

## 지황의 액체배양에서 탄소원·질소원 및 pH가 직접 체세포배 형성에 미치는 영향

채영암\* · 박주현\*

### Effects of Carbon, Nitrogen Sources and pH on Direct Somatic Embryogenesis in Liquid Culture of *Rehmannia glutinosa* Lib.

Young Am Chae\* and Ju Hyun Park\*

**ABSTRACT** : Basic informations for direct somatic embryo formation in *Rehmannia glutinosa* Lib. were obtained in 500ml erlenmyer flask. The ratio of ammonium to nitrate nitrogen of 825 (mg/l) : 1900 (mg/l) was proper condition for somatic embryo formation from stem and petiole explants and 3% sucrose was the most effective carbon source. Full strength MS medium with 2mg/l BA was better than LS medium for somatic embryogenesis. The initial pH 5.7 of medium (full strength MS with 2.0mg/l BA and 0.1mg/l NAA) was good for embryo production. Potassium ion was taken up rapidly within 2 weeks, while Ca<sup>+</sup> and Mg<sup>+</sup> ion contents were almost constant during culture period. Sucrose hydrolysis occurred throughout the culture, while glucose and fructose were absorbed simultaneously from the third week of culture.

**Key words** : *Rehmannia glutinosa*, direct somatic embryo, nitrogen and carbon sources, medium pH, sucrose hydrolysis, ion uptake.

## 서 언

지황 (*Rehmannia glutinosa* Lib.)은 현삼과에 속하는 다년생 초본식물로 우리나라에서는 오래 전부터 뿌리를 한약재로 이용하여 오고 있다. 지황은 전형적인 영양번식작물로서 번식이 분근(分根) 또는 어린 뿌리로 이루어지기 때문에 증식률이 낮을 뿐만 아니라 번식용 뿌리를 저장하는 동안 병원균에 의한 감염과 발병율이 높다. 현재 전국적으로

143 ha가 재배되고는 있으나 매년 많은 양이 중국에서 수입되어 국내시장에 유통되고 있는데 그 수입 약재의 바이러스 감염율이 또한 매우 높은 것으로 보고되었다 (Paek et al., 1998). 이러한 상황에 비추어 볼 때, 우리 나라 약용작물이 국제적으로 경쟁력을 갖추기 위해서는 무병 우량 종묘를 재배하여 건전한 수확물을 생산하는 것이 중요하다.

병원균의 감염을 방지하고 무균적으로 대량증식을 할 수 있는 방법의 하나로 체세포배 발생을 통한 방법을 생각할 수 있다. 지황을 대상으로 켈러스의

\* 서울대학교 농학과 (Department of Agronomy, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea)

< '98. 9. 22接受 >

현탁배양에서 체세포배 형성이 보고되었으나 (Park et al., 1995), 이 때 캘러스를 통한 체세포배 형성에서는 체세포클론 변이가 문제될 수 있다 (Preil, 1990). 이러한 점을 극복하기 위하여 치상 조직으로부터 직접 체세포배를 형성시키고자 하는 실험이 이루어지고 있다 (Park and Chae, 1997).

본 연구는 지황을 대상으로 생물반응기 (bioreactor)에서 직접 체세포배를 대량생산하기 위한 기초자료를 마련하고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

공시 재료로는 지황 (*R. glutinosa* Lib.)의 종자 유래 기내식물체를 식물 성장조절제가 첨가되지 않은 MS 고체배지 (3% sucrose, 1.2% agar)에 4주 간격으로 계대배양하여 이용하였다.

### 1. 질소원과 탄소원의 종류 및 농도 결정

MS 배지에 첨가되는 질소원으로  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 와  $\text{KNO}_3$ 의 양을 각각 0 : 1900, 413 : 1900, 825 : 1900, 1650 : 1900, 1650 : 950, 1650 : 475, 1650 (mg/l) : 0 (mg/l)로 첨가한 액체배지를 500ml 삼각 플라스크에 150ml씩 넣고, 0.5~1.0cm 크기의 줄기와 엽병 조직을 90개씩 접종 후, 각각 4주간 배양하여 체세포배 발생을 조사하였다. 직접 체세포배 발생에 적합한 탄소원과 그 농도를 결정하기 위해서는 자당 (sucrose)과 포도당 (glucose)을 각각 1, 3, 5%로 첨가하여 질소원 결정에서와 동일한 조건으로 4주간 배양하여 체세포배 발생률을 조사하였다.

