

山茱萸의 藥培養에 관한 研究

권태오·김태수·이승엽

Anther Culture of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.

Tae Oh Kwon*, Tai Soo Kim** and Seung Yeob Lee**

ABSTRACT : The effects of media, growth regulators, low-temperature treatments, culture temperature and light were investigated to improve the callus induction and growth in the anther culture of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. The frequency of callus induction was more effective on WPM medium than MS medium, and it was highest as 54% in WPM medium supplemented with 1mg/L NAA. Callus growth was stimulated on MS medium supplemented with 2mg/L NAA. Effect of temperature and light on the callus induction and growth was highest as 62% in the treatment for 16/8 hrs. (light/dark) at 25°C. Effect of low-temperature treatment on callus induction was highest as 19.5% in the treatment for 36 hrs. at 4°C. For organization, green cells and rootings were promoted on MS medium supplemented with 0.5 mg/L 2,4-D and 1 mg/L kinetin. The prevention of callus browning was effective on the medium containing 3~5mg/L ABA or 5mg/L AgNO₃. The supplement of ABA or AgNO₃ were maintained callus activity for 4-5 weeks and they were promoted the development of green cells.

Key words : Anther culture, Culture condition, Pretreatment, ABA, AgNO₃

緒 言

山茱萸는 中國과 우리나라가 原產地로서 國內에서는 中部以南地域에서 주로 分布하고 있다. 山茱萸의 植物學的 特性은 蟲蟲나무과에 속하는 다년생 낙엽성 교목으로 산형화서이며, 3월 下旬에서 4월 中旬까지 개화하는데 1개의 화피에서 20개 내외의 노란꽃이 形成된다²⁾. 약리학적 주요성분으로

는 種子를 제거한 乾燥 果肉에 iridoid계 배당체인 morroniside, loganin, seuroside 등과 ursolic acid 物質이 含有되어 있어 滋養強壯, 精血, 抗菌作用 등에 生藥學的으로 效能이 인정되고 있으며^{6,7,10)}, 山茱萸酒와 茶는 強壯, 強精藥으로 民間에서 널리 愛用되고 있다⁴⁾.

최근 國民 生活水準 向上에 따라 天然 生藥劑의 需要增加와 함께 山茱萸의 需要도 매년 增加되고 있으며, 栽培面積도 1985년 50.7ha에서 1992년에

* 圓光大學校 農科大學 (College of Agriculture, Wonkwang University, Iksan, Cheonbuk, 570-749)

** 湖南農業試驗場 (National Honam Agricultural Experiment Station, RDA, Iksan, Cheonbuk, Korea, 570-080)

*** 本研究은 1994年度 圓光大學校 校內 研究費 支援에 의하여 이루어졌음.

는 180ha로 栽培가 擴大되어 371M/T이 生産되었으며, 122.5M/T을 輸出함으로서 農家의 새로운 高所得 藥用作物로 주목 받고 있다.

그동안 山茱萸의 繁殖은 주로 種子를 이용한 실생번식에 의존하여 왔는데 種皮가 매우 딱딱한 堅실종자로서 發芽에 長期間이 所要될 뿐만 아니라 種子의 休眠성이 강하여, 發芽率도 30% 미만으로 低調한 實情이다. 또한 삼목에 의한 營養繁殖을 일부 시도하고 있으나 發根이 쉽지 않아, 大量繁殖을 위한 체계적 研究가 절실히 요구되고 있다^{4,12)}.

