

가시오갈피 미숙배 배양으로부터 Callus 형성 및 식물체 재분화

유창연·김재광·안상득

Callus Formation and Plant Regeneration from Immature Embryos of *Eleutherococcus senticosus*

Chang-Yeon Yu, Jae-Kwang Kim and Sang-Deuk Ahn

ABSTRACT : This study was conducted to establish mass propagation system from the tissue culture using immature embryos in *Eleutherococcus senticosus*. Immature embryos from seeds were removed under the microscope and placed on MS, MSB₅, and B₅ medium containing several plant growth regulators. While the calli were well formed on media containing 2 mg/l of 2, 4-D, 2 mg/l of 2, 4-D and 0.7 mg/l of TDZ, shoot regeneration was better on MS medium with combinations of high concentrations of TDZ and low concentrations of 2, 4-D. Treatment of 2, 4-D alone was better than treatment of TDZ alone in callus induction, but plant regeneration was reversed. The results of callus formation and shoot regeneration on MSB₅ and B₅ media were similar to those of MS media. The rate of callus formation was nearly 100% when 2, 4-D was added to B₅ medium on concentration of 2 mg/l or 0.7 mg/l. TDZ showed very significant effect on the formation of multiple shoots.

緒 言

최근 한방에 대한 관심이 동서양을 막론하고 고조되고 있으며 이에 따라 한약재의 수요도 높아지는 추세에 있다. 때문에 농가 소득원 및 UR대체작물로 약용식물의 재배가 증가하고 있으나 번식기술체계의 미흡으로 매년 약용식물의 수입량은 증가하고 있는 실정이다¹⁰⁾.

가시오갈피 (*Eleutherococcus senticosus* Max.)는 식물분류학상 인삼과 같이 오갈피과에 속하는 다년생 관목으로 일명 시베리아 인삼이라 불리워

지고 있으며 생약학에서는 줄기, 뿌리 및 가지의 껍질을 건조시킨 것을 가시오갈피라 하며 이를 이용한다. 성상은 다른 오갈피에 비교해 가시가 줄기 전체에 가늘게 털이 난 것처럼 침이 많아 분포하고 있으며 유효성분으로 eleutheroside A, B, B1, C, D 및 E 등의 sapoin 및 lignan glycoside 등을 함유하여 강장, 혈당강하, 항스트레스, 스테미나 보강, 항암성 등에 사용되며 생체에 있어 인삼과 비슷한 약리활성을 가지고 있다²⁰⁾. 두충가시오갈피 제제는 피로 또는 미용에 그리고 지구력 향상, 골프시의 어깨 및 허리의 피로에 효과가 있고 또한, 혈압이 안정되고 변비가 치료되며 관절통 및 신경

강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부 (Division of Applied Plant Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chunchon 200 - 701, Korea)

본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구비 지원에 의하여 수행되었음. 과제번호 961-0602-018-2.

< '97. 1. 16 접수 >

통이 없어지며 또 알레르기과 같은 피부질환 및 회분증, 비염 등이 없어지며 특히 체중감소에도 효과적이라는 연구결과의 보고도 있다¹⁴⁾.

황(1996)¹¹⁾ 등은 상기의 효능을 대부분 포함하고 있고 복용하기에 더 편리한 이상적인 두충가시오갈피 복합액제를 개발하기 위한 연구로서 전반적으로 두충 및 가시오갈피 수침 제제를 1:2로 제조 혼합 투여하는 것이 가장 바람직하다고 보고하였다.