### 2. 배지의 종류와 농도 결정

MS (Murashige and Skoog, 1962), LS (Linsmaier and Skoog, 1965) 배지의 농도를 각각 half strength (1/2X), full strength (1X)로 달리한 배지에 BA를 각각 1.0, 2.0, 5.0 및 10.0 mg/l로 단용 처리 후, 4주간 배양하여 직접 체세포배 발생률을 조사하였다.

또한 1X의 MS 액체 배지에 BA (1, 2, 4mg/l)와 NAA (0.1, 0.5, 1.0mg/l)를 각각 조합 처리하여 4주간 배양 후, 직접 체세포배 발생률을 조사하였다.

### 3. pH의 영향 조사

배지의 적정 pH를 결정하기 위해 BA 2.0 mg/l와 NAA 0.1 mg/l가 첨가된 MS 액체 배지의 멸균하기 전 pH를 각각 4.7, 5.7, 6.7로 조정하여 4주간 배양 후, 체세포배의 수를 조사하였다.

### 4. 배지 내 이온 및 당 성분의 변화 측정

앞의 실험을 수행하면서 1주일 간격으로 시료를 채취하여  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  이온의 함량변화를 atomic absorption spectroscopy로 조사하였다.

배양 기간 중 배지 내 자당, 포도당 및 과당 (fructose)의 농도 변화를 조사하기 위하여 BA 2mg/l가 첨가된 MS (3% 자당) 액체 배지에 지황의 줄기 조직 90개를 접종하여 배양 개시 1주, 2주, 3주, 4주, 5주 쯤 각각 배지를 교환해 주고, 회수된 배지는 HPLC를 이용하여 성분을 분석하였다.

## 결과 및 고찰

지황의 잎절편을 직접 체세포배 발생을 위한 재료로 사용할 경우 그 기간이 길고 (Park and Chae, 1997), 배양기간 중 절편이 커짐에 따라 배양 후 수확 과정에 어려움이 있어 그와 같은 문제점을 해결하고자 줄기와 엽병을 접종조직으로 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

### 1. 배지 내 질소원의 비율

배지 내의 질산태 질소와 암모니아태 질소의 농도 변화가 직접 체세포배 발생에 미치는 영향 조사에서  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  :  $\text{KNO}_3$ 의 비율을 825 : 1900 (mg/l)로 한 경우, MS배지에 일반적으로 첨가되는 양인  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1650mg/l :  $\text{KNO}_3$  1900mg/l로 처리했을 경우와 비교할 때 체세포배 발생률에서 차이가 없었다 (Table 1). 이는 암모니아태 질소를 반으로 줄여도 직접 체세포배 형성에 지장이 없다는 것을 보여주는 결과로 비용절감 측면에서 바람직하다고 생각되었다. 이에 비해 암모니아태 질소의 비율이 상대적으로 높아지거나, 질산태 질소원의 비율이 낮아질수록 직접 체세포배 발생이 저해되는 것으로 나타나 지황의 직접 체세포배 발생에는 질산태 질소가 주요 질소원으로 이용됨을 알 수 있었다.

Table 1. Effect of  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  to  $\text{KNO}_3$  ratio on direct somatic embryogenesis of *R. glutinosa* after 4 weeks of liquid culture<sup>†</sup>.

$\text{NH}_4\text{NO}_3$ (mg/l)	$\text{KNO}_3$ (mg/l)	Direct somatic embryogenesis
0	1900	+
413	1900	+
825	1900	++
1650	1900	++
1650	950	+
1650	475	-
1650	0	-

<sup>†</sup> MS basal medium supplemented with 2.0 mg/l zeatin and 1.0mg/l IAA was used in this experiment. - : poor, + : fair, ++ : good.

## 2. 직접 체세포배의 발생에 효율적인 탄소원의 종류와 농도

배지 내에 첨가되는 탄소원으로 자당 (sucrose) 과 포도당 (glucose) 을 각각 1, 3, 5 %로 처리하여 4주간 배양한 후 체세포배의 발생양상을 조사한 결과는 표 2와 같다. 자당의 경우 대조구 (3%)에 비해 농도가 낮거나 높은 실험구에서 직접 체세포배의 발생이 저조하였고, 포도당의 경우에는 전반적으로 직접 체세포배의 발생율이 자당에 비해 저조하였는데 특히 5%의 경우 체세포배는 거의 생성되지 않아 이와 같은 결과를 종합하여 볼 때 적정 탄소원으로서 자당의 농도를 3%로 하는 것이 적합함을 알 수 있었다 (Table 2). 백합 (*Lilium*) 자구의 기내 생산 실험에서는 자당의 농도를 3, 9, 12%로 처리하였을 때 농도가 높아짐에 따라 kinetin의 활력을 억제하여 자구의 생산을 감소시켰으나 (Takayama and Misawa, 1982), 생산된 자구의 생장에는 6~9%의 자당 농도에서 가장 좋았다고 보고되어 (Takayama et al., 1991) 지황의 직접 체세포배 생산이나 이후 생장 등에 있어서도 적합한 자당의 농도에는 차이가 있을 것이므로 앞으로 이에 대한 검토가 이루어져야 할 것으로 생각되었다.

