

生長調節物質이 柴胡 캘러스의 不定根 形成에 미치는 影響

成樂宣*·趙德以**·蘇雄永***

Effect of Plant Growth Regulators on the Adventitious Root Formation from *Bupleurum falcatum* Callus

Rack-Seon Seong*, Duck-Yee Cho** and Woong-Young Soh***

ABSTRACT : Calli induced from the leaf segment of *Bupleurum falcatum* were cultured on Murashige and Skoog's (MS) medium supplemented with 2, 4-D, IBA, IAA and NAA of 0.1 mg/l. The induction of adventitious roots from callus was the best in MS medium supplemented with 0.1 mg/l 2, 4-D and the lateral root was the same. The pretreatment of 0.1 mg/l 2, 4-D for 120 hours was most effective for the formation and growth of adventitious roots. The number of adventitious roots per micro callus pretreated with 0.1 mg/l 2, 4-D was 5.3 which was the highest level. The callus subcultured for 4 weeks were best for the adventitious root formation. The callus subcultured for more than 4 weeks decreased the adventitious root formation and turned to brown in color.

Key words : *Bupleurum falcatum*, Adventitious Root, Plant Growth Regulators

緒 言

組織培養을 통하여 有用한 藥用 또는 色素成分의 高含量 캘러스의 유도를 위하여, 藥用식물인 人蔘⁷⁻⁹⁾의 캘러스배양으로 ginsenoside Rb₁, Rg₁ 등의 saponin과 지치^{5, 6, 14)}의 懸濁培養細胞로부터 shikonin誘導體를, 또한 色素成分의 생산을 위하여 *Phytolacca americana*^{12, 24)}의 培養細胞로부터 betacyanin을, *Hibiscus sabdariffa*¹⁹⁾의 캘러스 배양으로 anthocyanin色素를 얻을 수 있다. 그러나 脫分化狀態에 있는 세포는 分化狀態에 있는 母植物

細胞의 二次代謝系가 그대로 발현되지 않는 경우 二次代謝産物을 얻을 수 없기 때문에²⁶⁾, *Scutellaria baicalensis*^{28, 29)}의 不定根 배양을 통하여 baicalin成分을 92%까지 증가시킬 수 있고, 특히 IAA나 kinetin과 같은 生長調節物質의 처리농도나 maltose등 添加物質의 영향에 따라서 二次代謝産物의 축적함량을 높일 수 있다는 보고가 있으며, *Digitalis purpurea*¹³⁾의 캘러스로부터 不定芽를 유도하여 digitoxin과 purpurea glycoside A를 생산하는 등의 器官發生을 유도하여 二次代謝産物의 함량을 높일 수 있다. 이와 같이 不定根이나 不定芽 등의 器官을 유도하므로써 二次代謝物質의 양을

* 食品醫藥品安全本部 生藥規格科 (Department of Herb Drug Standardization, Korea Food and Drug Administration, Choongbuk, 373-850, Korea)

** 又石大學校 生物學科 (Department of Biology, Woo Suk University, Chonbuk, 565-800, Korea)

*** 全北大學校 生物科學部 (Department of Biological Science, Chonbuk National University, Chonbuk, 560-756, Korea) < '96. 12. 7접수 >

높일 수 있다.

不定根 형성을 촉진시키기 위해서는 여러가지 物理化學的인 방법이 있지만^{14,16)}, 특히 2,4-D, IAA, IBA, NAA 등의 옥옥신류에 의하여 촉진되는 것이 일반적이다^{2,17)}. 그 중에서도 2,4-D는 不定根 유도에 있어서 培養期間, 켈러스의 크기 등에 따라 매우 민감하게 영향을 미치는 것으로 보고¹⁶⁾되어 있다. 또한 不定根에서도 主根만 형성되는 것이 아니라 側根도 활발하게 誘導되는데²⁷⁾ 側根의 형성을 활발하게 誘導하므로서 不定根의 양을 높일 수 있으나 아직 미흡한 실정이다.