우리나라에서는 가시오갈피의 종자가 결실이 안되어 발아율이 낮고 삽목율도 20% 정도로 입묘가 불안정하여 재배상의 문제점으로 지적되고 있다. 박(1994)²⁰⁾은 외국에서 도입한 가시오갈피 종자를 15℃에서 100~120일간 후숙시키면 68.6~74.7% 개갑하게 되며 종자부패율도 12.7~14%로 낮아 이 기간이 후숙기간에 적당하다고 보고하였다. 그러나, 가시오갈피는 세계적으로 희귀하여 자생지역이 우리나라 지리산, 설악산, 오대산, 대관령 부근 등의 고산지대와 러시아 시베리아 동남부 지역, 일본 북해도 지방과 중국 일부 지방으로 국한되어 있는 것으로 알려져 있고 한약재가 가장 많이 거래되는 경동시장에서도 가시오갈피는 찾아보기 힘들며 일부 농가에서 소규모 재배하고 있는 것을 제외하고는 강남제약, 동신제약에서 원료를 수입하고 있으며 엘르르-F, 엘코크라는 이름으로 엑기스를 제조 판매하고 있는 실정이다. 그리고, 우리나라에서는 가시오갈피의 종자가 결실되지 않기 때문에 실생번식기술이 이루어져 있지 않고 저조한 번식율로 입묘가 불안정하여 일반 농가의 재배는 거의 불가능한 실정이다. 가시오갈피에 대한 수요량은 계속 증가하여 원료 수입량은 89년을 시작으로 매년 증가하고 있다. 그러므로 가시오갈피의 대량 번식방법이 확립되면 묘목대량생산 및 농가 재배면적의 증가로 외화 절약 및 농가 소득증진에 기여할 수 있을 것이다.

따라서, 본 연구는 가시오갈피의 조직배양을 통한 대량증식방법체계 확립의 방법으로 기내배양에서의 캘러스 형성 및 식물체 분화에 영향을 미치는 배지와 식물생장조절물질 및 농도의 최적조건을 구명코자 실시하였다.

材料 및 方法

배배양의 재료로는 일본 북해도 가시오갈피 및 러시아 가시오갈피 종자를 사용하였으며 종자의 배를 성숙시키기 위해 15℃조건하에 종자를 층적매장하여 60일 동안의 후숙과정을 거쳤다. 후숙처리한 종자를 증류수로 2회 세척한 후 70% 에탄올에 30초정도 담가 두었다. 멸균수로 세척한 후 무균상에서 NaOCl 4%용액에 8분동안 소독하였고 소독한 재료는 다시 멸균수에 5회 세척한 후 광학현미경 하에서 배를 절취하여 배지에 치상하였다. 배지는 Murashige and Skoog medium을 기본으로 하여 3%의 sucrose를 완전히 용해시킨 후 auxin류인 2,4-D 1, 2, 4mg/l, IAA 1, 2mg/l, NAA 1, 2mg/l, cytokinin류인 TDZ 0.02, 0.2, 0.7, 2, 2mg/l, BAP 1mg/l의 농도로 단독처리하였고 각각의 식물생장조절물질을 조합처리하였으며 B₅, MSB₅(MS salts+Gamborg vitamins)배지를 기본으로하여 3%의 sucrose를 첨가 후 완전히 용해시킨 후 auxin류인 2,4-D 1, 2mg/l, cytokinin류인 TDZ 0.02, 0.7mg/l의 농도로 단독처리하였고 각각의 생장조절물질을 조합처리하였다. 생장조절물질 첨가 후 pH를 5.7로 조절하였으며 agar를 0.8% 첨가하였다. 각각의 배지는 10ml씩 시험관에 분주하였으며 이를 121℃, 1.5기압 이상의 조건으로 15분간 고압멸균하고 고체배지로 응고시켜 사용하였다.

위의 배지에 가시오갈피 종자의 배를 절취하여 치상하고 23℃, 16시간 광조건하에서 배양하고 30일 후 캘러스 생성율과 분화된 식물체의 줄기수, 줄기길이 등을 조사하였다.