國內에서 山茱萸에 대한 研究는 전남진흥원에서 삼목번식¹⁴⁾, 수량증대¹³⁾, 품질향상¹⁵⁾ 등을 위한 研究가 이루어졌으며¹³⁻¹⁵⁾, 日本의 Yazaki와 Okuda¹⁷⁾는 細胞培養에 의한 器內物質生産에 대하여 報告한 바 있다. 山茱萸의 器內增殖은 朴等¹⁰⁾이 形成된 新초의 器內發根에는 成功하였으나 分化率은 5%로 매우 낮았다고 하였다. 임목류의 藥培養은 育種期間의 短縮, 耐災害性 增大를 위한 3배체 및 6배체 등의 倍數體 獲得, 突然變異 誘起 등을 목적으로 이루어져 왔다. 國內에서 목본류의 藥培養은 李와 李⁵⁾가 무궁화의 1핵성 小孢子期的 藥을 培養하여 캘러스 形成을 보고하였고, 金¹¹⁾ 등은 *Populus albaglandulosa*의 藥培養에 의한 캘러스 형성 및 植物體 再分化를 報告하였다. 특히 산수유와 같은 목본성 藥用作物의 藥을 培養하면 小孢子 유래의 半數性 細胞集團과 약벽이나 화사유래의 2n성 體細胞 集團을 다른 부위의 組織을 培養하는 것보다 容易하게 얻을 수 있어 편리하다. 山茱萸는 열매를 藥用으로 이용하기 때문에 3배체, 4배체 또는 6배체 등을 育成하여 生長調節劑를 이용한 고품질, 다수확을 목표로 相關연구가 持續적으로 이루어져야 한다.

따라서 本 研究는 山茱萸의 器內 倍數性 育種을 위한 基礎的 研究로서, 약배양 유래 반수체 및 기내 자연배가되는 배수체를 획득하기 위하여, 우선 어린 藥을 培養하여 캘러스 形成 및 生長에 미치는 培地, 生長調節劑, 低溫 前處理, 培養溫度 및 光의 影響을 調査하여 얻어진 몇가지 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

供試材料는 圓光大學校 圃場에서 生育중인 山茱

萸(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.) 10년생 成木에서 開花 7일전 어린 화뢰를 採取하여 使用하였다.

1. 캘러스 形成에 미치는 培地와 生長調節劑의 影響

培養藥으로부터 캘러스 誘導를 위한 基本培地는 MS(Murashige and Skoog) 培地⁹⁾와 WPM(McCown and Lloyd) 培地⁸⁾를 使用하였다. 生長調節劑는 2,4-D와 NAA를 각각 0, 0.5, 1, 2, 3mg/L 로 濃度를 달리하여 添加하였다. 培地는 3% sucrose와 0.5% Gelrite를 넣은 후, 125℃ 10분간 滅균하였으며, pH는 autoclave전 5.8로 調節하여 \varnothing 8.7cm 사리에 25ml씩 분주하였다. 藥의 置床은 화뢰를 70% 알콜로 3~4회 表面殺菌하여 滅菌된 편셋으로 藥을 꺼내어 사리당 40곡씩 置床하였다. 培養은 25℃에서 暗培養하여 배양후 50일까지의 캘러스 形成藥數와 캘러스 生長을 調査하였다.

2. 캘러스 形成에 미치는 培養溫度 및 光의 影響

적정 배양조건을 究明하기 위하여 1mg/L NAA를 添加한 WPM培地에 같은 方法으로 藥을 置床하여, 培養溫度를 15, 20, 25, 30℃로 조건을 달리하였고 光은 培養溫度別로 0/24, 8/16, 16/8, 24/0 hrs. (light/dark) 照射하여 培養 50일까지의 캘러스 生長과 活力을 調査하였다.

3. 캘러스 形成에 미치는 低溫 前處理의 影響

藥을 培養하기 전의 低溫 前處理가 캘러스 形成에 미치는 影響을 調査하기 위하여 採取한 화뢰를 4℃ 냉장고에서 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 168시간 處理하여 2mg/L NAA를 첨가한 MS배지에 약을 치상하였다. 培養은 25℃에서 暗培養하여 培養後 50일까지의 캘러스 形成數와 캘러스 生長을 比較 調査하였다.

