

## 두릅의 葉組織培養에 의한 Callus유기 및 植物體 再分化

장 한 호\* · 박 철 호\*\* · 조 동 하\*\* · 신 영 범\*\*

### Callus Induction and Plant Regeneration from Leaf Tissue Culture of *Aralia elata* S.

Han Ho Jhang\* · Cheol Ho Park\*\* · Dong Ha Cho\*\* and Young Boum Shin\*\*

**ABSTRACT** : This study was conducted to determine the optimum culture conditions for inducing callus and regenerating plantlets from cultured leaf tissues of *Aralia elata*. Young leaf tissues(1cm) of *A. elata* plant were cultured on MS medium supplemented with 2,4-D and Thidiazuron. Embryogenic callus was induced along the leaf veins more efficiently on the medium containing 1.0mg /l Thidiazuron in 4 weeks after culture initiation. Calli were subcultured to proliferate on MS media containing 2,4-D, Dicamba, Picloram, and Thidiazuron. Callus was better proliferated on the medium containing Dicamba than on the others. However, callus subcultured on the medium containing Thidiazuron was more embryogenic and light green-colored, of which some showed embryoid-like structure on the surface. Hormone-free medium was more efficient to regenerate plantlets than media supplemented with Kinetin, BA, and Thidiazuron.

**Key word** : Callus culture, Plant regeneration, *Aralia elata* S.

두릅(*Aralia elata* S.)은 옛부터 새순을 식용산 채로, 根皮나 樹皮는 한약재로 이용해온 資源植物이다. 최근 무공해 건강식품에 대한 관심이 증대되고 농산물 개방에 대한 활로 개척의 일환으로 두릅의 자연채취 및 재배생산이 증가 추세에 있다. 중산간지가 많은 강원도 지역에 있어서 1989년에 8.2ha의 면적에 재배되었던 것이 1992년에는 72.1ha로 두릅의 재배면적이 크게 확대되었다<sup>1)</sup>. 두릅의 번식은 종자와 根插으로 가능하며 캘루스로부터의 부정아<sup>2)</sup> 및 부정배<sup>2)</sup> 형성에 의한 증식도 가능하다. 그러나 종자번식은 장기간 노천 매장을 하는데다

발아율이 낮으며<sup>1)</sup> 근삽법은 최가 가능한 根探時期가 초봄의 1~2개월에 국한되고 근의 절단이 치명적인 두릅의 입고역병의 발생원인이 되기도 하는 문제점이 있다<sup>2)</sup>. 부정아 및 부정근 형성에 의한 대량번식도 배양효율의 제고, 배양묘의 馴化 및 배양기술의 안정성 등 해결해야할 문제가 많다. 따라서 본 논문은 우리나라에 자생하는 두릅의 조직배양에 의한 효율적인 대량증식법을 확립하기 위한 기초연구로서 캘루스 誘起 및 植物體의 再分化에 대한 실험을 수행하여 얻은 결과이다.

\* 가평군 농촌지도소(Kapyoung Rural Guidance Office, Kapyoung 477-800, KOREA)

\*\* 강원대학교 농과대학(College of Agriculture, Kangwon Natl. Univ., Chuncheon 200-701, KOREA)

<'93. 8. 31 接受>

## 材料 및 方法

1992년도에 강원대학교 구내에 야생하는 두릅나무를 온실에 pot 이식하여 出芽한 새순을 공시재료로 이용하였다. 잎이 전개하기전의 1cm 내외의 新芽를 채취하여 70% Ethanol에 1분간, 5% Sodium hypochlorite에 5분간 침지 소독하여 살균수로 3회 수세한 다음 3~4개의 절편을 치상하였다. 사용배지는 MS배지에<sup>7)</sup> sucrose 30g/l, 환천 8g/l를 첨가하였고 pH는 고압 멸균전 5.8로 조절한 후, 2.2×15cm 시험관당 10ml씩 분주하였다. 캘루스誘起를 위하여 식물호르몬은 2,4-D(1, 2mg/l)와 Thidiazuron(0.1~2.0mg/l)을 첨가하였으며 캘루스증식을 위하여 2,4-D Dicamba, Picloram, Thidiazuron을 각각 4수준의 농도(0.1, 0.5, 1, 2mg/l)로 첨가한 배지에서 4주간 배양한 후 최적배지에서 2회 연속 8주동안 계대배양하였다. 재분화배지는 MS 배지에서 kinetin(0.1, 0.5, 1, 2mg/l), BA(0.1, 0.5, 1, 2mg/l) 및 Thidiazuron(0.1, 0.5mg/l)을 각각 첨가한 배지와 Hormone-free MS 배지를 사용하여 캘루스의 생체중 증가율 및 재분화율을 조사하였다. 배양온도는 25℃, 광도는 3,000Lux로 24시간 조명하였다.

