한 경우에만 재연성이 있다고 하였다.

이번 논문에서는 현탁배양으로 체세포배를 대량 생산하는데 관여하는 배지조건 등을 조사분석하고, 생산된 체세포배를 encapsulation시켜 인공증자화가 가능한지를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 체세포배 형성에 관여하는 요인

현탁배양용 캘러스 유도에는 막 전개한 잎 조직을 0.5% sodium hypochlorite에 15분간 표면소독한 후 BA 4mg/ℓ과 NAA 0.5mg/ℓ을 첨가한 MS 배지에 치상하여 배발생 캘러스를 유도하였다. 유도된 배발생 캘러스를 잘게 부수어 60mesh의 체를 통과시킨 캘러스를 현탁배양용 시료로 사용하였다. 100 ml 삼각플라스크에 배양액 20ml, 시료 3ml를 가하여 현탁배양하였다. 교반속도는 100rpm으로 하였고 배양조건은 형광등을 광원으로 사용하여 1000 lux의 16시간 일장과 25°C에서 배양하였다.

현탁배양에서 체세포배 형성이 잘되는 배지를 선정하기 위하여 B<sub>5</sub>, LS, MS 및 White 배지 등 4개 배지를 공시하여 조사하였다. 현탁배양에서 체세포배 형성에 미치는 탄소원의 종류와 농도를 알기 위하여 sucrose, fructose, glucose, lactose 및 maltose를 각각 3%로 공시하여 실험하였다. 한편

선정된 탄소원은 1, 3, 5, 7, 9%의 농도별로 제시 함하여 적정 농도를 찾고자 하였다.

체세포배 형성에 관여하는 질소원의 영향을 파악하기 위하여 암모니아태 질소와 질산태 질소의 비율을 달리하여 적정 비율과 농도를 찾고자 하였다.

시료 유지와 공급면에서 볼 때 어느 정도의 계대배양 회수가 적합한지를 알아보고자 배양 회수에 따른 체세포배 형성 정도를 실험하였다.

Polyamines이 체세포배 형성을 증가시킬 수 있는지를 알기 위하여 putrescine, spermidin 및 spermine의 농도를 달리하여 MS 고형배지에서 배 발생율과 치상조직당 평균 성숙배의 수를 조사하였다. Putrescine, spermidine 및 spermine을 각각 5, 10, 25 및 50mg/ℓ의 농도로 처리하였다. 한편 polyamines이 기존의 성장조절제에 비하여 효과가 있는지를 알기 위하여 BA, kinetin 및 NAA와의 조합 처리 결과와 비교분석하였다.

기내 증식묘에서 발생하는 vitrification을 억제하기 위하여 질산은을 이용할 때 이 질산은이 체세포배 형성에 영향을 미치는지 알고자 농도를 5, 10, 25 및 50mg/ℓ로 처리하여 배 형성율과 성숙배의 수를 조사하였다.

### 2. 체세포배의 encapsulation과 인공증자의 저장 및 발아시험

기내에서 형성된 체세포배를 파종과 재배에 이용하기 위해서는 체세포배를 적당한 재료로 싸서 인공증자화하여야 한다. 본 실험에서는 앞의 MS 고형배지에서 형성시킨 자엽기의 체세포배를 공시재료로 사용하였다.

배유의 역할을 할 수 있도록 하기 위하여 half-strength(1/2X) MS 기본배지에 alginate를 녹여서 alginate의 농도가 2.0, 2.5 및 3.0%가 되도록 하였다. 이 용액에 체세포배를 담근 후 tip의 내경이 약 3mm인 자동피펫으로 0.1M CaCl<sub>2</sub> 용액에 한방울씩 떨어뜨린 다음 30분간 경과시켜 알진산 캡슐을 씌웠고, 그 후 1/2X MS 배지로 세척하여 잔존의 CaCl<sub>2</sub>를 제거하였다.

Encapsulation 시킨 인공증자의 발아시험은 1/2X

MS(3% sucrose, 0.8% agar)가 든 시험관에 인공 종자를 넣고 25°C, 16시간 조명하에서 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 체세포배 형성에 관여하는 요인

현탁배양에서 체세포배 형성에 영향을 미치는 배지를 조사한 결과 표 1에서 보는 것과 같이 어뢰형과 자엽기의 체세포배 형성은 B<sub>5</sub> 배지보다는 LS나 MS 배지에서 좋았고, 이 중에서도 LS 배지가 MS 배지보다 낫은 것으로 생각되었다. 반면 White 배지에서는 어뢰형 단계 이후의 체세포배는 형성되지 않았다.