4. 캘러스 生長 및 器官分化에 미치는 生長調節劑, ABA와 AgNO₃의 影響

誘起된 캘러스로부터 植物體 再分化를 위하여 1mg/L NAA와 0.5mg/L 2,4-D에 각각 1-2mg/L kinetin을 添加한 MS배지에 옮겨 25℃에서 2,000lux로 培養하였다. 3주간격으로 繼代培養하여 캘러스 生長과 器官分化를 觀察하였다.

또한 캘러스褐變防止와 器官分化를 위하여, 0.5mg/L 2,4-D와 1mg/L kinetin를 함유한 MS배지에 0, 2, 5mg/L AgNO₃와 1, 3, 5mg/L ABA를 각각 첨가하여 캘러스 生長과 器官分化를 比較觀察하였다.

結果 및 考察

1. 캘러스 形成에 미치는 培地와 生長調節劑의 影響

山茱萸의 어린 藥으로부터 캘러스 形成을 위한 最適培地를 究明하기 위하여 MS培地와 WPM培地에 각각 다른 濃度の 2,4-D와 NAA를 첨가하여 藥을 培養한 結果는 표1과 같다. 培地の 種類에 따른 캘러스 形成率은 WPM培地가 MS培地보다 좋은 反應을 보였으며, 生長調節劑의 影響은 NAA가 2,4-D보다 모든 處理에서 높은 캘러스 形成率을 보였다. 最適濃度는 WPM培地에 1mg/L NAA를 添加한 培地에서 54%로 가장 높은 캘러스 形成率을 보였고, MS배지에서는 2mg/L NAA를 添加한 배지에서 42%로 가장 높았으며, 1mg/L NAA를 添加한 WPM培地에서보다 치밀한 組織의 캘러스가 形成되었으며, 캘러스 活力도 높았다. 朴等¹¹⁾은 山茱萸 액아배양에서 木本류의 植物體 再分化 및 액아배양에 많이 利用하는 WPM培地가 오히려 shoot增殖에 좋지 않다고 하였는데, 본 실험에서 캘러스 형성율은 MS培地보다 WPM培地에서 좋은 反應을 보였다. 이는 培養目的 및 部位에 따라 적정배지가 다르기 때문에 생각된다. 金等¹²⁾은 *Populus albaglandulosa*의 藥培養에서 15℃에서 培養할 경우 NAA보다 2,4-D가 캘러스 形成에 좋으며, 0.1ppm의 2,4-D를 添加한 低濃度 培地에서 가장 높은 캘러스 形成率을 보였을 뿐 만 아니라 1ppm의 BAP 단독 處理區에서도 높은 反應을 보였다고 하였다. 이와 같이 植物의 種類, 培養部位, 培養條件 등에 따라 캘러스 形成에 必要한 生長調節劑의 種類와 濃도가 相異함을 알 수 있다.

2. 캘러스 形成에 미치는 培養溫度 및 光의 影響

藥을 置床後 캘러스 形成에 미치는 培養溫度와 光의 影響을 調査한 結果는 표2와 같다. 培養溫度

Table 1. Effect of media and growth regulators on callus induction and growth in anther culture of *Cornus officinalis*.

Medium	Growth regulators (mg/L)	Callus induction (%)	Callus growth*	
MS	2,4-D 0.5	12	+ (Brown)	
		28	++ (Brown)	
		20	++ (White)	
	2	22	++ (White)	
		NAA 0.5	18	+ (Yellow)
			34	+++ (Brown)
	42		+++ (White)	
	3	34	++ (White)	
		2,4-D 0.5	22	+ (Brown)
30			+ (Yellow)	
28	++ (Yellow)			
3	24	++ (White)		
	WPM	NAA 0.5	30	+ (Yellow)
			54	+++ (White)
40			++ (Yellow)	
3	36	++ (Yellow)		