## 結果 및 考察

두릅의 幼葉을 절단하여 배양한 결과 배양 4주째에 치상 절편의 葉脈을 중심으로 돌기가 형성되기 시작하였다(Fig. 1-A). 치상한 유엽편으로부터의

캘루스 유기는 表 1에 나타낸 바와 같이 Thidiazuron 첨가 배지에서 이루어졌으며 2,4-D 배지에서는 전혀 캘루스가 유기되지 않았다. 이와같은 결과는 貝守<sup>8)</sup>와 雨官<sup>2)</sup>이 2,4-D 1.0mg/l와 BA 0.1~1.0mg/l를 첨가한 배지에 두릅의 엽병을 배양하여 캘루스를 誘起한 것과 相異한 결과로서 엽조직 배양에서는 2,4-D 보다 Thidiazuron이 효과적인 것으로 나타났다. 땅두릅 *Aralia cordata*<sup>6)</sup>와 *A. continentalis*<sup>4)</sup>의 잎과 엽병조직 및 상배축과 하자엽을 각각배양한 결과 2,4-D 1.0~2.0mg/l의 첨가가 embryogenic callus의 유기 및 생장에 효과적이었다.

Thidiazuron은 Phenylurea (N-phenyl-N-(1,2,3-thidiazol-5-yl) urea)계통의 cytokinin 유사물질로서 목화의 고엽제로 사용되며 분화가 어려운 목본식물의 줄기 분화에 유효한 것으로 알려져있다<sup>10)</sup>. 본 실험에서 Thidiazuron의 농도별 캘루스 유기반응은 1.0mg/l 첨가가 70.5%로 가장 양호하였으며 저농도에서는 캘루스유기율이 비교적 저조하였다. 朴과 崔<sup>10)</sup>는 1.0mg/l의 Thidiazuron이

Table 1. Callus induction rates in young leaf culture of *Aralia elata* S

Hormone (mg/l)	No. of explants cultured	No. of explants forming callus	callus induction rate(%)
2,4-D			
1.0	45	0	0
2.0	45	0	0
Thidiazuron			
0.1	40	15	37.5
0.5	48	23	47.0
1.0	44	31	70.5
2.0	36	18	50.0

Table 2. Callus proliferation in different hormone treatment during 1 month of subculture

Hormone	Concent. (mg/l)	Callus Proliferation	Hormone	Concent. (mg/l)	Callus Proliferation
2,4-D	0.1	+	Picloram	0.1	++
	0.5	+		0.5	+
	1.0	+		1.0	+++
	2.0	+		2.0	+
Dicamba	0.1	++++	Thidiazuron	0.1	++
	0.5	++++		0.5	+
	1.0	++		1.0	++
	2.0	++++		2.0	+

