

지황과 현삼에서 배양전 저장 온도와 기간이 직접 체세포배 형성에 미치는 영향

박주현* · 송지숙* · 옥현충* · 임완상* · 채영암**

Effects of Storage Temperatures and Periods on the Direct Somatic Embryogenesis in *Rehmannia glutinosa* Liboschitz and *Scrophularia buergeriana* Miquel

Ju Hyun Park*, Ji Sook Song*, Hyun Choong Ohk*, Wan Sang Lim*
and Young Am Chae**

ABSTRACT : The effects of storage temperature and periods as prerreatments on direct somatic embryogenesis or shoot development in liquid culture of leaves, stems and petioles of *Rehmannia glutinosa* and *Scrophularia buergeriana* were investigated. Proper storage temperature for *Rehmannia glutinosa* was 8°C and the leaf stock could be stored up to 12 weeks. In *Scrophularia buergeriana*, shoots were developed from the 20 week-stored petiole and stem at 8°C. In general, 8°C was considered the most effective storage temperature in terms of storage cost.

Key words : *Rehmannia glutinosa*, *Scrophularia buergeriana*, stem, leaf, petiole, cold storage, direct somatic embryogenesis.

서 언

지황 (*Rehmannia glutinosa*) 은 우리 나라에서 오래 동안 재배하고 이용하여 온 중요한 생약재의 하나로 매년 수요가 증가되고 있다. 지황은 뿌리로 번식하기 때문에 증식율이 낮다. 또한 번식용 종근을 옮겨장하였다가 봄에 심기 때문에 문제가 되고 있는 병원균의 오염을 제거하고, 대량 증식하는 효율적인 한 방법으로 현탁배양을 통한 체세포배 형

성을 생각할 수 있다 (Redenbaugh et al., 1987).

현삼 (*Scrophularia buergeriana*) 은 현삼과에 속하는 다년생 초본으로 중요 약용작물 중의 하나로 괴근에 여러 성분을 함유하고 있어 소염, 인후염, 비염, 변비 등에 약효가 있는 것으로 알려져 있다 (육, 1990).

지황과 현삼에서 직접 체세포배 형성에 미치는 식물생장조절제와 치상조직의 영향에 대한 보고 (박과 채, 1997) 에 의하면 이들 작물에서 직접 체세포배 형성을 통하여 대량 번식이 가능한 것으로 판

* 서울대학교 농업생명과학대학 농학과 (Department of Agronomy, Seoul National University, Suwon, Korea 441-744) < 38, 10, 12 접수 >

** 농업생물신소재연구센터 (Research Center for New Biomaterials in Agriculture, Seoul National University, Suwon, Korea 441-744)

단되었다.

그러나 연중 간단없이 균일하고 우수한 종묘를 공급하기 위해서는 단기간 내에 종묘를 생산하기 위한 자료의 확보가 중요하다. 초저온 저장은 여러 작물에서 보고되었다(Seitz et al., 1983; Caruso et al., 1987; Augereau et al., 1986; Chen et al., 1984). 그러나 Hiraoka and Komada (1984), Augereau 등 (1986) 및 Caruso 등 (1987) 은 이 방법은 극히 제한적으로만 이용 가능하기 때문에 오히려 이러한 초저온보다는 생육을 지연시키는 5~15℃ 정도의 저온에 저장하는 것이 바람직하다고 제안하였다.

본 연구에서는 지황과 현삼을 대상으로 하여 배양 시료의 장기 저장과 저장 후 액체 배양을 통한 체세포배 형성과 재생의 효율성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 저장용 재료 양성

지황 종자는 70% 알콜로 1분간 소독한 후 2% sodium hypochlorite로 15분간 표면 소독한 다음 멸균수로 3회 세척하여 기내에서 발아시켰다. 발아한 유식물은 고체 MS 배지에서 증식시켜 실험 재료로 사용하였다.

