

Fusaric acid 저항성 지황 (*Rehmannia glutinosa* Lib.) 세포주 선발 및 식물체 재분화

유창연*·김정률*·정재영*·임정대·채영암**

In vitro selection and plant regeneration from fusaric acid-tolerant Cell Lines of *Rehmannia glutinosa* Lib.

Chang Yeon Yu*, Zheng Lu Jin*, Jae Young Jeong*,
Jeong Dae Lim*, and Young Am Chae***

ABSTRACT : Callus growth of fusaric acid-tolerance cell lines was different depending on fusaric acid concentrations. But callus growth on medium with fusaric acid was higher than that on medium without fusaric acid. Especially, RF-9, RF-11 and RF-15 showed high callus growth at 100 μ M fusaric acid. After subculturing on medium without fusaric acid for 5 weeks, fusaric acid-tolerant stability was investigated. Cell lines at 10 μ M fusaric acid were showed over 60% callus growth, callus growth rate at 100 μ M fusaric acid was decreased until 30-80% of control. Regeneration capacity of fusaric acid-tolerant cell lines was different depending on fusaric acid concentrations. Thirteen cell lines regenerated the shoot over at 50 μ M fusaric acid, and only two cell lines were not regenerated.

Key words : Fusaric acid, *in vitro* selection, *Rehmannia glutinosa*

서 언

지황 (*Rehmannia glutinosa*) 은 玄蔘科에 속하는 중국 원산의 다년생 속근성 초본이다 (이창복, 1989). 지황의 뿌리와 줄기에는 catalpol, sterol, campesterol, rehmannin 등의 주요 성분이 함유되어 있으며 止血, 强心, 利尿, 血糖降下 등의 약리작용이 있다 (중국약용식물재배학, 1991). 지황은 전형적인 영양번식작물로 번식이 분근 또는 어린

뿌리로 이루어지기 때문에 증식률이 낮을 뿐만 아니라 번식용 뿌리를 저장하는 동안 병원균에 의한 감염과 발병율이 높아 집약 재배의 장애 요소가 되고 있다. 지황의 뿌리썩음병은 *Fusarium* ssp. 균에 의해 발생하는데, 지황의 품질과 수량에 큰 영향을 미치며, 7월 말부터 9월 초순 사이에 고온다습한 기후가 계속되어 배수가 잘 되지 않는 땅에서, 또는 연작하였을 때, 또는 질소 비료가 너무 많아서 경엽이 도장하였을 때 많이 발생한다. 지황에서 유관속 시들음병 (vascular wilt) 과 뿌리썩음병 (root

* 강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부 (Department of Plant Resources, Kangwon National University, Chunchon, Korea. 200 - 701)
** 서울대학교 농업생명과학대학 농학과 (Department of Agronomy, Seoul National University, Suwon, Korea 441 - 744) < '99. 5. 30 접수 >

rot disease)을 유발시키는 *Fusarium* spp.는 토양에서 서식한다. 이러한 fusarium병 방제에 가장 효과적인 수단은 저항성 품종의 이용이다 (George, 1995., Robert and Deborah, 1998). Fusaric acid는 *Fusarium oxysporum*에서 유도된 nonspecific toxin으로 세포배양에서 내병성 돌연변이 선발 및 유도에 유용하게 사용되어진다 (Driver & Kuniyuki 1984).

본 실험은 *Fusarium* spp.의 병독물질인 fusaric acid를 사용하여 지황을 현탁배양한 세포로부터 fusaric acid에 저항성인 세포주를 선발하고 선발된 세포주의 저항성 및 안정성 조사를 하고 저항성 세포주로부터 식물체 분화에 미치는 최적 조건을 구명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

Fusaric acid 저항성 세포주 선발

10 μ M fusaric acid가 첨가된 MS 배지에 2, 4-D 1mg/l를 첨가하고 5주 동안 배양된 지황의 캘러스를 현탁배양을 위해 MS 배지에 2, 4-D 1mg/l를 첨가하고 fusaric acid 농도를 5 μ M에서 50 μ M까지 증가시키면서 계대배양을 실시하였다. 배양되어진 세포는 페트리접시에 fusaric acid가 50 μ M이 첨가된 고체배지에서 배양하여 colony를 형성하는 세포주를 선발하였으며 colony 하나를 하나의 세포주로 명명하였다. 선발된 세포주를 계대배양하여 증식시킨 후 fusaric acid 농도를 0, 10, 50, 100 μ M까지 달리하여 세포주의 저항성 정도를 조사하였다. 저항성 정도는 배양 후 캘러스의 생체중을 가지고 측정하였다.