따라서 본 실험은 柴胡의 켈러스로부터 不定根을 효과적으로 다량 형성하기 위하여 生長調節物質의 종류와 그에 따른 不定根의 主根 및 側根의 형성에 미치는 영향, 또한 生長調節物質의 前處理時間, 켈러스의 繼代培養期間 등에 대한 실험 결과를 정리하여 보고하고자 한다.

材料 및 方法

日本 近畿大學 種子센터에서 分讓받은 柴胡 (*Bupleurum falcatum* L.) 종자¹⁵⁾를 24시간동안 증류수에 침지시킨 뒤 vermiculite를 채운 화분에 파종하여 25±1℃, 1,900 lux 연속형광하에서 50일간 재배하여 40~50 mm정도된 잎을 채취하여 70% 에칠알콜에 1분간 일차살균한 후 2% sodium hypochlorite에 10분간 표면살균시킨 다음 멸균수로 씻어 절편의 크기를 4×5mm로 하여 MS기본배지²⁰⁾에 치상하였다. 배지는 MS기본배지에 agar 8g/l, sucrose 30g/l 를 첨가하여 사용하였으며, 最適 生長調節物質과 농도를 밝히기 위하여 2,4-D, NAA 및 IAA 각각이 농도를 Jo 등¹⁵⁾의 방법대로 조합처리하여 켈러스의 유도 및 형성상태를 조사하였다. 조제된 배지는 pH 5.6으로 조정한 후 121℃에서 15분간 멸균한 다음, 250ml 삼각프라스크에 50ml씩 분주하여 치상하였다. 배양조건은 組織培養用 材料植物의 파종시와 동일하게 하였다.

부정근 유도에 있어서 生長調節物質에 따른 영향을 밝히기 위하여 2,4-D 0.1 mg/l 가 첨가된 MS고체배지에서 증식된 켈러스를 2,4-D, IAA, IBA 및 NAA를 각 0.1 mg/l 씩 첨가한 MS액체배

지에 치상하여 4주간 배양한 후 형성된 不定根의 상태를 觀察하였다. 또한 側根의 형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 2,4-D 0.1 mg/l 로 120시간 처리한 액체배지에서 형성된 약 15 mm 정도 자란 부정근을 10 mm의 크기로 절단한 후 위와 같은 生長調節物質別로 처리방법으로 懸濁培養하였다. 한편 2,4-D 0.1 mg/l 의 농도에서 生長調節物質別로 120시간 前處理한 후 4주간 生長調節物質 無處理 MS배지에서 100 rpm으로 懸濁培養하여 不定根 형성상태를 관찰하였다. 2,4-D의 前處理 시간에 따른 영향을 밝히기 위하여 2,4-D 0.1 mg/l 가 첨가된 MS배지에 스테인레스 망으로 거른 균일한 크기의 선별된 마이크로 켈러스는 生長調節物質이 첨가되지 않은 MS배지에 4주간 繼代培養하여 不定根 발생시기 및 마이크로 켈러스당 발생된 부정근의 수와 길이를 관찰하였다. 배양조건은 켈러스 유도시와 동일하며 100 rpm으로 懸濁培養하였다. 켈러스의 繼代培養期間에 따른 효과를 조사하기 위하여 켈러스 유도 후 1, 4, 8, 12, 16 및 20週된 것을 위와 같은 조건에서 前處理하여 배양한 것의 不定根 형성상태를 관찰하였다.

結果 및 考察

生長調節物質別로 4주간 배양하여 不定根 誘導에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 1과 같이 2,4-D를 처리하였을 때 不定根 誘導에 매우 효과적이었으며 不定根의 상태도 양호하였고, 不定根의 길이도 길었다. 다음은 IAA, IBA순으로 나타났으며 NAA를 처리하였을 때는 가장 효과가 낮았으며 쉽게 褐變되는 경향이었다. 켈러스의 형성에 있어서 2,4-D 0.1 mg/l 의 농도에서 켈러스의 길이나 수가 현저하게 높게 나타나는 경향을 보이고 있는데 일반적으로 2,4-D 등의 옥옥신은 켈러스의 형성에 영향을 미치는 것으로 알려진 것과는 다르게 不定根의 형성에도 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