현삼 종자는 0.25% sodium hypochlorite 용액에 15분간 표면 살균한 후, 멸균수로 4~5회 세척하여 MS 기본 배지 (3% sucrose, 0.8% agar)에서 발아시켰다. 발아한 유식물은 고체 MS 배지에서 무균적으로 증식시켜 실험 재료로 사용하였다.

2. 액체 배양과 직접 체세포배 형성 및 재생

기내에서 양성한 지황 식물체의 줄기, 엽병 및 잎 등으로 구분하여 잘라, 각 조직 절편을 페트리 접시에 놓고, 각각 4℃와 8℃ 생장상에서 저장한 후, 4주 간격으로 꺼내 MS 기본 배지에 IAA 1.0 mg/l 와 Zeatin 2.0 mg/l 가 첨가된 액체 배지에서 6주간 배양한 다음 직접 체세포배 발생을 조사하였다. 저장에 이용한 배지는 직접 체세포배 생성 조건이었던 BA 1.0 mg/l 가 첨가된 MS 고체배지였다.

현삼 기내 식물체의 줄기, 엽병 및 잎 조직을 BA 1.0 mg/l 와 IAA 0.1 mg/l 가 첨가된 MS 고체 배지에 놓고, 각각 4℃와 8℃ 생장상에서 저장한 후 4주 간격으로 꺼내 같은 호르몬 조성의 액체 배지에서 3주간 배양하여 신초의 발생을 조사하였다. 또한, 25℃에서 10일간 배양한 후 같은 조건으로 저장하여 이와 같은 전처리가 저온 저장 후 신초 발생에 영향을 주는지를 알아보았다.

액체 배양은 25℃의 16시간 조명 하에서 100ml Erlenmyer 플라스크에서 100 rpm 속도로 배양하였다. 잎은 1cm×1cm 크기로 절단하였고, 엽병과 줄기는 1cm 길이로 절단하여 배지에 치상하였다.

결과 및 고찰

지황의 줄기, 엽병 및 잎 조직을 4℃와 8℃에서 저온 저장하여 직접 체세포배와 신초의 발생을 조사한 결과, 저장하지 않고 배양한 시험구나 4℃에서 저장한 후 배양한 시험구 보다 8℃에서 저장하여 배양한 시험구에서 직접 체세포배 생성율이 높게 나타났다 (Table 1). 한편 엽병의 경우에는 저장기간이 경과하면서 각 저장온도별 체세포배 발생율이 비슷한 경향으로 저하되는 등 저장 조직간에 따른 차이도 나타났는데, 잎 절편이 12주 저장 후에도 상대적으로 높은 체세포배 발생율을 유

Table 1. Effects of storage temperature and period on direct somatic embryogenesis and shoot development from leaf, petiole, stem segments of *Rehmannia glutinosa* after 6-week culture.

| Period (weeks) | Rate of shoot development | | | | | |
|----------------------|---------------------------|----|---------|----|------|-----|
| | Stem | | Petiole | | Leaf | |
| | 4℃ | 8℃ | 4℃ | 8℃ | 4℃ | 8℃ |
| Control [†] | +++ | | ++ | | + | |
| 4 | ++ | ++ | + | ++ | ++ | +++ |
| 8 | + | ++ | + | + | + | ++ |
| 12 | + | + | + | + | + | ++ |

[†]Liquid culture without storage. + ; 1~3 somatic embryos per explant, ++ ; 4~6 somatic embryos per explant, +++ ; over 7 somatic embryos per explant.

지하는 것으로 보여 다른 조직에 비하여 장기간 저장하는데 적합한 것으로 생각되었다.