Fusaric acid 저항성 세포주의 저항성 안정성

Fusaric acid에 대한 저항성으로 선발된 세포주의 안정성을 조사하기 위하여 fusaric acid가 첨가되지 않고 2, 4-D 1 mg/l만 첨가된 MS 배지에 저항성인 cell lines들을 1개월 이상 계대배양 하였다. 계대배양된 세포주를 fusaric acid가 0, 10, 50, 100 μ M까지 농도로 첨가된 배지에서 배양한 후에 생체중을 조사하여 fusaric acid가 처리되지 않은 배지에서 증식된 캘러스와 비교하여 저항성 안정성 정

도를 측정하였다.

Fusaric acid 저항성 세포주로부터의 식물체 재분화

Fusaric acid에 저항성을 지닌 세포주로부터 완전한 식물체를 분화시키기 위하여 MS 배지에 2, 4-D 1 mg/l을 첨가하였다. 또한 fusaric acid 저항성인 세포주와 선발이 안된 감수성인 세포주를 fusaric acid가 첨가되지 않은 배지와 fusaric acid의 농도를 1, 10, 50 μ M로 달리하여 첨가된 배지에 치상하고 재분화된 개체와 생장을 조사하였다.

결과 및 고찰

Fusaric acid 저항성 세포주 선발

배양된 지황의 세포로부터 낮은 농도의 fusaric acid부터 100 μ M까지의 액체배지에서 배양함으로써 20 개의 fusaric acid 저항성 세포주를 선발하였다 (Table 1). 저항성을 지니지 않은 캘러스는 fusaric acid 10 μ M이 첨가된 배지에서 캘러스의 생장이 현저하게 억제되었으며 fusaric acid가 첨가되지 않은 배지에서의 캘러스 생장에 비해 38.3%의 생장을 하였다. Fusaric acid에 저항성으로 선발된 20 개의 세포주의 저항성 정도는 세포주에 따라 상이하였으나, 일반적으로 fusaric acid 감수성인 세포주보다 fusaric acid가 첨가된 배지에서 높은 캘러스 생장을 보였다. Fusaric acid 저항성 세포주들로 선발된 20 개 세포주들이 모두 감수성 세포주보다 10 μ M fusaric acid가 첨가된 배지에서 높은 fusaric acid 저항성을 보였으며, 9 개의 세포주는 fusaric acid가 함유되지 않은 배지에서보다 10 μ M fusaric acid가 첨가된 배지에서 캘러스 생장을 촉진하는 경향을 보였다. 50 μ M fusaric acid가 첨가된 배지에서도 fusaric acid 저항성인 세포주들은 모두 높은 저항성을 보였으며, RF-9, RF-15, RF-16의 3 개의 세포주는 110% 이상의 캘러스 생장을 보여 50 μ M fusaric acid가 함유된 배지에서도 fusaric acid가 함유되지 않은 배지에서보다 훨씬 높은 캘러스 생장을 보였고, 또한 선발된 20 개 세포주들 중 10 개 세포주들이 무처리시 보다 70% 이상의 캘러스 생장을 보였고, 10개의 세포주들이 70% 이하의 캘러스 생장을 보였다.

Table 1. Effect of fusaric acid on fresh weight of fusaric acid-tolerant *R. glutinosa* cell lines previously grown on medium including fusaric acid 10 μ M for five weeks.

