

두릅나무 體細胞胚의 發芽에 미치는 培地 및 植物生長調節劑의 影響

박철호* · 이윤수* · 장한호* · 김남수* · 신영범*

Effects of Media and Plant Growth Regulators on Germination of Somatic Embryos of *Aralia elata* Seem.

Cheol-Ho Park*, Youn-Su Lee*, Han-Ho Jhang*,
Nam-Soo Kim*, and Young-Boum Shin*

ABSTRACT : Effects of media and plant growth regulators on the germination of somatic embryos of Angelica tree (*Aralia elata* Seem.) was studied for the mass production of Angelica tree through tissue culture. MS medium was found to be the most effective for the germination of somatic embryos (65% germination rate). Among the MS medium, the medium containing 25% less inorganic salts and 1% less sucrose was found to be the most effective. Gelling agent with 0.2~0.3% gelrite promoted the germination of somatic embryo (65~70%) and caused good growth of shoots and roots. 0.1 mg/l of BA and kinetin treatment caused 65~70% germination rate of somatic embryos and good growth of shoots and roots, and resulted in high percentage of dry matter. 1 mg/l or 5 mg/l treatment of putrescine, and 10 mg/l treatment of spermidine caused 90% germination rate of somatic embryos and good growth of plant organs, and inhibited vitrification of regenerated plants.

약용식물의 조직배양에서 체세포내 발생(somatic embryogenesis)을 통한 식물체 재생은 영양번식형 작물의 대량번식은 물론 발아가 저조한 목본식물의 기내급속 증식 기술로서 중요한 의미를 갖는다. 두릅은 산채이기도 하지만 根皮와 樹皮를 한방에서 總木皮이라 하여 당노병과 신장병 등에 약으로 쓰기도 한다¹²⁾. 일반적으로 두릅은 실생번식이 어려운데 정확한 발아억제 요인에 대해서는 밝혀져 있지 않다. 두릅은 주로 자생지 모주로부터 뿌리를 채취하여 근삽으로 번식하고 있으나 종묘확보가 어렵고 묘이식후 활착률이 낮은데다 입고 병역 등 병해발생이 우려되므로 두릅을 재배하는데는

무엇보다도 우량종묘의 생산이 중요하다. 최근 Angelica속 식물의 조직배양이 시도되면서^{1,3,5,6,10,22}와 貝守²¹⁾와 Amemiya 등¹⁾과 장 등^{5,6)}에 의하여 조직배양을 통한 두릅의 종묘생산 가능성이 보고되었으나 아직도 배양효율과 건전묘 생산면에서 개선되어야 할 점이 많다. 따라서 본연구에서는 조직배양에 의한 두릅건전묘의 대량생산을 목적으로 체세포배 형성 이후에 체세포배의 발아에 영향을 주는 배지 및 성장조절제의 적정조건을 구명하기 위한 실험을 수행하였던 바, 몇가지 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

* 강원대학교 농과대학(College of Agriculture, Kangwon National University Chuncheon 200-071, Korea) <'94. 7. 19 접수>