* + : Poor, ++ : Good, +++ : Excellent

는 25℃에서 캘러스 形成率이 가장 높았으며, 光의 影響은 25℃에서 16시간 照明이 62%로 가장 높은 反應을 보였다. 그러나 24時間 暗培養은 계속 明培養한 處理의 54%보다 현저히 낮은 28%의 캘러스 形成率을 보여, 木本류 藥培養에서 暗狀態나 弱光이 좋은 反應을 보인 것과는 대조적인 것으로 木本류의 特性인 것으로 생각된다. 한편 비교적 低溫인 15℃에서도 10-26%의 캘러스 形成率을 나타내었

는데, 이는 山茱萸가 이른봄 低溫開花하는 習性を 갖기 때문에 器內培養에서도 초본류와는 달리 15℃의 낮은 溫度에서도 캘러스 形成이 可能하였던 것으로 생각된다. 金 等¹⁾은 *Populus albaglandulosa*의 藥培養에서 15℃로 明培養(100 lux, 16hrs.)할 경우 0.1ppm의 2,4-D첨가시 캘러스 形成率이 높았으나, 25℃의 明培養에서는 1.5ppm의 2,4-D가 좋다고 하여 培養溫度에 따른 生長調節劑의 濃도가 다를수도 있으며, n 및 2n性 캘러스 形成率과도 관계가 있다고 하였다. 本 實驗에서는 캘러스 器內增殖을 위하여 小孢子 由來 半數性 캘러스 및 2n性 體細胞 由來의 캘러스를 모두 증식에 活用할 目的으로 培養溫度에 따른 生長調節劑의 濃度 및 誘起된 캘러스의 倍數性を 檢討하지 않았으나, 이러한 問題는 今後 育種의 측면에서 충분한 研究가 必要하다.

Table 2. Effect of culture temperature and light on callus induction and growth in anther culture of *Cornus officinalis*.

Culture temperature (°C)	Callus induction by light/dark culture (%)			
	24/0	16/8	8/16	0/24 (hrs.)
15	14	10	26	12
20	30	48	38	28
25	54	62	44	28
30	32	40	42	34

* Basic medium : WPM+1mg/L NAA

3. 캘러스 形成에 미치는 低溫 前處理의 影響

植物組織培養에서 藥培養 技術의 發達は 育種의 측면에서 큰 意義를 갖는데, 대부분의 植物에서 藥培養 效率은 培養前 藥의 低溫 前處理의 影響이 크다. 山茱萸의 어린 花뢰를 4℃에서 12시간 간격으로 低溫 前處理를 하여 藥을 培養한 結果는 표3과 같다. 캘러스 形成率은 12시간 處理에서 18.5%로 가장 높았으며, 캘러스 生長은 72시간과 96시간

리에서 양호하여 연황색의 치밀한 조직특성을 보였다 (Fig. 1). 그러나 96시간 以上 處理에서는 無處理의 9.3% 보다 크게 감소하였으며, 캘러스의 活力도 낮아 褐變하는 캘러스들이 많았다. 1) 임목류 藥培養에서는 低溫處理를 하지 않는 경우가 많은 데^{1,5)}, 本 實驗에서 4℃로 96시간 以上 處理할 경우 캘러스 形成率이 無處理보다 크게 減少한 結果로 미루어 山茱萸와 같은 木本류의 藥培養은 低溫處理에 따른 캘러스 形成 및 生長은 초본류와는 다르다는 것을 알 수 있었으며, 今後 이와 關聯된 충분한 檢討가 必要하다. 특히 低溫 前處理는 無處理에 比하여 2n性 體細胞 由來 캘러스 形成이 減少하는데, 本 實驗에서 無處理의 경우 9.3%의 캘러스 形成을 보였는데, 藥壁組織이나 花絲 切斷部 由來의 2n性 體細胞 캘러스가 대부분이었다. 이들 2n性 體細胞는 體細胞 胚發生 연구를 위한 材料로 使用할 수 있고, 低溫處理에 의하여 많이 形成되는 小孢子 由來의 半數性 캘러스는 變異體 選拔 및 倍數性 育種材料로 活用이 가능하다.