또한 不定根의 형성에 있어서 側根의 형성을 활발히 誘導하므로서 프라스크당 不定根의 획득율을 높게 할 수 있을 것으로 생각되어 側根 생성 수를 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 側根의 형성에서도 2,4-D를 처리하였을 때 側根의 수가 16.2개로 가

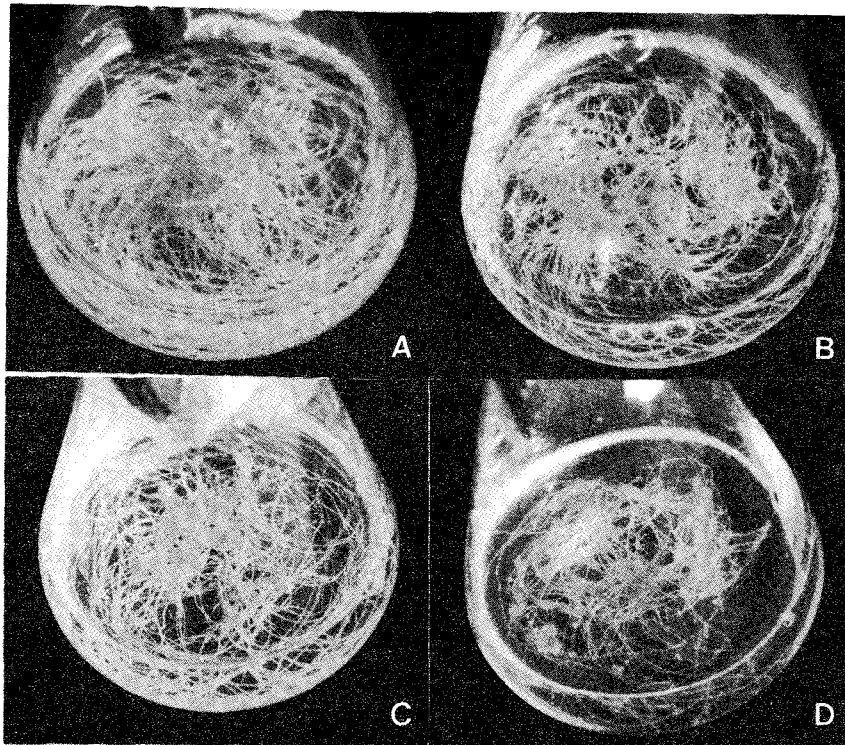


Fig. 1. Growth of adventitious roots induced for four weeks from the callus in MS medium supplemented with 2, 4-D (A), IBA (B), IAA (C) and NAA (D) of 0.1 mg/l, respectively.

장 효과적이었으며, 그 다음이 IAA, IBA 순으로 나타났고, NAA를 처리하였을 때 11.8개로 비교적 효과가 작았다. 따라서 生長調節物質의 種類 및 量 뿐만 아니라 그 組合과 比率에 따라 分化樣相이 다르게 나타남을 알 수 있는데 柴胡의 組織培養에 있어서 캘러스 誘導 및 增殖과 不定根형성에 있어서 2,4-D 0.1 mg/l 의 저농도 처리만으로 가능하다고 판단된다. 이것은 또한 Vinterhalter와 Vinterhalter²⁷⁾가 *Dracaena fragrans*의 배양에서 배지중의 무기염성분의 加減 등 外部條件에 따라서 側根의 형성에 영향을 받는다고 하였으나 본 실험은 側根의 형성이 生長調節物質의 종류나 농도에 따라서도 영향을 미치게 되는 것으로 나타났다.

캘러스를 生長調節物質別로 120시간 前處理하여 배양한 후 생성된 不定根의 수와 길이를 조사한 결과 (Fig. 3), 不定根의 수는 2,4-D로 처리하였을 때 3.7개로 가장 많이 생성되었고, 不定根의 길이는 IBA를 처리하였을 때 17.4cm로 다른 것보다 약간 길었으며, IAA나 NAA는 효과적이지 못하였다.