## 3. 적정 배지의 종류와 농도

지황의 직접 체세포배 발생효율을 높이는데 대

Table 2. Effect of carbon sources on direct somatic embryogenesis of *R. glutinosa* after 4 weeks of liquid culture.<sup>†</sup>

Carbon source (%)	Somatic embryogenesis	
Sucrose	1	+
	3	++
	5	+
Glucose	1	+
	3	+
	5	-

<sup>†</sup> MS basal medium supplemented with 2.0 mg/l zeatin and 1.0mg/l IAA was used in this experiment. - : poor, + : fair, ++ : good.

한 배지의 종류와 농도의 영향을 알아보기 위하여 MS배지와 지황의 간접체세포배 발생에 효과적으로 보고 (Park et al., 1995) 된 LS (Linsmaier and Skoog, 1965) 배지의 염농도를 각각 1/2X, 1X로 달리하고 여기에 BA를 각각 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mg/l로 처리한 후, 4주간 배양한 결과는 표 3과 같다. LS 배지에서는 1/2X와 1X 배지 사이에 직접 체세포배 형성에 차이가 없었고, MS 배지에서는 BA를 10mg/l 처리한 경우를 제외한 전 실험구에서 체세포배가 비슷한 양상으로 형성되어 염농도에 따른 뚜렷한 차이를 볼 수 없었다. 특히 1X MS에 BA를 2.0 mg/l로 처리한 경우 체세포배 형성이 보다 양호하여 체세포배의 생산에 적합한 것을 알 수 있었다. 배지의 염농도와 관련하여, Takayama 등 (1991)은 백합의 자구 생산에서 1/2X MS 배지에서는 자구 형성이 촉진되었고, 1X와 2X일 때 자구 형성은 저해되고, 캘러스가 형성되었다고 보고하였다.

MS배지에서 직접 체세포배의 형성에 있어 BA와 NAA의 혼용 효과를 알아보기 위한 실험 결과, BA를 1 mg/l로 처리한 실험구의 평균 체세포배의 수는 5.02개로서 BA를 2 mg/l로 한 경우의 평균 4.93개와 큰 차이가 없었다 (Table 4). 또한 BA 1 mg/l에 NAA를 0.5 mg/l 조합 처리한 경우 체세포배의 수는 5.30개로 BA 2 mg/l에 NAA를 0.1 mg/l로 조합 처리한 경우의 5.31개와 차이가 없었다. 이에 비해 BA 농도를 4 mg/l로 높였을 경우에

는 NAA도 0.5 mg/l 로 높였을 경우에만 체세포배의 수가 5.24개로 비슷한 결과를 보였다. 그러나 배양시의 비용 질감 측면에서 볼 때, BA 1 mg/l 와 NAA 0.5 mg/l 의 조합이 가장 적절한 것으로 판단되었다.

Table 3. Effect of medium and strength on direct somatic embryogenesis of *R. glutinosa* after 4 weeks of liquid culture.

Media	BA	Somatic embryogenesis
1/2 X LS	1.0	+
	2.0	+
	5.0	-
	10.0	-
1 X LS	1.0	+
	2.0	-
	5.0	-
	10.0	-
1/2 X MS	1.0	+
	2.0	+
	5.0	+
	10.0	-
1 X MS	1.0	+
	2.0	++
	5.0	+
	10.0	-

- : poor, + : fair, ++ : good.

Table 4. Effect of BA and NAA concentrations on direct somatic embryogenesis of *R. glutinosa* after 4 weeks of liquid culture.