結果 및 考察

1. 미숙배 배양으로부터 callus 형성

가시오갈피의 종자를 층적매장을 통하여 60일 동안의 후숙처리를 한 후 종자의 배를 절취하여 2,4-D, TDZ, IAA, NAA, BAP가 첨가된 Murashige and Skoog medium에 30일간 배양한 결과 10일 정도 경과 후 callus의 형성 및 shoot가 분화되기 시작

했으며 30일 경과 후 callus 생성율을 조사하였는데 그 실험결과 (Table 1), TDZ, IAA, NAA 처리시에는 전혀 callus가 생성되지 않았으며 전반적으로 2, 4-D의 처리에서 양호한 결과를 보였다. 2, 4-D의 처리는 저농도인 1mg/l 일 때보다 2mg/l 또는

Table 1. The effect of plant growth regulators on callus formation in MS medium from the immature embryo culture of *E. senticosus* after 30 days.

Plant growth regulator (mg/l)	No. of embryo incubated	No. of callus	Rate of callus formation (%)	
2, 4-D	1	11	3	16.7
	2	11	5	45.5
	4	50	19	38.0
TDZ	0.02	9	0	0.0
	0.2	17	0	0.0
	0.7	14	0	0.0
	2.2	10	0	0.0
IAA	1	15	0	0.0
	2	11	0	0.0
NAA	1	14	0	0.0
	2	6	0	0.0
BAP	1	10	2	20.0

Table 2. The effect of the combination conditions of plant growth regulators on the callus formation in MS medium from the immature embryo culture of *E. senticosus* after 30 days.

Plant growth regulator (mg/l)	No. of embryo incubated	No. of callus	Rate of callus formation (%)	
2, 4-D 0.1+TDZ	0.02	19	4	21.1
	0.7	13	4	30.8
2, 4-D 1+TDZ	0.02	19	8	42.1
	1	15	0	0.0
2, 4-D 2+TDZ	0.7	14	12	85.7
	2	20	1	5.0
2, 4-D 4+TDZ	0.02	50	10	20.0
	0.7	10	0	0.0

4mg/l 인 고농도 처리시 callus의 생성율은 양호한 결과를 나타냈으며 2, 4-D 2mg/l 를 처리하였을 때 45.5%의 callus 생성율로 최적결과를 보였다.

2, 4-D와 TDZ, NAA, IAA를 조합처리하여 30일간 배양한 결과 (Table 2), 2, 4-D+NAA, IAA를 처리한 것에선 거의 callus는 생성되지 않았으며 2, 4-D 2mg/l 와 TDZ 0.7mg/l 를 처리시 높은 callus 생성율을 나타냈다. 하지만 2, 4-D 4mg/l +TDZ 0.7mg/l 에선 전혀 callus가 형성되지 않았다.

MSB₅ (MS salt+B₅ vitamins) 배지와 B₅ 배지를 기본으로하여 식물생장조절물질의 조성 및 농도를 달리한 조건으로 가시오갈피의 배를 배양한 실험결과 (Table 1, 2)와 비슷한 결과를 나타냈다. 식물생장조절물질의 단독처리시 MSB₅와 B₅ 배지에서 2, 4-D 2mg/l 를 처리하였을 때 가장 양호한 callus 생성율을 나타냈으며 TDZ의 처리시 저조한 calus 생성율을 나타냈다. 2, 4-D와 TDZ을 조합처리하였을 때에도 MS배지를 기본으로하여 실시한 실험결과와 비슷하게 나타나 2, 4-D 2mg/l +TDZ 0.7mg/l 처리시 가장 양호한 callus 생성율을 나타냈으며 B₅ 배지에서는 100%의 callus 생성율을 보였다. 따라서, TDZ은 callus 생성에 커다란 영향을 끼치지 못했고 고농도의 2, 4-D의 처리가 callus 생성에 효과를 나타내는 결과를 보였다.

Table 3. The effect of plant growth regulators on callus formation in MSB₅ medium from the immature embryo culture of *E. senticosus* after 30 days.