Cell lines	Fusaric acid concentration (μ M)			
	0	10	50	100
	- mg/callus -	- % fresh weight of control (0 μ M) -		
R ^a	122.3	38.3	28.6	16.3
RF-1 ^b	404.4	104.3	90.4	52.4
RF-3	242.8	56.6	33.5	21.8
RF-4	187.5	88.0	55.9	47.5
RF-5	220.3	89.0	75.1	57.0
RF-6	252.8	45.1	40.9	21.7
RF-7	94.3	167.6	97.9	48.8
RF-8	307.3	50.7	42.1	35.7
RF-9	160.3	186.7	116.2	108.2
RF-10	300.8	68.8	43.9	23.1
RF-11	144.5	103.1	82.4	75.4
RF-12	275.3	134.5	88.8	38.7
RF-13	116.3	133.5	79.8	61.0
RF-14	161.7	86.2	69.7	30.9
RF-15	147.4	133.2	116.7	72.2
RF-16	171.3	115.3	112.0	49.8
RF-17	224.0	62.6	45.0	39.3
RF-18	366.2	80.5	74.4	44.0
RF-19	295.3	47.1	52.8	26.5
RF-20	216.4	124.1	35.2	18.8

^a Unselected cell line ;

^b Fusaric acid-tolerant cell line

100 μ M fusaric acid가 함유된 배지에서는 선발된 20 개의 세포주 중 4개의 세포주들이 무처리시의 60%에 달하는 캘러스 성장을 보였으며, 특히 RF-9 세포주는 무처리의 108.2%에 달하는 캘러스 성장을 보여 매우 높은 저항성을 보였다. 9개의 세포주들은 무처리의 40% 이하의 캘러스 성장을 보였다. Shahin과 Spivey (1986)는 fusaric acid를 이용하여 토마토의 세포 배양으로 fusaric acid에 대한 저항성 callus를 얻었으며, 그 저항성은 유전되었

으며 fusaric acid의 농도가 높아질수록 저항성을 보이는 개체수가 감소하였다고 보고하였다.

Fusaric acid 저항성 세포주의 저항성 안정성

현탁배양을 이용하여 선발된 세포주가 fusaric acid를 함유하지 않은 배지에서 몇 세대 계대 배양 후에도 저항성을 유지하는가를 조사하기 위하여 선발된 세포주를 fusaric acid가 함유되지 않은 MS 배지에 2, 4-D 1 mg/l 를 첨가하여 5주 동안 증식시켰다. 증식된 세포주들의 캘러스를 fusaric

Table 2. Effect of fusaric acid on fresh weight of fusaric acid-tolerant *R. glutinosa* cell lines previously grown on medium without fusaric acid for five weeks.

Cell lines	Fusaric acid concentration (μ M)			
	0	10	50	100
	- mg/callus -	- % fresh weight of control (0 μ M) -		
R ^a	122.3	38.3	28.6	16.3
RF-1 ^b	185.3	133.3	67.2	68.2
RF-3	101.5	144.8	136.0	47.1
RF-4	124.8	115.0	44.9	39.9
RF-5	229.5	61.9	48.7	22.4
RF-6	326.5	91.7	57.4	27.4
RF-7	111.5	101.6	97.1	69.8
RF-8	171.3	83.7	58.1	18.0
RF-9	242.5	150.6	67.5	51.7
RF-10	347.3	65.6	25.3	27.5
RF-11	200.0	119.4	71.5	49.9
RF-12	146.5	183.5	134.1	58.7
RF-13	150.8	100.1	41.4	47.3
RF-14	132.8	97.3	87.7	50.8
RF-15	112.3	146.0	116.0	82.8
RF-16	126.0	152.0	96.4	56.0
RF-17	247.5	62.6	43.6	18.6
RF-18	247.3	62.4	46.6	35.9
RF-19	124.3	137.4	131.4	55.3
RF-20	215.8	140.5	59.1	28.2

^a Unselected cell line, *R. glutinosa* ;

^b Fusaric acid-tolerant cell lines

acid 농도를 달리하여 첨가한 배지에서 저항성 안정성을 조사한 결과, 10 μM fusaric acid가 첨가된 배지에서 fusaric acid 저항성을 지니지 않은 세포주는 무처리에 비해 38% 캘러스 성장을 보였으나, fusaric acid 저항성으로 선발된 세포주들은 모두 저항성에서 안정성을 보였다 (Table 2). 선발된 12개의 세포주들은 fusaric acid가 첨가되지 않았을 때보다 캘러스 생장이 더 촉진되었으며, RF-5, RF-10, RF-17, RF-18의 4개의 세포주는 무처리에서 약 60%의 캘러스 성장을 보였다.