Table 1. Effect of basal media on somatic embryo development in culture of *Rehmannia glutinosa* after 3 weeks.

Basal media	Stages of somatic embryo development			
	Globular	Heart	Torpedo	Cotyledon
B <sub>5</sub> (Gambrog et al)	24± 8*	15±2	7±1	6±1
LS(Linsmaier-Skoog)	36± 12	17±5	16±3	13±4
MS(Murashige-Skoog)	33± 11	21±8	15±5	11±5
White	21± 6	13±1	-	-

\* : number of somatic embryo± S.D

- : no response

현탁배양시 체세포배 형성에 영향을 미치는 탄소원의 영향을 조사한 결과는 표 2에서와 같이 fru-

Table 2. Effect of carbon source on somatic embryo development in suspension culture (LS medium with 1mg/ℓ BA) of *R. glutinosa* after 3 weeks.

Basal media	Stages of somatic embryo development			
	Globular	Heart	Torpedo	Cotyledon
Fructose	19± 6*	11±4	-	-
Glucose	29± 8	12±3	8±3	7±4
Lactose	17± 5	12±3	-	-
Maltose	15± 3	10±1	-	-
Sucrose	36± 12	17±5	16±3	13±4

\* : number of somatic embryo± S.D

- : no response

ctose, lactose 및 maltose를 사용한 경우는 어뢰형 단계 이후의 체세포배는 전혀 형성되지 못하였다. Sucrose와 glucose 사용시는 어뢰형과 자엽기의 체세포배가 형성되었고 특히 sucrose는 glucose보다 2배 정도 체세포배 형성 효과가 있었다.

LS 배지에서 sucrose 농도를 달리하여 체세포배 형성에 미치는 영향을 조사한 결과 표 3에서 보는 것과 같이 sucrose 3%와 5%에서는 자엽기의 체세포배가 13~15개로 1%나 7%의 6~7개보다 2배 정도 많았다. 따라서 자엽기의 체세포배 형성에 적합한 sucrose 농도는 3%로 하는 것이 바람직한 것을 알 수 있었다.

Table 3. Effect of sucrose concentration on somatic embryo development in suspension culture (LS medium with 1mg/ℓ BA) of *Rehmannia glutinosa* after 3 weeks.

Sucrose concentration(%)	Stages of somatic embryo development			
	Globular	Heart	Torpedo	Cotyledon
1	13± 4*	15±5	6±2	7±2
3	36± 12	17±5	16±3	13±4
5	38± 9	18±7	16±5	15±5
7	29± 6	15±4	13±3	6±1
9	38± 8	18±4	-	-

\* : number of somatic embryo± S.D

- : no response

현탁 LS 배지에서 질소원을 달리하여 체세포배 형성을 조사한 결과는 표 4와 같이 암모니아태 질소를 첨가하지 않아도 어뢰형이나 자엽기의 체세포배 형성에 영향을 주지 않아 암모니아태 질소의 영향은 거의 없는 것으로 나타났다. 또한 질산태 질소를 배로 증가시킨 경우 체세포배 형성에 뚜렷한 증가를 보이지 않았다. 결론적으로 암모니아태 질소와 질산태 질소의 비율을 413(mg/ℓ) : 3800(mg/ℓ)으로 하였을 때 체세포배 형성 수가 제일 많았으나 경비 절감 차원에서 볼 때 암모니아태 질소와 질산태 질소의 비율을 413(mg/ℓ) : 1900(mg/ℓ)로 하는 것이 바람직하다고 판단되었다.

Table 4. Effect of subcultured callus on somatic embryo development in suspension culture (LS medium with 1mg/l BA) of *R. glutinosa* after 3 weeks.