+ : poor, ++ : good, +++ : excellent

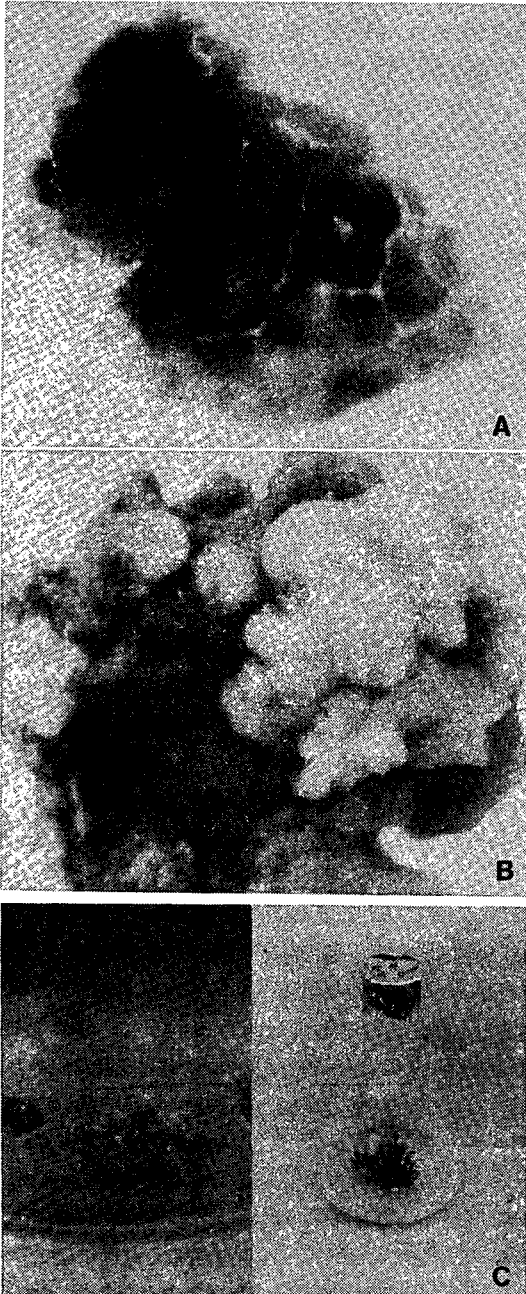


Fig. 1. Callus induction and plant regeneration from *A. elata* leaf tissues.  
 A. Callus induced from a leaf segment.  
 B. Embryoid-like structure on the surface of callus.  
 C. Regenerated plantlets from the cultured callus tissues.

첨가된 배지에서 매실나무의 미숙배를 배양하여 56.7%의 캘루스 유기율을 보고하였다. Yu<sup>12)</sup>는 *Solanum ptycanthum*과 *S.nigrum*의 조직배양에서 Thidiazuron이 BA나 IAA보다 캘루스의 형성과 Shoot의 分化 및 生長에 효과적임을 보고하였다.

幼葉片으로부터 誘起된 캘루스의 증식에는 表 2에서 보는 바와 같이 Dicamba 첨가가 가장 효과가 컸음을 알았다. 이와같은 결과는 밀<sup>3)</sup>, 메밀과 담배<sup>11)</sup>, *Atriplex hortensis*<sup>9)</sup> callus 증식에 대한 Dicamba의 효과와 유사한 경향을 나타낸 것이다. 그러나 Dicamba와 Picloram과 같은 auxin첨가배지에서 증식된 캘루스는 물기가 많고 담갈색의 non-embryogenic한 외양을 나타냈으며 Thidiazuron 첨가는 캘루스 증식속도는 늦더라도 캘루스가 부서지기 쉽고 연록색을 띠었으며 부분적으로 부정배 형상을 보인점(Fig. 1-B)으로보아 Thidiazuron을 첨가한 배지에서 embryogenic한 캘루스 유기에 효과가 있는 것으로 사료된다. Thidiazuron을 첨가한 배지에서 embryogenic한 캘루스를 통하여 체세포배가 형성된 것은 *Prunus mume*<sup>10)</sup>과 *Arabidopsis thaliana*<sup>5)</sup> 등의 조직배양에서 보고되었다.

表 3은 캘루스를 Thidiazuron 1.0mg/l 첨가배지에서 8주 계대배양한 후 재분화배지에 옮겨 4주 동안 배양을 계속한 뒤 캘루스의 생체중 증가량과 식물체 재분화의 결과를 나타낸 것이다. BA 1.0mg/l와 2.0mg/l가 첨가된 배지에서 캘루스의 생장이 양호하여 각각 52%와 62%에 달하는 생체중의 증가를 가져왔으며 Thidiazuron 0.1mg/l 첨가배지에서는 46%의 생체중의 증가를 보였다. 특히 Thidiazuron 첨가배지에서 캘루스의 장기 배양은 캘루스내부의 목질화를 초래하는 경향이 있었으므로 Thidiazuron 첨가는 캘루스 유기 및 초기 계대배양(초대배양)에 국한해야 할 것으로 사료된다. 고농도의 BA 첨가배지에서 캘루스의 지속적인 증식은 가능하나 식물체의 재분화가 전혀 이루어지지 않는 반면 호르몬이 첨가되지 않은 배지에서는 32%의 캘루스 생체중의 증가와 함께 두 개체의 식물체가 재분화되었다(Fig. 1-C). 貝守<sup>8)</sup>는 호르몬이 첨가되지 않은 배지에 엽병에서 유기한 초대배양 캘루스를 배양하여 60%의 식물체 재분화율을 보고하였다. 崔와 차<sup>4)</sup>은 Thidiazuron 0.1μ