현삼의 줄기, 엽병 및 잎 조직을 전배양을 하지 않고 바로 4℃와 8℃에서 저장한 다음 4주 간격으로 꺼내어 액체 배지에서 3주간 배양하여 신초의 발생율을 살펴본 결과, 줄기와 엽병의 경우 대조구와 비교할 때 온도조건에 따른 차이는 없었으나, 잎의 경우 4℃ 조건에서는 기간이 경과할수록 신초의 발생율이 저하되었다. 또한, 엽병이나 잎의 경우 20주간 저장한 후 배양하였을 때 8℃ 조건에 저장한 시험구에서 대조구에 비해 오히려 더 나은 결과를 나타내었는데 (Table 2) 이 때 잎조직의 신초 발생율은 줄기 조직과는 비슷하였지만 엽병조직보다는 낮았다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 현삼 조직을 장기 저장하기 위해서는 8℃에 저장하는 것이 적합할 것으로 생각되었다.

Table 2. Effects of storage temperature and period on direct somatic embryogenesis and shoot development from leaf, petiole, stem segments of *Rehmannia glutinosa* after 3-week culture.

| Period (weeks) | Rate of shoot development | | | | | |
|----------------------|---------------------------|-----|---------|-----|------|----|
| | Stem | | Petiole | | Leaf | |
| | 4℃ | 8℃ | 4℃ | 8℃ | 4℃ | 8℃ |
| Control [†] | +++ | | ++ | | + | |
| 4 | +++ | +++ | ++ | +++ | + | + |
| 8 | ++ | + | ++ | ++ | - | + |
| 12 | ++ | +++ | + | +++ | - | ++ |
| 16 | + | + | + | ++ | - | + |
| 20 | ++ | ++ | ++ | +++ | - | ++ |

[†]Liquid culture without storage. +; 1~7 somatic embryos per explant, ++; 8~15 somatic embryos per explant, +++; over 16 somatic embryos per explant.

한편, 현삼의 각 조직을 25℃에서 10일간 전배양 후 저장하여 액체 배양한 결과 (Table 3) 전배양하지 않고 저장한 결과와는 달리 4℃ 조건에 저장한 시험구에서 조직 부위와 관계없이 모두 일정한 신초 발생율을 유지하였는데 줄기조직과 잎 조직에서는 4℃ 조건과 8℃ 조건간에 큰 차이는 보이지 않아 경제적인 면을 고려한다면 8℃ 조건이 적절할

것으로 생각되었다. 그러나 엽병의 경우 저장기간이 16주를 지나면서 8℃ 조건보다는 4℃ 조건에서 더욱 높은 신초 발생율을 보여 엽병조직을 전배양하여 16주 이상 장기 저장하기 위해서는 4℃ 조건에서 저장하는 것이 유리할 것으로 판단되었다.

기내 배양체를 장기 저장하기 위하여 온도를 낮추어 주는 것은 일반적으로 많이 이용되는 방법으로서 대부분의 온대성 작물은 0℃~10℃ 정도의 온도에서 저장이 가능한 반면 열대성 작물은 대개 이보다 높은 온도를 필요로 한다 (Ng & Ng, 1991). 열대성 작물인 바나나와 plantain 배양에서는 15℃에서 장기 저장이 가능하였으나 이보다 낮은 온도에서는 급격하게 악화되었다는 보고 (Banerjee and De Langhe, 1985) 와 *Xanthosoma* spp. 을 기내에서 지속적으로 저장하기 위해 9℃, 13℃, 17℃에서 실험한 결과 이들 중 몇몇 종만 13℃ 조건에서 암상태로 2년 이상 저장이 가능하였다는 보고 (Zandvoort et al., 1994) 등을 종합해 보면 저온에 대한 감수성은 부분적으로는 작물의 종류 (온대성 작물, 열대성 작물)와 연관이 있지만 역시 종 특이성이 있어 같은 현삼과인 지황과 현삼의 경우에도 저온에 대한 감수성을 나타내는 부위에 차이가 있

Table 3. Effect of storage temperature and period on direct somatic embryogenesis and shoot development from precultured leaf, petiole, stem segments of *Scrophularia buergeriana* on MS basal medium + IAA 0.1mg/l + BA 1.0mg/l in 10 days at 25℃.