Hormone		No. of somatic embryos
BA(mg/l)	NAA(mg/l)	
1	0.1	4.79±0.85
	0.5	5.30±1.18
	1.0	4.98±1.34
2	0.1	5.31±1.38
	0.5	4.79±0.84
	1.0	4.69±1.09
4	0.1	4.62±0.74
	0.5	5.24±1.79
	1.0	4.75±1.20
MS+Zeatin 2.0 mg/l +IAA 1.0 mg/l		4.64±0.86

#### 4. 배지의 적정 pH

지황의 직접 체세포배 발생에 대한 pH의 영향을 조사하고자, 멸균 전 배양액의 pH 수준을 달리하여 배양한 결과 pH 5.7이 효과적인 것으로 나타났다 (Table 5). 그러나 당근에서는 체세포배 생산을 위해 생물반응기에서 배양했을 때 pH를 지속적으로 4.3으로 일정하게 조정해 준 경우 pH를 5.8로 일정하게 고정한 경우보다 생산된 심장형 체세포배의 수가 3배 정도 많았고, 어뢰형이나 자엽기胚로의 발달을 억제시켜 동조화(synchronization)에 기여할 수 있었다는 보고 (Veronique et al., 1994)가 있었다. 배양기간 중 배지의 pH는 상당한 변화가 있으므로 배지 멸균 전에만 pH를 조정할 것이 아니라 배양 전 기간에 걸쳐 일정하게 유지시키는 보완 실험이 필요할 것으로 생각되었다. 이러한 보완 실험을 통해 적정한 조건이 결정된다면 직접 체세포배 생산에서의 동조화뿐만 아니라, 간접 체세포배 발생에서도 동조화에 일반적으로 이용되는 mesh를 이용하는 방법 (Warren and Fowler, 1977)이나 원심분리를 이용하는 방법 (Fujimura and Komamine, 1979) 등과 혼용한다면 효율을 높일 수 있을 것이다.

Table 5. Effect of initial pH on direct somatic embryo production of *R. glutinosa* after 4 weeks of liquid culture.

pH	4.7	5.7	6.7
No. of somatic embryos	3.55±0.93	5.0±1.03	3.97±1.2

#### 5. 배지내 성분 변화

지황의 직접 체세포배 발생을 위한 액체 배양에서 배양 기간별 K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 이온의 흡수 양상을 살펴본 결과, Ca<sup>2+</sup>이온과 Mg<sup>2+</sup>이온은 거의 변동이 없는데 반해 K<sup>+</sup>이온은 배양기간 중 지속적으로 흡수되는 것으로 나타났다 (Fig. 1). *Camellia japonica* 잎의 부위에 따른 체세포배 발생 양상을 비교한 실험에서는 Na<sup>+</sup>이온과 K<sup>+</sup>이온의 평형 관계가 배발생 부위에서는 배양기간 중 평형을 이루는데 반해 비배발생 부위에서는 농도가 심하게 변동하여 세포 내 Na<sup>+</sup>이온과 K<sup>+</sup>이온의 평형이 체세포

배 발생에 중요한 역할을 하며, 특히 K<sup>+</sup> 이온의 수준과 밀접한 관련이 있었다는 보고 (Christina and Salome, 1995)로 미루어 볼 때, 지황의 직접 체세포배 발생에서도 K<sup>+</sup> 이온의 역할이 큰 것으로 판단되었다.

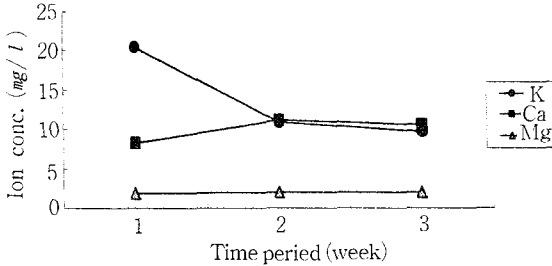


Figure 1. Changes of K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ion contents in liquid medium during somatic embryogenesis of *R. glutinosa*. Initial pH was adjusted to 5.7.

배양기간 중 배지 내 당 성분의 변화는 자당의 경우 배양 후 1주부터 감소하기 시작하여 3주째에는 거의 고갈되었고, 자당으로부터 유리된 과당과 포도당은 3주째에 가장 많이 축적된 이후로는 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 이러한 현상은 당근을 재료로 생물반응기에서 체세포배를 생산하는 실험에서도 보고된 바 있다 (Veronique et al., 1994). 즉, 배지의 pH를 4.3으로 유지했을 경우 자당은 배양 13일째에 완전히 고갈되었고, 이 때 포도당과 과당의 흡수가 시작되었다. 당근의 경우에는 pH를 5.8로 조정했을 경우 sucrose는 배양 기간에 걸쳐 가수분해되어 과당과 포도당의 농도

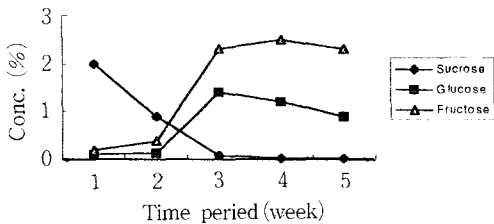


Figure 2. Changes of carbon sources in the medium during direct somatic embryogenesis of *R. glutinosa* in liquid culture. Initial pH was adjusted to 5.7.