Table 3. Effect of low-temperature treatment on callus induction and growth in anther culture of *Cornus officinalis*.

Treatment (4°C, hrs.)	Callus induction (%)	Callus growth*
0	9.3	++ (Brown)
12	11.8	++ (Brown)
24	9.5	++ (Brown)
36	19.3	++ (Brown/White)
48	18.5	++ (Brown/White)
72	13.0	+++ (Yellow/White)
96	6.0	+++ (Yellow/White)
168	2.5	+++ (Yellow/White)

* + : Poor, ++ : Good, +++ : Excellent

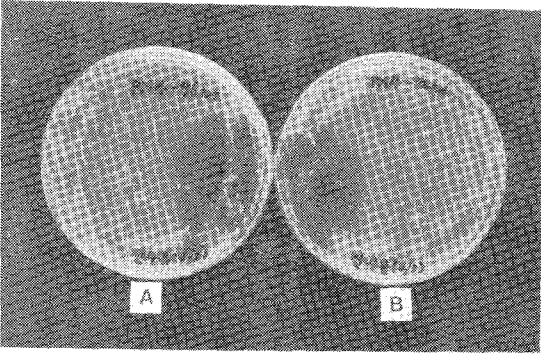


Fig. 1. Calli induced from anther culture of *Cornus officinalis* pretreated for 72 (B) and 96 (A) hrs. at 4°C.

4. 캘러스 生長 및 器官分化에 미치는 生長調節劑, ABA와 AgNO₃ 影響

캘러스 生長 및 器官分化에 미치는 生長調節劑의 影響을 調査하기 위하여, 캘러스 活力이 오랫동안 지속되는 MS배지를 이용하여 實驗한 結果는 표 4와 같다. 캘러스 生長은 오옥신 종류에 관계없이 kinetin첨가로 왕성한 분열을 보였으나, 2주후부터 褐變되기 시작하여 3~4주째에는 흑갈색 물질이 分泌되어 배지내에 확산되면서 대부분의 캘러스가 枯死되었다. 배양 3주후 繼代培養한 결과 0.5mg/L 2,4-D, 1mg/L kinetin을 첨가한 培地에서 活力이 가장 좋았으며, 綠點形成 및 뿌리분화도 촉진되었으나, shoot形成은 이루어지지 않았다 (Fig. 2.).

Table 4. Effect of growth regulators on plant regeneration in anther culture of *Cornus officinalis*.

Growth regulators (mg/L)		Callus growth*	Organization
NAA	1.0	kinetin 1	+++ (Dark brown)
		kinetin 2	+++ (Dark brown)
2,4-D	0.5	kinetin 1	+++ (Bright yellow)
		kinetin 2	+++ (Brown/Dark brown)

* +++ ; Excellent

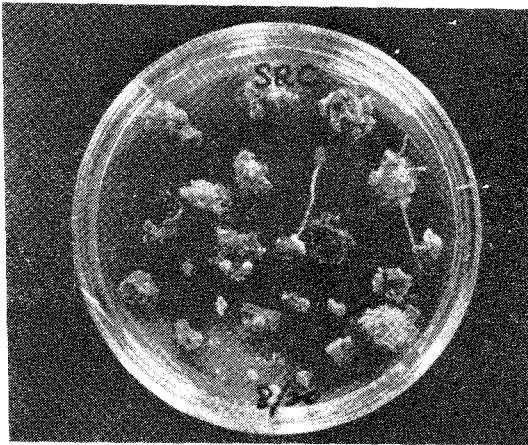


Fig. 2. Development of green cells and root from the anther-derived calli of *Cornus officinalis* on MS medium supplemented with 0.5mg/L 2,4-D and 1mg/L kinetin.