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> : KNO <sub>3</sub> (mg/l)	Stages of somatic embryo development (mg/l)			
	Globular	Heart	Torpedo	Cotyledon
1650 : 1900	36± 12*	17± 5	16± 3	13± 4
825 : 1900	34± 12	19± 5	17± 3	15± 5
413 : 1900	37± 11	21± 8	15± 5	15± 4
0 : 1900	28± 9	19± 7	13± 3	12± 4
1650 : 3800	26± 8	16± 4	13± 4	12± 8
825 : 3800	36± 11	19± 9	14± 3	15± 5
413 : 3800	33± 9	20± 7	17± 6	18± 7
0 : 3800	29± 21	14± 3	14± 3	13± 3

\* : number of somatic embryo± S.D

현탁배양에서 계대배양 회수에 따른 체세포배 형성율을 조사한 결과 표 5와 같이 계대배양 3회까지는 체세포배 형성에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 불필요하게 계대배양 회수를 증가시킬 필요는 없다고 본다. 계대배양 회수 증가에 따른 체세포배 형성 저하 문제는 캘러스의 저온 저장으로 해결할 수 있을 것으로 생각된다.

잎을 치상조직으로 사용하였을 때 체세포배 형성율과 형성 수에 영향을 미치는 BA와 NAA의 효과를 표 6에서 보면 BA 단독보다는 NAA를 혼용

Table 5. Effect of subcultured callus on somatic embryo development in suspension culture (LS medium with 1mg/l BA) of *R. glutinosa* after 3 weeks.

Subcultures	Stages of somatic embryo development			
	Globular	Heart	Torpedo	Cotyledon
1st	36± 12*	17± 5	16± 3	13± 4
2nd	37± 12	19± 5	13± 3	11± 5
3rd	35± 11	15± 8	13± 5	10± 4
4th	38± 9	17± 7	11± 3	9± 4
5th	36± 8	16± 4	10± 4	7± 8

\* : number of somatic embryo± S.D

할 때 보다 효과적이었으며 이 효과는 BA의 농도가 높을 수록 더 크게 나타났다. 따라서 BA와 NAA를 사용할 것이라면 BA 4mg/l에 NAA 0.1mg/l로 혼용 처리하는 것이 배발생율을 높이는 동시에 체세포배 수도 많아져서 이 농도가 가장 바람직하다고 생각되었다.

Table 6. Effect of BA and NAA on percentage embryogenesis and mean number of mature embryos from leaf of *Rehmannia glutinosa* on solid MS medium.

Growth regulators (mg/l)	Embryogenesis (%)	Mean No. of mature embryos/Explant
BA 1	20	2.1± 0.3
BA 1+NAA 0.1	40	7.4± 1.3
BA 2	20	1.7± 0.4
BA 2+NAA 0.1	45	8.8± 1.1
BA 4	20	3.4± 0.5
BA 4+NAA 0.1	55	11.5± 2.1

체세포배 형성률과 형성 개수에 미치는 Kinetin과 NAA의 효과를 표 7에서 보면 kinetin 단독 처리 보다는 NAA와 혼용하는 것이 배 발생에 효과적이었다. Kinetin의 농도가 높아갈수록 혼용처리 효과가 뚜렷하였다. 같은 cytokinin에 속하지만 표 6과 7을 비교하여볼 때 kinetin보다는 BA의 효과가 좋은 것으로 생각되었다.

Table 7. Effect of kinetin and NAA on percentage embryogenesis and mean number of mature embryo from leaf of *Rehmannia glutinosa* on solid MS medium.

Growth regulators (mg/l)	Embryogenesis (%)	Mean No. of mature embryos/Explant
Kinetin 1	15	1.6± 0.3
Kinetin 1+NAA 0.1	35	5.8± 1.1
Kinetin 2	15	2.3± 0.5
Kinetin 2+NAA 0.1	40	7.4± 1.2
Kinetin 4	15	2.7± 0.4
Kinetin 4+NAA 0.1	50	9.5± 1.9

체세포배 형성율과 형성 수에서 가장 좋았던 MS 배지에 BA 4mg/ℓ와 NAA 0.1mg/ℓ 처리를 대조구로 하여 polyamines 효과를 비교 분석한 것을 표 8에서 보면 putrescine 보다는 spermidine과 spermine이 효과적이었으며 이 중에서도 spermine 10mg/ℓ에서 치상 조직당 체세포배 형성율이나 형성 개체 수가 많았다. 이 결과는 체세포배 형성을 효과적으로 생산하는데 이용될 수 있을 것이다.

Table 8. Effect of polyamines on percentage embryogenesis and mean number of mature embryos from leaf of *Rehmannia glutinosa* on solid MS medium.