材料 및 方法

강원대학교 구내에 자생하는 두릅나무 유엽의 엽육조직을 2, 4-D 1mg/l와 Thidiazuron(TDZ) 1mg/l을 혼합첨가한 MS¹¹배지에 치상하여 배발생캘러스를 유도하였다. 증식된 배발생캘러스를 잘게 부순 다음 60mesh의 체를 통과시켜 호르몬이 첨가되지 않은 MS배양액 20ml에 시료 30ml를 가하여 100rpm 속도로 진탕배양하였다. 25℃에서 1500 lux 형광등의 全日照明으로 배양하였으며 7일간격으로 새로운 배지에 계대배양하였다. 형성된 체세포배의 발아율을 증진할 목적으로 배지의 종류(B5, LS, MS, white), 무기염류의 농도(2X, 1X, 1/2X, 1/4X, 1/8X), 당(sucrose)의 농도(1%, 3%, 5%, 7%, 9%), gelling agent의 종류 및 농도(agar 0.8%, 1.2%, 1.6%, bacto-agar 0.8%, 1.2%, 1.6%, gelrite 0.2%, 0.3%, 0.4%), cytokinin의 종류 및 농도(BA, Kinetin, TDZ-각각 10.1mg/l, 0.5mg/l), polyamine의 종류 및 농도(putrescine, spermidine, spermine- 각각 1mg/l, 5mg/l, 10mg/l, 20mg/l)를 달리하였으며 각 처리별로 균일한 어뢰형 체세포배 20개씩을 치상하였다. 배양은 25℃에서 1500 lux 형광등의 전일조명하에서 5주간 실시하였다. 배양 5주후에 배지 무기염류농도, gelling agent 처리에서 발아율, shoot와 root의 길이를 조사하였으며 gelling agent, cytokinin, polyamine 처리에서는 발아율과 shoot와 root의 길이 및 분화식물의 건물중을 조사하였다. 재생된 식물체는 버미큐라이트 포트에 이식하여 온실에서 재배하였다.

結果 및 考察

배양 4주후에 조사한 결과 치상한 총 210개의 유엽조직 가운데 189개가 캘러스를 형성하여 90%의 캘러스 유도율을 나타냈으며, 그 중 55%가 노르스름하고 조직이 단단하며 표면에 약간의 들기상 구조를 나타내는 배발생 캘러스임을 알 수 있었다. 이들 배발생 캘러스만 취하여 동일한 새로운 배지에서 4주 동안 증식한 다음 캘러스를 잘게 부수고 체를 통과시킨 시료를 호르몬이 첨가되지 않은

MS액체배지에 진탕배양한 결과 일주일만에 구형의 체세포배가 형성되기 시작하였다. 3주 후에는 심장형, 어뢰형, 자엽형 체세포배가 혼재하는 것이 육안으로도 관찰되었으며 이 중에서 어뢰형의 체세포배를 골라내 각각의 처리에 공시하여 발아를 시킨 결과는 표 1~표 6에 나타낸 바와 같다.

공시한 B5, LS, MS, White 등 네가지 배지가운데 MS배지가 체세포배의 발아에 가장 효과적이었으며(65%) shoot와 root의 생장도 가장 좋았다. LS배지는 MS배지 다음으로 양호하였고, B5와 White배지에서는 상대적으로 체세포배의 식물체 재생이 불량하였다(표 1). 무기염류의 농도는 1/4X MS가 발아 및 기관생장에 가장 효과적이었으며 이보다 고농도처리에서는 발아율 및 생장량이 감소함을 알 수 있다(표 2). 이것은 셀러리¹⁶⁾와 시금치¹⁹⁾같은 야채류는 무기염류의 농도를 1/2로 줄인 MS배지에서 체세포배의 발아가 양호하였고 Cyclamen²⁰⁾, Asparagus¹⁷⁾, 지황²¹⁾ 등은 1/2X LS배지에서 체세포배의 발아가 양호한 이전의 보고와 일치하는 결과이다. 또한 체세포배의 발아에 대한 sucrose 농도의 효과도 1%에서 가장 높게 나타

Table 1. Effect of four different media on germination of somatic embryos of *Aralia elata* after 5 weeks.

Media	Germination (%)	Shoot length (cm)	Root length (cm)
B5(Gamborg et al)	45	2.9±0.3	0.5±0.1
LS(Linsmaier-Skoog)	60	4.2±1.2	1.1±0.2
MS(Murashige-Skoog)	65	4.6±1.1	1.3±0.4
White	40	2.2±0.3	0.4±0.1

Table 2. Effect of MS medium strength on germination of somatic embryos of *Aralia elata* after 5 weeks.