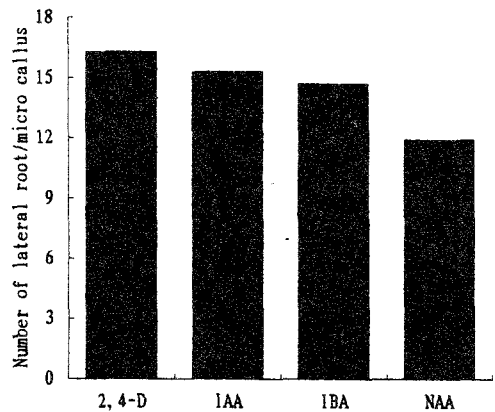


Fig. 2. The number of lateral root induced after 4 weeks culture at the various auxins. Adventitious roots were induced from the callus cultured in MS medium containing 0.1 mg/l 2,4-D, and cut into 1cm then placed to the medium containing 0.1 mg/l of 2,4-D, IAA, IBA and NAA, respectively.

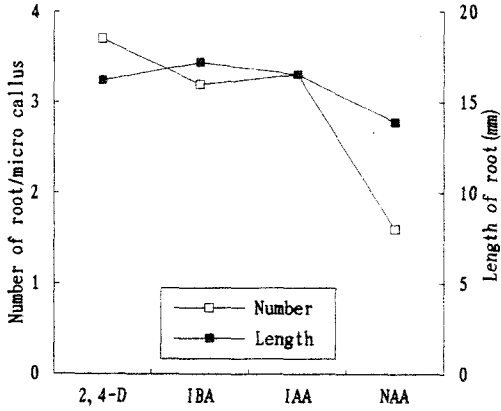


Fig. 3. The number of length of adventitious roots cultured in MS medium with various auxins. The roots were formed in hormone-free MS medium for 4 weeks culture, after pretreatment for 120 hours in MS medium containing 0.1 mg/l of 2,4-D, IBA, IAA and NAA, respectively.

따라서 켈러스로부터 不定根을 誘導하는 데에는 生長調節物質에 따른 영향을 가장 많이 받는 것으로 판단된다.

不定根 발생에 있어서 2,4-D의 前處理時間이 미치는 영향에 대하여 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 마이크로 켈러스당 不定根 수는 120시간 前處理시에 4.3개로 처리시간이 증가할수록 점진적으로 높게 나타났으나, 144시간 전처리시에는 4.2개로 약간 낮게 나타났다. 不定根의 길이도 120시간 전처리에 가장 길어지는(16.8cm) 경향으로 不定根 수에서와 동일한 경향을 보였다. 이와 같은 결과는 고구마를 재료로 한 실험에서 1.0 mg/l 2,4-D가 첨가된 배지에 1주일간 배양 후 MS기본배지에 繼代培養한 조직에서 不定根 發生頻도가 가장 높았으며 2,4-D가 첨가된 배지에 배양기간이 길어질수록 不定根 發生頻도가 낮아진다는 Liu 등¹⁸⁾의 보고와 유사한 경향으로서, 不定根 형성 초기에 일정시간의 2,4-D 前處理가 不定根原基 형성에 촉진적인 영향을 미치는 것으로 생각된다. 不定根 형성은 生長調節物質別 前處理時間에 따라서도 영향을 미치는 것으로 나타났다. Cho와 Soh²⁾는 강남콩 下胚軸

切片에 있어서 IAA에 의한 不定根 原基 형성이 절편 제작후 根原基 形成段階인 前半 24시간(0~24hr) 처리시가 後半 24시간(24~48hr)보다 더욱 효과적이라고 보고하고 있는 바, 이러한 결과는 柴胡의 켈러스로부터 不定根의 형성과정에 있어서 不定根 始源細胞 및 根原基 형성과정에만 저농도의 2,4-D가 영향을 미치며 伸長期에 있어서는 2,4-D가 오히려 阻害作用을 하는 것이라고 생각된다. 이것은 또한 대부분의 식물에 있어서 不定根의 誘導에 오옥신이 필요하나 이는 根原基 형성과정까지이고 이 根原基가 성장하기 위해서는 오옥신이 제거되어야 효과적이라는 Pierik²²⁾의 보고와 2,4-D는 不定根 형성에 있어서 根原基 형성만을 유도하므로 不定根이 伸長되려면 반드시 2,4-D가 제거되어야 한다고 하는 Reynold²³⁾의 보고와도 일치하는 결과이다. 즉, 켈러스로부터 根原基 形成時까지는 오옥신이 필요하다는 것을 의미하는 것이라고 본다. 그러나 오옥신이 不定根 形成에 미치는 영향에 대하여 Ohiyama와 Oka²¹⁾는 初期 始源細胞 및 根原基 形成段階까지는 阻害의이라고 하였으며, 不定根 형성 전과정 중 특히 根伸長段階에 있어서는 오옥신에 의해서만 촉진될 수 있다는 Shibaoka²⁵⁾의 보고와 根原基 形成期와 根原基가 不