Polyamines (mg/ℓ)	Embryogenesis (%)	Mean No. of mature embryos/Explant
Control	55	11.5±2.1
Putrescine	5	13.4±1.9
	10	14.3±1.6
	25	12.1±1.4
	50	13.5±1.8
Spermidine	5	15.3±1.6
	10	17.7±2.5
	25	17.5±2.1
	50	15.3±1.8
Spermine	5	17.1±2.1
	10	19.4±3.6
	25	15.6±1.8
	50	14.9±2.5

Control : MS medium + 4mg/ℓ BA + 0.1mg/ℓ NAA

질산은은 표 9에 나타난 결과와 같이 대조구에 비해 배 형성율이나 성숙배의 수에 있어서 효과가 있는 것으로 생각되었다. 특히 질산은 10mg/ℓ 처리에서는 배 형성율이 15% 증가하였을 뿐만 아니라 성숙배도 3개가 더 많았다. 따라서 기내묘에 발생하는 vitrification은 질산은을 첨가함으로써 체세포배 형성과 치상조직당 성숙배의 수에 영향을 주지않거나 오히려 증가시키는 조건에서 해결

될 수 있다고 생각된다.

Table 9. Effect of AgNO<sub>3</sub> on percentage embryogenesis and mean number of mature embryos from leaf of *Rehmannia glutinosa* on solid MS medium.

AgNO <sub>3</sub> (mg/ℓ)	Embryogenesis (%)	Mean No. of mature embryos/Explant
0	55	11.5±2.1
5	60	13.4±1.9
10	70	14.3±1.6
25	65	12.1±1.4
50	65	13.5±1.8

## 2. 체세포배의 encapsulation과 인공종자의 저장 및 발아

인공종자의 구형도에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 10과 그림 1A에서와 같이 alginic acid의 농도 3%에서 구형도가 87%로 가장 높았다. 이보다 농도가 낮을 경우는 구형이 되지않고 흘러 떨어지거나 구형 형태가 형성되지 않았다.

Table 10. Effect of concentrations of alginic acid on sphericity of artificial seed from encapsulation of somatic embryos in *Rehmannia glutinosa*.

Conc. (%)	2.0	2.5	3.0
Sphericity(%)	33	57	87

인공종자의 발아실험 결과는 표 11과 그림 1B에서와 같이 alginic acid의 농도 2.5%에서는 100% 발아하였으나 구형 형성이 좋았던 3%에서는 88%가 발아하였다. 인공종자의 구형 형성율과 발아율을 높이기 위해서는 sodium alginate의 농도와 처리 시간을 조절하므로써 가능할 것이다. 그림 1C에서 보는 것과 같이 인공종자는 정상적으로 shoot와 rooting이 되었다.

인공종자의 발아와 식물체 재생은 아직은 거의 대부분이 실험실 수준에 머물고 있으나 체세포배

## 적 요

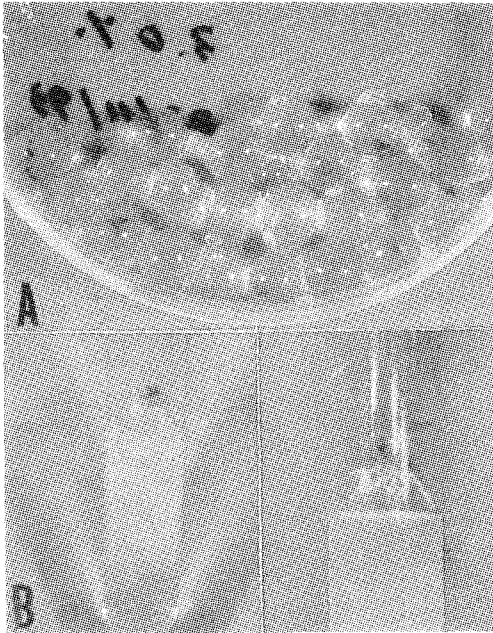


Fig. 1. Artificial seed(encapsulated somatic embryos) of *Rehmannia glutinosa* and it's germination.

A : Encapsulation of somatic embryos with alginate gel

B : Germinating artificial seed

C : Development of shoot and root

의 지지물에 영양분과 항생제 등의 적절한 배합과 encapsulation 물질의 개발이 뒤따르게 된다면 기내 조건의 토양에서 발아과정을 거쳐 포장에서 재배도 가능해질 것으로 기대해 볼 수 있다.