Media strength	Germination (%)	Shoot length(cm)	Root length(cm)
2×MS	40	2.6±0.7	0.6±0.1
1×MS	65	4.6±1.1	1.3±0.4
1/2×MS	75	5.1±1.4	1.5±0.5
1/4×MS	80	6.4±1.3	1.7±0.3
1/8×MS	70	5.6±1.2	1.4±0.3

났으며 농도가 높아짐에 따라 발아 및 기관생장이 저하하였다(표 3). 따라서 체세포배의 유도에는 기본배지를 사용하고 체세포배의 발아에는 저농도의 무기염배지와 저농도의 당이 보다 효과적임을 나타낸 이전의 보고²¹⁾와 일치되는 결과를 보였다.

Gelling agent로서는 agar나 bacto-agar에 비하여 gelrite처리에서 10% 정도 발아율이 향상되었으며 gelrite 0.2% 처리가 가장 양호하였다(표 4). 그러나 shoot와 root의 생장은 gelrite 0.3% 처리에서 가장 좋았으며 분화식물체의 건물중도 고농도의 gelrite 처리에서 보다 높게 나타났다. 조직배양에서 gelrite의 사용으로 켈러스의 유도⁴⁾, 원형질체의 분화촉진⁷⁾, 배양조직과 배지의 변색방지⁶⁾ 등이 보고되었으며 Van ark 등¹⁵⁾은 *Poa pratensis*의 종자유래 켈러스 배양에서 gelrite가

Table 3. Effect of sucrose concentration on germination of somatic embryos of *Aralia elata* after 5 weeks.

Sucrose (%)	Germination (%)	Shoot length(cm)	Root length(cm)
1	70	5.3±1.5	1.4±0.5
3	65	4.6±1.1	1.3±0.4
5	45	2.1±0.5	0.6±0.2
7	30	1.2±0.3	0.4±0.1
9	--	--	--

--:No response

Table 4. Effect of gelling agents on germination of somatic embryos and dry matter of regenerated plants from somatic embryos of *Aralia elata* after 5 weeks.

Gelling agent (%)	Germination (%)	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Percentage of dry matter	
Agar	0.8	65	4.6±1.1	1.3±0.4	10.3
	1.2	55	3.8±0.9	1.1±0.3	12.4
	1.6	45	2.1±0.5	0.6±0.1	12.1
	1.6	45	2.1±0.5	0.6±0.1	12.1
Bacto-agar	0.8	60	4.1±1.2	1.5±0.6	9.8
	1.2	65	4.5±1.0	0.9±0.3	11.3
	1.6	40	1.4±0.4	0.5±0.1	10.7
Gelrite	0.2	70	5.8±1.9	1.4±0.7	10.8
	0.3	65	6.3±1.7	1.7±0.5	12.8
	0.4	50	4.6±1.4	1.2±0.4	13.3

agar에 비하여 기관분화율을 2~2.5배 증가시킨다고 하였다. 그러나 본 연구에서도 현저하게 나타난 기관분화에 대한 gelrite의 효과는 그 기작이 정확하게 밝혀져 있지 않으며 단지 gelrite가 agar보다 성장저해물질을 덜 가지고 있을 것으로 추론하고 있다^{4,7)}.

사이토키닌은 저농도(0.1mg/l)의 BA와 Kinetin처리에서 발아율과 성장량 및 건물중이 다소 높게 나타났으며 농도가 높아질수록 발아와 생장이 저조하였다. 특히 고농도의 TDZ에서는 체세포배의 발아와 생장이 전혀 이루어지지 않았다(표 5). 상수리나무의 체세포배 발아에는 WPM배지에 0.1mg/l의 BA를 첨가하였을 때 본 실험과 같은 BA의 효과가 인정되었으나⁹⁾ 매실나무는 MS배지에서 체세포배를 발아시키는데 BA나 kinetin보다 1.0mg/l의 thidiazuron이 더욱 효과적이어서 본 실험의 결과와 상이하였으므로¹³⁾ 수종에 따라 적정 호르몬의 종류 및 농도에 차이가 있음을 알 수 있다.