fusaric acid가 50 μM 첨가된 배지에서는 8 개의

세포주가 무처리시보다 70% 이상의 성장을 보였으며, 하나의 세포주만이 40% 이하의 캘러스 성장을 보였다. 100 μM fusaric acid 배지에서는 선발된 캘러스들이 약 20%에서 80%까지생장이 억제되었으며, Table 1의 결과와 비교하여 볼 때, fusaric acid에 저항성인 세포주도 fusaric acid가 첨가되지 않은 배지에서 계대 배양을 하면 캘러스 수준에서의 저항성 정도가 감소하는 경향을 보였다. 이러한 현상은 저항성 세포주로 선발이 되더라도 배양중에 돌연변이가 생길 수 있으며, 캘러스 덩어리는 저항성 세포와 감수성 세포가 혼재할 수 있고, 선

Table 3. Shoot regeneration from fusaric acid-tolerant and unselected *R. glutinosa* cell lines on media with different concentrations of fusaric acid after 45 days.

Cell lines	0 μM		1 μM		10 μM		50 μM	
	No. of Shoots (/calls)	Shoot Height (mm)	No. of Shoots (/calls)	Shoot Height (mm)	No. of Shoots (/calls)	Shoot Height (mm)	No. of Shoots (/calls)	Shoot Height (mm)
R ^a	2.5	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
RF-1 ^b	4.0	4.2	2.7	7.0	2.0	7.6	2.0	5.7
RF-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
RF-4	2.0	7.4	3.0	3.8	2.7	3.5	1.7	4.0
RF-5	1.0	2.7	1.3	6.6	2.0	4.5	2.0	4.1
RF-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
RF-7	0.7	3.1	1.0	2.7	1.3	1.8	1.0	3.6
RF-8	3.0	11.0	2.3	8.0	1.3	10.0	1.7	2.5
RF-9	1.3	1.4	0.3	2.2	0.7	1.3	0.3	2.0
RF-10	1.3	2.3	1.0	1.8	1.0	1.5	0.7	1.6
RF-11	5.0	7.5	4.7	7.8	4.0	8.0	3.0	7.2
RF-12	0.3	1.0	1.3	3.0	0.7	3.3	1.0	1.3
RF-13	1.7	5.2	2.0	2.5	1.7	4.2	2.0	4.8
RF-14	2.0	4.0	2.0	3.2	1.0	2.5	0.7	1.2
RF-15	2.0	3.5	0.3	1.0	1.0	3.5	1.0	2.0
RF-16	4.0	10.0	3.0	5.2	2.0	4.0	1.0	3.6
RF-17	1.0	2.3	2.3	4.3	2.0	2.9	1.0	2.3
RF-18	3.0	6.2	2.3	3.0	2.0	4.2	0.7	1.4
RF-19	3.0	3.7	1.0	2.8	0.7	2.7	2.0	2.2
RF-20	0.7	2.0	0.3	1.4	2.3	3.0	0.3	1.2

^a Unselected cell line ; ^b Fusaric acid-tolerant cell lines

발압이 들어있지 않은 배지에서 장기간 배양시 감수성인 세포가 저항성인 변이세포보다 생장이 왕성하여 감수성인 세포덩어리가 되므로 안정성에 영향을 미칠수 있는 것으로 보고되고 있다 (Meredith and Carlson, 1982; Singer and McDaniel, 1984; Yu and Cho, 1994; Yu and Masinnas, 1994).