Yazaki와 Okuda¹⁷⁾는 산수유 캘러스 培養에서 生産되는 탄닌화합물을 분리동정하였으며, 열매에서 보다도 캘러스에서 탄닌화합물의 含量이 36배나 높았고, BA의 첨가로 탄닌화합물의 合成이 促進된다고 하였다. 본 實驗에서 캘러스의 褐變 및 培地에 확산되었던 흑갈색 물질은 이러한 탄닌화합물로 추정되며, kinetin의 添加로 탄닌화합물의 生成이 증가하여 캘러스 褐變化가 촉진되었던 것으로 생각된다. 이러한 문제는 繼代培養 期間의 단축으로 약간은 방지할 수 있었다. 그래서 藥培養 유래 캘러스의 褐變化 방지와 器官分化를 유도하기 위하여, 앞의 實驗에서 캘러스 生長에 가장 좋았던 0.5mg/L 2,4-D 와 1mg/L kinetin을 添加한 MS 배지에 ABA와 AgNO₃를 각각 농도별로 처리하여 實驗한 結果는 표5와 같다.

에틸렌 生合成을 抑制하는 AgNO₃의 添加는 無處理에 비하여 캘러스 生長이 약간 遲延되는 경향

Table 5. Effects of AgNO₃ and ABA on callus browning and organization in anther culture of *Cornus officinalis*.

Treatment * (mg/L)	Callus growth * * & browning	Organization	
AgNO ₃	0	+++ (Dark brown)	None
	2	++ (White/Brown)	None
	5	++ (White/Brown)	Green point
ABA	1	+++ (White)	None
	3	++ (White/Brown)	Green point
	5	++ (White/Brown)	Green point

* Basic medium : MS+0.5mg/L 2,4-D+1mg/L kinetin

** ++ : Good, +++ : Excellent

을 보였으나, 캘러스褐變化 정도는 크게 減少하였다(Fig. 3A). 5mg/L AgNO₃ 첨가배지에서는 綠點形成이 촉진되었으나, 器官分化는 관찰할 수 없었다. ABA첨가배지에서도 캘러스의褐變化가 현저히 抑制되었으며, 3, 5mg/L ABA첨가배지에서도 캘러스 生長이 대조구보다 遲延되었으나, 캘러스

의 活力이 오랫동안 지속되어 綠點形成이 促進되었다(Fig. 3B). AgNO₃는 에틸렌 抑制作用이 있어 器官分化를 촉진하는 것으로 알려져 있는데, Purhauser와 Gyulai¹⁰는 100μl AgNO₃의 添加가 밀과 트리티케일, 유채의 캘러스 培養에서 再分化率을 현저히 촉진시키고, 유채 캘러스의 綠點形成을 향상시켰으나, 발근율은 낮아지는 경향을 보였다고 하였다. ABA도 캘러스의 活力을 오래도록 維持시키므로 화분과 作物의 藥培養에서 植物體 分化率을 향상시키는 것으로 알려져 있다³.

본 실험에서는 비록 再分化 植物體를 얻지 못하였으나, 이러한 物質들을 활용하여 器官分化를 위한 適正培地의 究明을 계속하고 있다.

摘 要

山茱萸(*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.)의 組織培養을 위한 基礎的 研究로서 藥培養에 미치는 培地, 生長調節劑, 低溫 前處理, 培養溫度 및 光의 影響을 檢討한 結果는 다음과 같다.

1. 캘러스 形成率은 MS培地보다 WPM培地에서 좋은 反應을 보였으며, 1mg/L NAA를 添加한 WPM培地에서 54%로 가장 높았고, 캘러스 生長은 2mg/L NAA를 添加한 MS培地에서 좋았다.