Polyamine의 체세포배의 발아 및 기관생장에 대한 효과는 putrescine 1mg/l와 5mg/l, spermidine 10mg/l 처리에서 가장 양호하였다(표 6). Polyamine 처리로 shoot와 root의 성장량 뿐만 아니라 분화식물체의 건물중도 무처리 또는 배지조성이나 사이토키닌 처리에서 보다 높은 수치를 나타냈다. 이것으로 말미암아 송 등¹⁴⁾과 김 등⁸⁾

Table 5. Effect of cytokinins on formation of somatic embryos and dry matter of regenerated plants from somatic embryos of *Aralia elata* after 5 weeks.

Cytokinin (mg/l)	Plant formation (%)	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Percentage of dry matter	
Contro		65	4.6±1.1	1.3±0.4	10.3
BA	0.1	70	5.2±1.3	1.1±0.3	9.5
	0.5	50	3.1±0.8	0.9±0.2	9.1
	1.0	35	1.5±0.4	0.7±0.3	6.3
	1.0	35	1.5±0.4	0.7±0.3	6.3
Kinetin	0.1	65	6.2±1.5	1.4±0.6	9.8
	0.5	40	3.4±0.7	0.8±0.2	9.2
	1.0	15	1.7±0.3	0.5±0.1	7.5
TDZ	0.1	--	1.0±0.2	0.3±0.1	5.6
	0.5	--	--	--	--
	1.0	--	--	--	--

--:No response

Table 6. Effect of polyamines on germination of somatic embryos and dry matter of regenerated plants from somatic embryos of *Aralia elata* after 5 weeks.

Poly amines (mg /l)	Plant formation (%)	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Percentage of dry matter
Control	65	4.6±1.1	1.3±0.4	10.3
Putrescine	1 90	6.6±1.8	1.6±0.6	14.6
	5 90	7.4±1.5	1.9±0.5	16.9
	10 85	6.3±1.3	1.5±0.4	16.3
	20 70	4.2±0.8	0.8±0.2	16.7
spermidine	1 85	6.1±1.2	1.3±0.5	13.9
	5 85	6.8±1.5	1.6±0.4	15.6
	10 90	6.9±1.8	1.9±0.8	15.8
	20 65	3.5±0.6	0.7±0.6	16.3
Spermine	1 80	5.8±1.5	1.5±0.6	14.2
	5 85	6.5±1.7	1.5±0.6	15.3
	10 80	6.1±1.9	1.3±0.4	15.9
	20 60	3.1±0.7	0.9±0.3	16.1

이 포프러잎의 증능절편 배양에서 polyamine이 부정아 형성을 증가시킨다고 보고한 바와 같이 두릅의 체세포배가 식물체로 발육하는데도 polyamine이 일종의 성장조절제 기능을 하여 두드러진 효과를 나타냈음을 알 수 있다. 또한 polyamine 처리에서는 다른 처리에서 나타난 분화식물의 잎과 잎자루의 투명화가 현저히 억제되었음을 관찰할 수 있었으며 다른 처리에서보다 polyamine 처리에서 분화식물의 건물중이 높게 나타난 것도 분화식물의 정상적인 생육에 연유하는 것으로 보인다. 따라서 두릅 체세포배의 발아에는 앞서 살펴본 cytokinin보다도 polyamine을 사용하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

摘 要

조작배양에 의한 두릅나무 종묘의 대량생산을 목적으로 체세포배의 발아에 효과적인 배지 및 성장조절제의 적정조건을 검토한 결과는 다음과 같다.

1. 배지는 MS배지가 체세포배의 발아에 가장 효과적이었으며(65%) 그 중에서도 무기염류의 농도를 1/4로 감소하고 당농도도 1%로 줄인 MS배지에서 발아 및 기관생장이 양호하였다.

- Gelling agent는 gelrite 0.2~0.3% 처리에서 발아가 촉진되었으며(65~70%) shoot 및 root의 성장도 양호하였다.
- Cytokinin은 0.1mg/l의 BA와 kinetin 처리에서 발아율(65~70%)과 신초 및 뿌리의 길이 및 건물중이 높게 나타났다.
- Polyamine의 효과에 대한 실험결과 putrescine 1mg/l과 5mg/l, spermidine 10mg/l 처리에서 체세포배의 발아(90%) 및 기관생장이 양호하였으며 분화식물의 투명화도 억제되었다.