Plant growth regulator (mg/l)		No. of embryo incubated	No. of callus	Rate of callus formation (%)
2, 4-D	TDZ			
1		15	0	0.0
		9	7	77.9
	0.02	16	0	0.0
	0.7	9	0	0.0
0.1	0.02	17	3	17.7
	0.7	11	3	27.3
1	0.02	12	7	58.3
	0.7	20	17	85.0

Table 4. The effect of plant growth regulators on callus formation in B₅ medium from the immature embryo culture of *E. senticosus* after 30 days.

Plant growth regulator (mg/l)		No. of embryo incubated	No. of callus	Rate of callus formation (%)
2,4-D	TDZ			
1		14	0	0.0
2		8	6	75.0
	0.02	11	0	0.0
	0.7	10	1	10.0
0.1	0.02	12	4	33.3
0.1	0.7	9	1	11.1
1	0.02	15	13	86.7
2	0.7	7	7	100.0

2. 미숙배 배양으로부터 식물체 재분화

2,4-D, TDZ, IAA, NAA, BAP를 단독처리하여 30일간 배양하고 생성된 shoot 수와 길이에 대한 실험결과 (Table 5), 전반적으로 shoot 분화는 TDZ을 처리시 양호한 경향을 보였다. TDZ 0.2mg/l 와 0.7mg/l 의 처리는 auxin류인 2,4-D나 cytokinin류인 BAP의 처리보다 shoot의 분화가 2배 이상 양호한 경향을 보였고 TDZ 0.7mg/l 처리시 shoot수가 2.4개로 가장 양호하였다. 또한, TDZ 0.2mg/l 과 0.7mg/l 에서 multiple shoot가 생성되었다. TDZ이 shoot 분화촉진에 많은 영향을 끼친다는 결과가 나타났으며 이는 Javed (1992)¹²⁾ 등이 몇가지 geranium (*Pelargonium* × *Hortorum* Bailey) 변종식물들의 성숙종자를 배양하여 부정 줄기와 체세포형성능력을 살펴 본 실험에서 TDZ를 첨가한 모든 배지에서 multiple shoot가 생성되었다는 실험결과와 일치하였다. 뿌리분화는 TDZ 0.02 0.2mg/l, IAA 2mg/l 에서 간헐적으로 생성되었다. 그리고, 식물생장조절물질의 조합처리시 shoot 분화에 대한 실험결과 (Table 6), 2,4-D와 TDZ의 농도가 높아질수록 callus 생성율이 높아지는 실험결과와는 상반된 효과를 보였다. 2,4-D의 농도가 고농도인 4mg/l 처리에선 전혀 분화가 일어나지 않았으며 shoot 분화 및 신장은 저농도인

2,4-D 0.1mg/l 처리에서 양호한 결과를 나타냈다. 반면에 낮은 농도의 2,4-D와 TDZ이 처리되었을 때 shoot 분화가 잘되었으며, 이런 결과는

Table 5. The effect of plant growth regulators on the regeneration of shoots in MS medium from the immature embryo culture of *E. senticosus* after 30 days.

Plant growth regulator (mg/l)	No. of shoots	Shoot length (cm)
2,4-D	1	1.0±0.0
	2	1.0±0.0
	4	0.1±0.0
TDZ	0.02	2.1±0.2
	0.2	2.2±0.4
	0.7	2.4±0.5
	2.2	2.1±0.3
IAA	1	1.6±0.2
	2	1.9±0.2
NAA	1	1.0±0.0
	2	1.0±0.0
BAP	1	1.0±0.0
LSD (5%)	0.7	0.2

Table 6. The effect of the combination of plant growth regulators on the regeneration of shoots in MS medium from the immature embryo culture of *E. senticosus* after 30 days.