2. 藥의 培養溫度 및 光의 影響은 25℃, 16시간 明

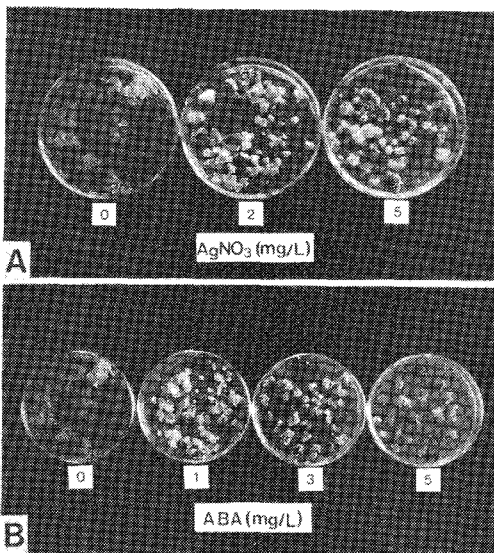


Fig. 3. Effects of AgNO₃(A) and ABA(B) on callus growth and browning in anther culture of *Cornus officinalis*.

培養이 62%의 가장 높은 캘러스 形成率을 보였다.

3. 캘러스 形成에 미치는 藥의 低溫 前處理 效果는 4℃, 36시간 處理에서 19.5%로 가장 높았다.

4. 器官分化를 위한 適正培地로는 0.5mg/L 2, 4-D와 1mg/L kinetin을 添加한 MS배지가 綠點形成 및 뿌리분화를 促進하였다.

5. 캘러스 褐變化 防止를 위하여는 3-5mg/L ABA와 5mg/L AgNO₃의 添加가 效果적이었으며, 캘러스 活力이 높아 綠點形成을 促進하였다.

參考文獻

1. 김정석, 최주수, 윤기식. 1987. *In Vitro*에 의한 2n과 4n의 *Populus albaglandulosa*의 약배양에 관한 연구. 1. Anther의 성숙도에 따른 Callus 형성. 한육지 19(1) : 1~7.
2. 廣川書店. 1965. 약용식물 대사전. p 160.
3. 정근식. 1989. 수도 약배양에 관한 연구. 한식조지 12(1) : 35~56.
4. 이정일. 1986. 약초재배와 이용법. 송원문화사. p 262.
5. 이만상, 이중호. 1984. 무궁화 신품종 육종의 기초적 연구. III. 무궁화 약배양에 관하여. 원광대학교 농대논문집 7 : 121~130.
6. 육창수 외 4인. 한약학. 광명의학사. p 541.
7. 육창수 외 12인. 1981. 약용식물학 각론. 진명출판사. pp. 289~299.
8. McCown, B. H. and G. E. Lloyd. 1980. Influence of light and temperature in callus culture. Amer. J. Bot. 57 : 148~152.
9. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15 : 477~497.
10. 五星출판사. 1990. 약초대전서. p 532.
11. 박충현, 성낙술, 이승택, 연구복, 손서규. 1993. 산수유 (*Cornus officinalis*)의 기내증식에 관한 연구. I. 액아 배양에 의한 callus 유기, shoot 증식 및 뿌리 분화. 한약작지 1(1) : 63~69.
12. 朴仁鉉, 李相來. 1990. 增補 藥用植物栽培. 先進文化社. 123~130.
13. 박규철, 남창조, 이연식. 1990. 산수유 착과율 및 과실비대 향상 시험. 전남농시보고서 : 123~126.
14. 박인진, 박규철, 최진경, 이운식. 1989. 생장조절제에 의한 산수유 무핵과 유기 및 녹지삽 발근촉진제 선발 시험. 전남농시보고서 194~202.
15. 박규철, 박인진, 이연식, 박태동. 1994. 산수유 주산지 환경조사 및 생장조절제 처리 효과. 한약작지. 2(1) : 1~6.
16. Purharser L. and G. Gyulai. 1993. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35 : 131~139.
17. Yazaki, K. and T. Okuda. 1989. Gal- lotannin production in cell culture of *Cornus officinalis*. Plant Cell Reports 8 : 346~349.