M이 첨가된 배지에서 獨活(*Aralia continentalis* Kitagawa)의 캘루스 성장 및 shoot 분화가 가장 양호하였음을 보고하였다. 본 실험에서 재분화가 저조했던 이유는 계대배양의 횟수와 기간이 길어짐에 따라 캘루스의 재분화능이 저하되었기 때문으로 보인다<sup>8)</sup>. 이와같은 결과로 미루어 볼때 두릅의 엽조직 배양시 Thidiazuron을 사용하여 캘루스를 유기하고 초대배양한 직후에 호르몬이 첨가되지 않은 배지에서 식물체의 재분화를 시도하는 것이 적당할 것으로 사료된다.

**Table 3.** Increase of callus weight and number of plantlets regenerated from leaf-derived callus culture of *A. elata*

Hormone (mg/l)	No. of callus cultured	Mean rate of fresh weight increased(%)	No. of plantlets regenerated
Hormone-free			
	10	32.3	2
Kinetin			
0.1	10	17.3	0
0.5	10	26.9	0
1.0	10	36.3	0
2.0	10	28.6	0
BA			
0.1	10	4.6	0
0.5	10	10.2	0
1.0	10	52.4	0
2.0	10	62.2	0
Thidiazuron			
0.1	10	46.6	0
0.5	10	38.1	0

## 摘 要

本 研究는 器內에서 두릅의 잎조직배양을 통한 효율적인 種苗大量増殖體系를 확립하기 위한 基礎研究로서 葉肉으로부터 캘루스 誘起 및 植物體 再分화를 시도한 결과이다.

1. 幼葉組織으로부터 캘루스 誘起는 1.0mg/l Thidiazuron 첨가배지에서 70%의 誘起率을 보였다.
2. 0.1~0.2mg/l Dicamba 및 1.0mg/l Picloram 첨가가 캘루스의 増殖에 效果가 있었다.
3. 호르몬 첨가배지에서는 植物體 再分화가 이루어지지 않은 반면 Hormon-free 배지에서 shoot 및 root의 分化가 이루어져 完전한 식물체를 얻었다.

## 引用文獻

1. 江原道 農村振興院. 1993. 미발표자료.
2. 雨宮圭一, 藤木後也, 日向進. 1990. クラノキの組織培養による大量増殖. 山梨縣綜合農業試驗研究報告 第5號: 11-20.
3. Carman J.M., N.E. Jefferson and W.F. Campbell. 1987. Induction of embryogenic *Triticum aestivum* L. calli. II. Quantification of genetic addenda and other culture variable effects. Plant Cell Tissue and Organ Culture 12: 95-10.
4. 崔銀京, 朴鶴封. 1991. 生長調節物質이 獨活(*Aralia continentalis* Kitagawa)의 callus 誘起 및 器官分化에 미치는 影響. 全北大農大論文集, 22: 153-159.
5. Gleddie S. 1989. Plant regeneration from cell suspension cultures of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Reports 8: 1-5.
6. 李康燮, 蘇雄永. 1993. 땅두릅(*Aralia cordata* Thunb)의 체세포 胚發生 및 異常型胚의 構造. 植物組織培養學會誌 20: 77-83.
7. Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473-497.
8. 貝守 昇. 1986. 바이오テクノロジー의 大量増殖. 農業および園藝 61(3): 75-77.
9. 朴喆虎, 洪淳寬, 辛英範. 1991. Garden orach (*Atriplex hortensis* L.)의 葉片由來 callus 生長에 미치는 배지 및 Auxin의 影響. 江原大論文集科學技術研究 30: 249-253.
10. 朴鶴封, 崔銀京. 1992. 梅實나무(*Prunus mume* Sieb et Zucc)의 未熟胚로부터 체세포 胚發生과 植物體 再分化. 植物組織培養學會誌 19(5): 261-266.

11. 辛英範. 1991. Para-fluorophenylalanine(P-FP) 處理에 의한 作物의 染色體變異. I. 배지 PFP 및 Hormone이 메밀 및 담배 callus 誘起 및 生長에 미치는 影響. 韓國育種學會誌 23 : 145-152.
12. Yu C. Y. 1991. An in vitro system for selection and characterization of Acifluorfen-tolerant *Solanacecus* plants. Ph. D thesis, Univ. of Illinois.