Table 11. Effect of concentrations of alginic acid on germination rate of artificial seed from encapsulation of somatic embryos in *Rehmannia glutinosa* after 3 weeks.

Conc. (%)	2.0	2.5	3.0
Germ.rate(%)	75	100	88

현탁배양으로 체세포배를 대량 생산하는데 관여하는 요인 들을 조사분석하고, 생산된 체세포배를 encapsulation시켜 인공종자화가 가능한지를 검토한 결과를 요약하면 아래와 같다.

1. 현탁배양에서 LS(Linsmeier-Skoog) 배지가 어뢰형과 자엽기의 체세포배 형성율이 높았다.
2. 현탁배양시 체세포배 형성에 영향을 미치는 탄소원은 sucrose가 가장 효과적이었다. Glucose에서도 자엽 기의 체세포배가 형성되었으나 sucrose에서보다는 적었다. Fructose, lactose 및 maltose는 효과가 없었다.
3. 현탁 LS 배지에서 sucrose 농도는 3%가 체세포배 형성에 적합한 농도로 나타났다.
4. 현탁 LS 배지에서 질소원을 달리하여 체세포배 형성율을 조사한 결과 암모니아태 질소의 영향은 거의 없는 것으로 나타났다. 또한 암모니아태 질소와 질산태 질소의 비율을 413(mg/l) : 1900(mg/l)로 하는 것이 바람직하다고 판단되었다.
5. 현탁배양에서 계대배양 3회까지는 체세포배 형성에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 불필요하게 계대배양 회수를 증가시킬 필요는 없다고 본다.
6. 고형배지에서 체세포배 형성율과 형성 수에는 BA 단독보다는 NAA를 혼용하는 것이 효과적이었으며 이 효과는 BA 농도가 높은 경우에 크게 나타났다.
7. 고형배지에서 체세포배 형성율과 형성 수에는 kinetin 단독보다는 NAA와 혼용하는 것이 바람직하며 이 효과는 kinetin의 농도가 높은 경우가 좋았다.
8. 고형배지에서 체세포배 형성율과 형성 수에는 polyamines 중에서 spermidine과 spermine이 효과적이었으며 spermine 10mg/l 처리에서 가장 많은 체세포배가 형성되었다.
9. 기내묘에서 발생하는 vitrification을 억제시키기 위하여 질산은을 처리하더라도 체세포배 형성이나 형성율에 별다른 영향이 없었다.

10. 체세포배를 encapsulation 할 때 인공종자의 구형 형성은 sodium alginate 농도를 3%로 한 경우 가장 좋았으나 인공종자의 발아율은 2.5%에서 100% 발아가 되었고 3%에서는 88%가 발아하였다.
11. 인공종자는 발아하여 정상적으로 성장하면서 shoot와 root를 형성하였다.

## 인용문헌

1. Chae Y.A. and S.U. Park. 1993. Callus induction and somatic embryogenesis in suspension culture of *Rehmania glutinosa*. Kor. J. Medicinal Crop Sci. 1(2) : 184~190.
2. Jain S. 1987. Induction and encapsulation of somatic embryoids in carrot. Plant Phys. 83 : 914(suppl).
3. Kitto S. and J. Janick. 1982. Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos. Hortscience 17 : 448.
4. Lutz J.J. Wong, J. Rowe, D. Tricoli and R.L. Jr. 1985. Somatic embryogenesis for mass cloning of crop plants. In 'Tissue Culture in Forestry and Agriculture' ed. Henke et al, pp 105. Plenum Press
5. Matsumoto M., M. Nakano, Y. Shoyoma, I. Nishioka. 1986. New vegetative propagation method of *Rehmania glutinosa*. Shoyakugaku Zasshi 40 : 193~197.
6. Nishioka I. 1988. Clonal multiplication of medicinal plant by tissue culture. Shoyakugaku Zasshi 42 : 1~11.
7. Redenbaugh K., J. Nichol, M.E. Kossler and B. Paasch. 1984. Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. In Vitro 20 (3) : 256~257.
8. Redenbaugh K., B.D. Paasch, J.W. Nichol, M.E. Kossler, P.R. Viss and K.A. Walker. 1986. Somatic seeds-encapsulation of asexual plant embryos. Biotechnology 4(9) : 797~801.
9. Redenbaugh K., D. Slade, P. Viss and J. Fujii. 1987. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. Hortscience 22 : 803~809.