Fusaric acid 저항성 세포주로부터의 식물체 재분화

저항성 세포주로부터 식물체를 분화시키기 위하여 20 개의 세포주들을 MS배지에 NAA 1 mg/l,

BA 2 mg/l 이 첨가된 배지에 치상하였다. 저항성 세포주들의 분화 능력은 세포주와 fusaric acid의 함유배지에 따라 상이하였다 (Table 3). Fusaric acid 감수성인 캘러스는 fusaric acid가 첨가되지 않은 배지에서 2.5 개의 줄기가 분화되었으며, 선발된 저항성 세포주인 RF-11은 5 개의 줄기가 분화되어 분화 능력이 가장 높았다. 선발된 20 개의 세포들 중 5 개의 세포주는 1.0 개미만의 줄기가 분화되었고, 그 중 RF-3과 RF-6은 분화가 되지 않았다. Fusaric acid가 10 µM 첨가된 배지에서 fusaric acid 감수성 캘러스에서 전혀 식물체가 분화되지

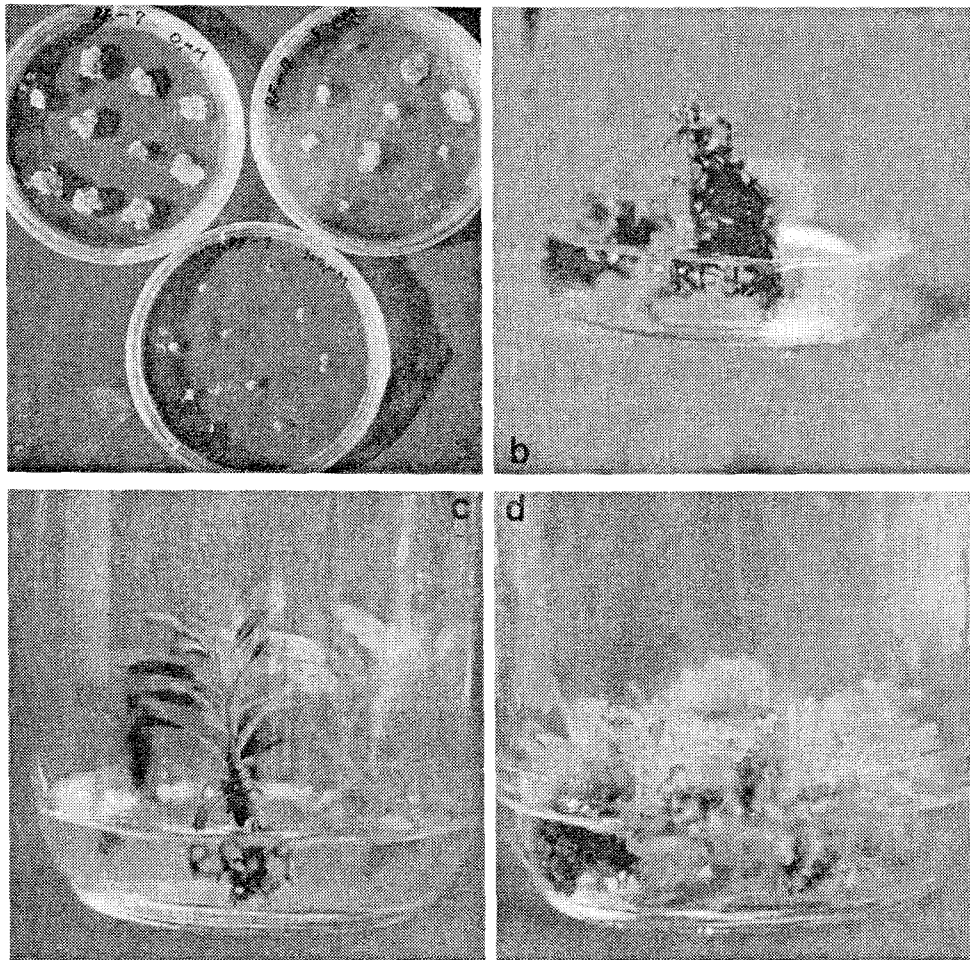


Fig. 1. The selection and regeneration of fusaric acid-tolerant cell lines of *R. glutinosa*.

A : The growth of fusaric acid-tolerant cell line, RF-7 on different medium.

B, C, D : Plants regenerated from fusaric acid-tolerant cell lines.