Plant growth regulator (mg/l)	No. of shoot	Shoot length (cm)
2,4-D 0.1+TDZ	0.02	1.6±0.2
	0.7	2.8±0.4
2,4-D 1+TDZ	0.02	1.4±0.2
	1	1.0±0.0
2,4-D 2+TDZ	0.7	1.0±0.0
	2	0.0±0.0
2,4-D 4+TDZ	0.02	0.0±0.0
	0.7	0.0±0.0
LSD (5%)	0.5	0.1

Berenice³ 등이 조직배양으로 아미의 재분화 연구를 통해 식물생장조절물질의 범위로서 BAP나 NAA보다 Thidiazuron이 보다 높은 활성도를 지녔고 shoot 분화도 양호하다고 보고한 것과 일치하였다.

MSB₅, B₅ 배지를 기본으로 하여 배배양시 형성된 shoot의 수와 신장에 대한 실험결과(Table 7), 전반적으로 B₅ 배지가 더 양호한 경향을 보였다. 그리고, auxin류인 2,4-D나 cytokinin류인 TDZ의 처리를 비교했을 때 MS 배지를 기본으로하여 실시한 실험결과(Table 5)와 거의 비슷하게 보여 TDZ의 처리가 더 줄기신장에 촉진시키는 결과를 나타냈고 최적조건은 B₅ 배지에 TDZ 0.02mg/l의 처리시 2.8개의 shoot와 0.76cm의 shoot 길이로 나타났다.

MSB₅, B₅ 배지를 기본으로하여 식물생장조절

물질의 조합처리시 shoot 신장에 대한 실험결과(Table 8)도 MS 배지를 기본으로하여 실시하였던 실험결과(Table 6)와 유사하게 나타났다. 저농도의 2,4-D를 처리하였을 때 shoot의 분화가 생성되었으며 MSB₅ 배지에선 2,4-D 0.1mg/l + TDZ 0.02mg/l 처리시 가장 양호한 shoot 생성을 보였으나 B₅ 배지에선 2,4-D 0.1mg/l + TDZ 0.7mg/l 처리시 가장 양호한 shoot 생성을 보였다. 그리고, 고농도인 2,4-D 2mg/l + TDZ 0.7mg/l 에선 전혀 shoot의 분화가 나타나지 않았다. 그러므로, auxin류인 2,4-D는 어느정도 농도가 높아질수록 callus의 생성율은 증가하지만 shoot의 분화는 억제하고 TDZ은 callus의 생성에 커다란 영향을 끼치지 못하지만 shoot 분화 및 신장에 뚜렷한 효과를 보이는 결과가 나타났다.

Table 7. The effect of plant growth regulators on the regeneration of shoots in MSB₅ and B₅ medium from the immature embryo culture of *E. senticosus* after 30 days.

Plant growth regulator (mg/l)		MSB ₅ medium		B ₅ medium	
		No. of shoot	Shoot length (cm)	No. of shoot	Shoot length (cm)
2,4-D	1	1.3±0.2	0.2±0.1	2.1±0.2	0.6±0.0
	2	1.0±0.0	0.1±0.0	1.0±0.0	0.1±0.0
TDZ	0.02	1.8±0.3	0.7±0.1	2.8±0.3	0.8±0.1
	0.7	1.7±0.1	0.6±0.0	1.6±0.1	0.6±0.1
LSD (5%)		0.5	0.2	0.5	0.2

Table 8. The effect of combination treatments of plant growth regulators on the regeneration of shoots in MSB₅ and B₅ medium from the immature embryo culture of *E. senticosus* after 30 days.