引用 文 獻

- Amemiya K., T. Fujiki and S. Hyuga. 1990. Mass propagation by tissue culture in Japanese Angelica tree(*Aralia elata* S.). Annual Report of Yamanashi Agricultural Experiment Station 5:11~22
- 채영암, 박상언. 1993. 지황의 캘러스 유도과 현탁배양에서 체세포배 발생. 약작지 1(2):184~190
- Chok E. G. and H. B. Park. 1991. Effect of regulators on the callus formation and organogenesis in *Aralia continentalis* Kitagawa. Bulletin of the Agricultural college, Chunbuk National University 22: 153~159
- Huang L. C. and D. L. Chi. 1988. Pivotal roles of pichoram and gelrite in banana callus culture. Environ. Exp. Bot. 28:249~258
- Jhang H. H., C. H. Park, D. H. Cho and Y. B. Shin. 1993. Callus induction and plant regeneration from leaf tissue culture of *Aralia elata* S. Korean J. Crop Sci. 38:366~370
- 장한호, 박철호, 이윤수, 신영범. 1994. 두릅 캘러스의 현탁배양에서 체세포배 발생과 식물체 재생. 식물조직배양학회지(인쇄중).
- Koda T, Ichi T, Yamagishi H, and

- Yoshikawa H. 1988. Effects of phytohormones and gelling agents on plant regeneration from protoplasts of red cabbage. *Agric. Biol. Chem.* 52:2337~2340
8. 김성호, 김명원, 강영희, 이순희. 1993. 포플러 일질편의 부정근 분화시 polyamine의 함량변화. *식물조직배양학회지* 20(6):329~335
 9. 김용욱, 이석구, 이봉춘, 장석성. 1992. 상수리나무(*Quercus acutissima*) 성숙배로부터 체세포배 발생과 식물체 재분화. *식물조직배양학회지* 19(6):363~368
 10. 이강섭, 소용영. 1993. 땅두릅(*Aralia cordata* Thumb)의 체세포배 발생 및 이상형배의 구조. *식물조직배양학회지* 20:77~83
 11. Murashige T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15:473~497
 12. 박철호, 이기철. 1991. 두릅. *식용산채생산론*. 164~165
 13. 박봉규, 최은경. 1992. 매실나무(*Prunus mume* Sieb et Zucc)의 미숙배로부터 체세포배발생과 식물체재분화. *식물조직배양학회지* 19:261~266
 14. 송재진, 김명원, 이순희, 강빈구, 강연희. 1993. 포플러의 극성분화 기작: 내생호르몬 함량과 극성분화에 대한 NAA와 Polyamine의 영향. *식물조직배양학회지* 20(1):21~26
 15. Van ark H. F., M. A. C. M. Zaal, Creemers-Molenaar J. and P. Van der Valk 1991. Improvement of the tissue culture response of seed-derived callus cultures of *Poa pratensis* L. Effect of gelling agent and abscisic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27:275~280
 16. Zimmerman T. W. and C. C. Robacker. 1988. Media and gelling agent effect on cotton callus initiation from excised seed hypocotyl. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 15:269~274
 17. 齊藤猛雄. 1989. 아스파라거스의不定胚誘導. *하이오홀테이* 5:20~21
 18. 平林泰平. 1989. 셀러리의不定胚誘導. *하이오홀테이* 5:22~23
 19. 武藤正義. 1989. 호우레소우의不定胚誘導. *하이오홀테이* 5:24~25
 20. 大谷基泰, 島田多喜子 1989. 不定胚을 利用したシクラメン의大量増殖. *하이오홀테이* 5:30~31
 21. 西村繁夫, 齊藤猛雄, 山口眞美子 1989. 不定胚形成의現狀と誘導技術. *하이오홀테이* 5:9~15
 22. 貝守 昇 1986. 하이오테크놀로지利用による「タラノキ」의大量増殖. *農業および園藝* 61(3):75~77