는 배양 15일째까지 증가하다가 이후 줄어드는 등 pH에 따라 자당의 흡수 양상에 차이를 보였다고 보고되었는데 (Veronique et al., 1994), 이 결과 중 pH를 4.3으로 고정시킨 경우가 pH를 5.7로 고정시킨 지황에서의 결과와 비슷한 경향을 보였다.

## 적 요

지황 (*Rehmannia glutinosa*)에서 종근 저장시 나타나는 병원균의 오염을 배제하면서 종묘를 대량 증식시키는 방법을 개발하기 위하여 액체 배양을 통해 직접 체세포배를 형성하고자 할 때 요구되는 배지, 질소원, 탄소원 및 pH와 배양 기간 중 배지의 성분 변화를 조사하였다. 줄기나 엽병을 접종조직으로 할 경우, 배지내 질소원인 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>와 KNO<sub>3</sub>의 적정비율은 825 mg/l : 1900 mg/l 이었고, 탄소원으로는 자당이 적합하였으며, 적정 농도는 3% 이었다. 배지로는 1X MS 배지가 적합하였고, 적정 BA 농도는 2.0 mg/l 였는데, NAA와 조합하였을 경우에는 BA 1 mg/l 에 NAA를 0.5 mg/l 를 조합한 배지와 BA 2.0 mg/l 에 NAA를 0.1 mg/l 로 첨가한 배지가 체세포배 발생에 효과적이었다. 멸균 전에 pH를 5.7로 조정할 경우에 직접 체세포배의 형성에 효과적이었다. 배양기간 중 배지 내 Ca<sup>2+</sup>와 Mg<sup>2+</sup>이온은 거의 변화가 없었으나, K<sup>+</sup>이온은 많이 흡수되었다. 배양 3주째에 자당은 거의 고갈되었고, 과당과 포도당은 3주째부터 흡수되기 시작하였다.

## LITERATURES CITED

- Christina P. M. and P. M. Salome. 1995. Factors controlling somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43 : 147 - 154.
- Fujimura T. and A. Kommamine. 1979. Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Physiology* 64 : 162 - 164.
- Linsmaier E. M. and F. Skoog. 1955. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. *Physio. Plant.* 18 : 100 - 127.

- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473 - 497.
- Paek K. Y., K. J. Yu and S. I. Park. 1998. Comparison of growth characteristic and virus infection between tissue-cultured plants and conventionally propagated plants of *Rehmannia glutinosa* Lib. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 6 : 62 - 69.
- Park J. H., S. U. Park and Y. A. Chae. 1995. Studies on proper medium for somatic embryogenesis in suspension culture of *Rehmannia glutinosa* and encapsulation of somatic embryos. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 3 : 100 - 106.
- Park J. H. and Y. A. Chae. 1997. Effects of growth regulators and explants on direct somatic embryogenesis in liquid culture of *Rehmannia glutinosa*. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 5 : 289 - 293.
- Preil, W. 1990. Application of bioreactors in plant propagation and gene transfer systems. *In* : "Micropropagation (Debergh P. and Zimmerman R. H. ed.)". Kluwer Academic Press. pp. 427 - 448.
- Takayama S., B. Swedlund and Y. Miwa. 1991. Automated propagation of microbulbs of lilies. *In* : "Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 8, (I. K. Vasil ed.)". Academic Press. pp. 112 - 131.
- Takayama S. and M. Misawa. 1982. Regulation of organ formation by cytokinin and auxin in *Lilium* bulb scales grown in vitro. *Plant Cell Physiology* 23 : 67 - 74.
- Veronique J., G. Simone and C. Jean-Claude. 1994. Bioreactors studies of the effect of medium pH on carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36 : 205 - 209.
- Warren G. S. and M. W. Fowler. 1977. A physical method for the separation of various stages in the embryogenesis of carrot cell culture. *Plant Science Letters* 9 : 71 - 76.