않았으며, fusaric acid 저항성 세포주는 식물체가 분화되었지만 줄기수는 감소하는 경향을 보였다. Fusaric acid 저항성 세포주들은 세포주에 따라 fusaric acid가 첨가된 배지에서의 줄기 분화 능력이 상이 하였다. RF-1, RF-5, RF-11, RF-13, RF-19 세포주들은 fusaric acid가 50 μ M 첨가된 배지에서 줄기가 분화되었다. Fusaric acid가 첨가된 배지에서 식물을 분화시키는 것은 분화된 식물체의 저항성 안정성을 유지시키는 데 효과적일 것이라 사료된다. 세포배양을 이용한 각종 저항성 식물체 선발 시, 특히 제초제 저항성 식물체 선발의 경우 제초제에 저항성인 세포주라 할지라도 제초제가 함유되지 않은 배지에서 식물체를 분화시키면 분화시키는 과정 중에서 캘러스의 계속된 성장과 증식에 의하여 저항성이 아닌 세포가 생기며 이 저항성이 아닌 세포로부터 분화된 식물체는 저항성을 잃게 된 보고가 된 바 있다 (Meredith and Carlson, 1982; Singer and McDaniel, 1984; Yu and Cho, 1994; Yu and Masiunas, 1994).

적 요

현탁배양에 의하여 fusaric acid 저항성인 세포주를 선발하고, 선발된 세포주들의 fusaric acid 저항성, 저항성의 안정성 및 식물체 재분화 능력을 조사하였다.

선발된 20 개의 세포주의 저항성 정도는 세포주에 따라 상이하였으나, 일반적으로 fusaric acid 감수성인 세포주보다 fusaric acid가 첨가된 배지에서 높은 캘러스 성장을 보여 높은 저항성을 나타냈으며 RF-9, RF-11, RF-15는 100 μ M에서도 70% 이상의 높은 캘러스 성장을 나타냈다. Fusaric acid가 첨가되지 않은 배지에서 5주 동안 계대 배양한 후, fusaric acid 안정성을 조사한 결과, 10 μ M에서는 모두 60% 이상의 성장을 나타냈으며, 100 μ M에서는 약 30%에서 80%까지 생장이 억제됨을 보여 농도가 높아질수록 캘러스 성장 억제 정도가 증가함을 알수 있었다. Fusaric acid 저항성 세포주들의 식물체 분화능력은 세포주에 따라 상이하였으며, 50 μ M fusaric acid 농도에서도 13개의 세포주들이

1개 이상의 줄기가 분화되었고 두개의 세포주는 분화가 되지 않았다.

LITERATURE CITED

- Driver, J. A. and A. H. Kuniyuki. 1984. *In vitro* propagation of walnut root stock. HortScience 19 : 507-509.
- George N. Agrios. 1995. Plant Pathology. pp343-346.
- Larkin, R. P. and D. R. Fravel. 1998. Effect of various fungal and bacterial biocontrol organism for control of fusarium wilt of tomato. Plant Dis. 82 : 1022-1028.
- Meredith, C. P. and P. S. Carlson. 19-82. Herbicide resistance in plant cell cultures. In : Herbicide resistance in plants. Edited by Lebaron HM, and Gressel J. eds. A Wiley-Interscience Publ. Wiley John & Sons.
- Shahin, E. A. and R. Spivey. 1986. A single dominant gene of *Fusarium* wilt resistance of portoplant-derived tomato plant. Theor. Appl. Genet. 73 : 164-169.
- Singer, S. R. and C. N. McDaniel. 1984. Selection of amitrole-tolerant tobacco calli and the expression of this tolerance in regenerated plant and progeny. Theor. Appl. Genet. 67 : 427-432.
- Yu, C. Y. and H. K. Cho. 1994. *In vitro* selection and regeneration of acifluorfen-tolerant cell lines of *Lycopersicon peruvianum* Mill. Kor. J. Breed. 26 : 129-136.
- Yu, C. Y. and J. B. Masiunas. 1994. Selection of acifluorfen-tolerant eastern black nightshade (*Solanum ptycauthum* Dun.) and the expression of this tolerance in regenerated plants and their progeny. Kor. J. Plant Tissue Culture 21 : 151-156.
- 이창복. 1989. 대한식물도감. 향문사. pp680.
- 중국약용식물재배학. 1991. 중국의학과학원 약용식물개발연구소. 농업출판사. pp1375.