Plant growth regulator (mg/l)		MSB ₅ medium		B ₅ medium	
2,4-D	TDZ	No. of shoot	Shoot length (cm)	No. of shoot	Shoot length (cm)
0.1	0.02	2.1±0.4	0.3±0.1	1.6±0.9	0.6±0.2
0.1	0.7	1.5±0.1	0.3±0.0	2.0±1.1	0.7±0.2
1	0.02	1.0±0.0	0.1±0.0	1.0±0.0	0.1±0.0
2	0.7	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
LSD (5%)		0.6	0.1	0.8	0.5

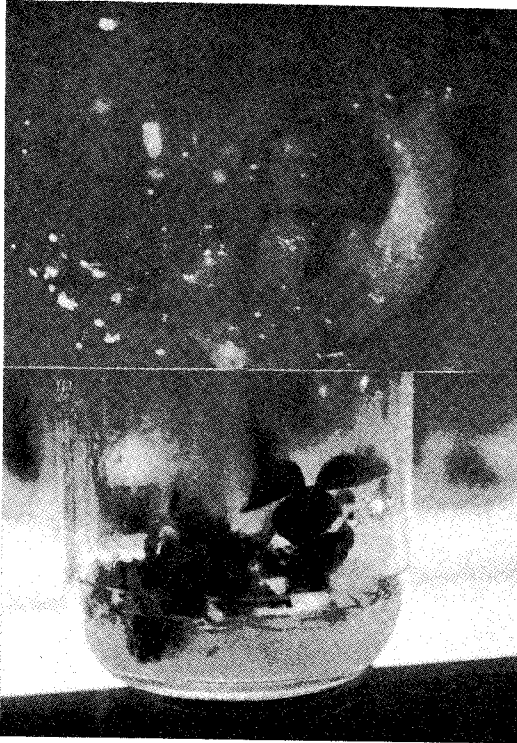


Fig. 1. Regeneration of shoot from the immature embryo of *E. senticosus*.

적 요

가시오갈피의 조직배양을 통한 대량증식방법 체계 확립의 방법으로 기내배양에서의 캘러스형성 및 식물체 분화에 영향을 미치는 배지와 식물생장 조절물질 및 농도의 최적조건을 구명코자 실시한 실험결과는 다음과 같다.

1. MS배지를 기본으로하여 여러 가지 식물생장 조절물질 (2,4-D, TDZ, IAA, NAA, BAP)을 단독 처리할 때 2,4-D 2mg/l 에서 callus 형성율이 45.5%로 가장 양호하였으며 shoot의 분화는 TDZ 처리시 양호하였으며 간헐적으로 multiple shoot와 root 분화가 생겼다.

2. MS배지를 기본으로하여 식물생장조절물질을 2,4-D와 TDZ의 조합처리시 callus 형성율은 2,4-D 2mg/l +TDZ 0.7mg/l 일때 가장 양호하였으며 shoot의 분화는 2,4-D의 농도가 낮고 TDZ의

농도가 높은 2,4-D 0.1mg/l +TDZ 0.7mg/l 에서 양호하였다.

3. 배지조성에 따른 callus형성은 B₅, MSB₅ 배지 모두 MS배지를 기본으로하여 실시한 실험과 마찬가지로 2,4-D 2mg/l +TDZ 0.7mg/l 에서 양호하였으며, B₅배지에서 2,4-D 2mg/l +TDZ 0.7mg/l 처리시 100%의 callus 형성율을 나타냈다. Shoot의 분화는 auxin류인 2,4-D보다 cytokinin류인 TDZ처리시 양호하였고 조합처리 또한 2,4-D의 농도가 낮은 2,4-D 0.1mg/l 일때 shoot분화가 형성되었으며 MSB₅ 배지에서 양호한 shoot의 분화가 형성되었다.