| Period (weeks) | Rate of shoot development | | | | | |
|----------------------|---------------------------|-----|---------|-----|------|----|
| | Stem | | Petiole | | Leaf | |
| | 4℃ | 8℃ | 4℃ | 8℃ | 4℃ | 8℃ |
| Control [†] | +++ | | ++ | | + | |
| 4 | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ |
| 8 | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ |
| 12 | + | ++ | +++ | ++ | + | + |
| 16 | +++ | ++ | +++ | + | ++ | ++ |
| 20 | +++ | ++ | +++ | + | ++ | ++ |

[†] Liquid culture without preculture and storage. + ; 1~7 shoots per explant, ++ ; 8~15 shoots per explant, +++ ; over 16 shoots per explant.

어 저장에 적합한 부위가 달리 나타나는 것으로 판단되었다.

적 요

지황과 현삼을 대상으로 저장 온도와 기간이 직접 체세포배 발생에 미치는 영향을 조사하였다. 지황은 4℃에서 저장한 후 배양한 경우보다 8℃에서 저장하여 배양한 경우 직접 체세포배 생성율이 높았으며, 저장 조직 간에 차이가 있어, 잎이 12주간 저장 후에도 거의 일정한 체세포배 발생율을 보여 줄기나 엽병보다 장기 저장에 적합한 것으로 나타났다. 현삼의 각 조직을 전배양 없이 바로 4℃와 8℃에서 저장하였을 때, 줄기와 엽병 조직이 저장 기간의 경과와 무관하게 신초의 발생율이 유지되었는데 경제적인 면으로 볼 때 4℃ 조건보다는 8℃ 조건이 적절할 것으로 판단되었다. 한편 현삼의 각 조직을 25℃에서 10일 동안 전배양한 후에 저장하기 위해서는 줄기와 잎 조직은 8℃에서, 엽병 조직은 4℃ 조건에서 저장하는 것이 유리한 것으로 나타났다.

LITERATURES CITED

- Augereau, J. M., D. Courtois and V. Petiard. 1986. Long term storage of callus cultures at low temperatures or under mineral oil layer. *Plant Cell Report* 5 : 372 - 376.
- Banerjee, N. and E. De Langhe. 1985. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). *Plant Cell Report* 4 : 351 - 354.
- Caruso, M., L. Crespi-Perellino, L. Garofano and A. Guicciardi. 1987. Long term storage of *Vicia minor* cell culture. *In* : Plant cell biotechnology. NATO ASI series, Springer-Verlag. pp 271 - 274.
- Chen, T. H., K. K. Karhta, N. L. Leung, W. G. Kurz, K. C. Chaston, and F. Constabel. 1984. Cryopreservation of alkaloid-producing cell cultures of Periwinkle. *Plant Physiol.* 75 : 726 - 731.
- Hiraoka, N. and T. Kodama. 1984. Effect of nonfrozen cold storage on the growth, organogenesis and secondary metabolism of callus culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 3 : 349 - 357.
- Ng, S. Y. C and N. Q. Ng. 1991. Reduced-growth storage of germplasm. *In* : *In vitro* methods for conservation of plant genetic resources. ed. J. H. Dodds. Chapman and Hall, London. pp. 11 - 39.
- 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. of Medicinal Crop Sci.* 5 : 289 - 293.
- Redenbaugh, K., D. Slade, P. Viss, and J.A. Fujii. 1987. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. *HortScience* 22 : 803 - 806.
- Seitz, U., Alferman, A. W., and Reinhard, E. 1983. Stability of biotransformation capacity in *Digitalis lanata* cell cultures after cryogenic storage. *Plant Cell Report* 2 : 273 - 276.
- Zandvoort, E. A., M. J. Hulshof and G. Staritsky. 1994. *In vitro* storage of *Xanthosoma* spp. under minimal growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36 : 309 - 316.
- 육창수. 1990. 원색 한국약용식물도감. 아카데미서적, p 494.