인 용 문 헌

1. Anna, K. Jager., and J. V. Staden. 1996. Somatic embryogenesis in *Encephalartos cycadifolius*. Plant Cell Reports 15 : 437 - 440.
2. Bhansali, R. R. 1990. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlets in *Pomegranate*. Ann. Botany. 66 : 249 - 253.
3. Bretagne, B., M. Chupeau, Y. Chupeau, and G. Fouilloux. 1994. Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source. Plant Cell Rep. 14 : 120 - 124.
4. Burkhart, L., and J. M. Meyer. 1990. Shoot proliferation of *Cercis canadensis* L. *in vitro* using thidiazuron and benzyladenine. Hortscience Abst. 25 : 88.
5. Capelle, S. C., D. W. S. Mok, S. C. Kirehner, and M. C. Mok. 1983. Effect of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N⁶-C²-isophenyl [8-¹⁴C] adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. Plant Physiol. 73 : 796 - 802.
6. Carla, E., V. Schaik, A. Posthuma, M. J. De Jeu, and E. Jacobsen. 1996. Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on immature embryos of *Alstroemeria* spp. L. Plant Cell Reports 15 :

- 377 - 380.
7. Charleen, M. B., R. E. Durham, J. A. Burns, W. A. Parrott, and H. Y. Wetzstein. 1995. High frequency somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using mature, dry seed. *Plant Cell Reports* 15 : 38 - 42.
 8. Dubits, D., G. Nemet, and Z. Haydu. 1975. Study of callus growth and organ formation in wheat (*Triticum aestivum*) tissue culture. *J. Can. Bot.* 53 : 957 - 963.
 9. Green, C. E., and R. L. Phillips. 1975. Plant regeneration from tissue culture of maize. *Crop Sci.* 19 : 457 - 460.
 10. 지형준. 1991. 생약원료 유통현황과 개선방향. 개방화에 대응한 약용식물의 안전생산과 연구방향. 농촌진흥청 작물시험장. 24 - 29 p.
 11. 황완균, 최수부, 길일혁. 1996. 가시오갈피 및 두충 혼합액기스의 생리활성. *생약학회지*. 27(1) : 65 - 74.
 12. Javed, A., Qureshi and P. K. Saxena. 1992. Adventitious shoot induction and somatic embryogenesis with intact seedlings of several hybrid seed geranium (*Pelargonium × hortorum* Bailey) varieties. *Plant Cell Reports* 11 : 443 - 448.
 13. Kanyand, M., A. P. Dessai, and C. S. Prakash. 1994. Thidiazuron promotes high frequency regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) plants *in vitro*. *Plant Cell Rep.* 14 : 1 - 5.
 14. 高橋周七. 1993. 杜仲茶健康法. 日本. 東京. 廣齋堂. 32 - 47 p.
 15. 김태수, 박호기, 박문수, 장영선, 박근용, 이만상. 1994. 가시오가피 번식에 관한 연구. II. 개화 결실에 관한 조직학적 관찰. *한국육종학회지* 26(별책 1호) : 132 - 133.
 16. 김태수, 박호기, 박문수, 장영선, 김선, 김종호, 성충기. 1994. 가시오가피 번식에 의한 연구. III. 미숙배 배양에 의한 캘러스 유기 및 식물체 재분화. *한국육종학회지* 26(별책 1호) : 134 - 135.
 17. 이정일 등. 1991. 국내약용식물 연구현황과 금후 연구방향. 개방화에 대응한 약용식물의 안정생산과 연구방향. 농촌진흥청 작물시험장. 19 p.
 18. Mok, M. C., D. W. S. Mok, J. E. Turner, and C. V. Muger. 1987. Biological and biochemical effects of cytokinin-activated phenylurea derivatives in tissue culture systems. *Hortscience* 22 : 1194 - 1197.
 19. Mok, M. C., S. C. Kim, D. J. Armstrong, and D. W. S. Mok. 1979. Induction of cytokinin autonomy by N-diphenylurea in tissue cultures of *Phaseolous lunatus* L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 : 3880 - 3884.
 20. 박문수. 1994. 약용식물 '가시오갈피' 실생번식기술개발. 후숙과 휴면타파과정 거쳐 종자 발아에 성공. *연구와 지도* 35(162) : 88 - 91.
 21. 박호기, 박문수, 김태수, 최인록, 장영선, 김규성. 1994. 가시오가피의 삼목번식방법. *약학지*. 2(2) : 133 - 139.