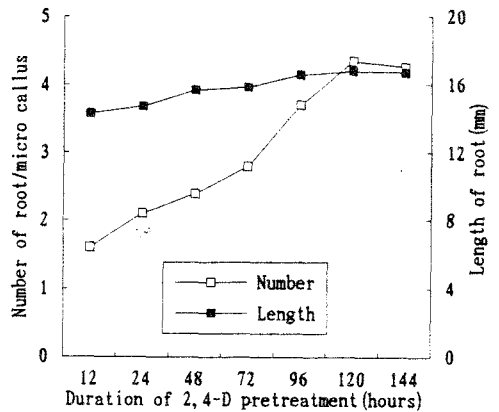


Fig. 4. Effects of the duration of 2,4-D 0.1 mg/l pretreatment on the number and length of adventitious roots. Data were collected after 4 weeks of culture on the hormone-free medium.

定根으로 伸長하는데는 오옥신이 촉진적인 영향을 미친다는 Davies 등⁴⁾의 보고 등 상반되는 경우도 있다. 그러므로 不定根 형성에 관한 오옥신의 영향은 材料植物의 種類, 材料의 年齡, 組織의 部位¹⁷⁾, 材料의 크기 및 培養중의 物理化學的인 環境¹¹⁾에 따라 달라지는 것을 시사하는 것이라고 생각된다.

繼代培養의 期間에 따른 不定根의 발생상태를 조사한 결과 (Fig. 5) 4주간 배양한 캘러스에서 不定根의 수가 5.3개로 가장 많이 형성되었다. 그러나 4주 이상 오래된 캘러스를 배양할 경우 길이는 伸長하였으나 不定根의 수는 감소되었고, 쉽게 褐變하는 경향을 나타내므로서 캘러스가 일정기간을 경과하면 不定根 형성에 효과적이지 못한 것으로 판단된다. 이와 같은 경향은 *Ficus pumila*⁴⁾와 *Solanum carolinense*²³⁾로부터 器官分化時에 적정농도 이상의 오옥신은 뿌리의 길이, 數 및 뿌리의 伸長을 감소시켰으나 2,4-D첨가배지에서 적정시간 배양 후 호르몬이 첨가되지 않은 MS기본배지로 옮겼을 때 촉진적이라는 연구 결과와 마찬가지로 繼代培養期間이 짧은 캘러스가 기내에서 장기간 유지된 캘러스에 비해 器官分化能이 높고 캘러스로부터 根原基 형성에는 적정농도의 오옥신이 요구되지만, 이러한 根原基로부터 뿌리 伸長段階에는 필수적으로 오옥신을 제거해야 되는 것으로 생각된다.

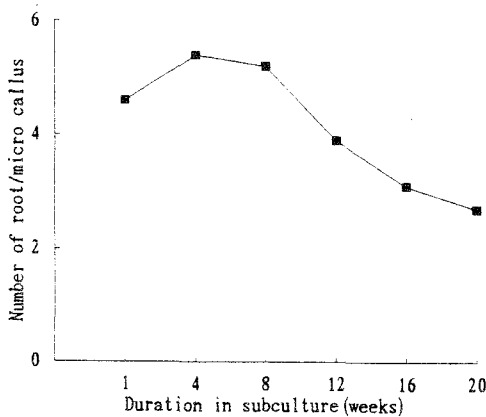


Fig. 5. Effects of the duration subculture of callus on the adventitious root formation. The callus were pretreated in MS medium containing 0.1 mg/l 2,4-D for 120 hours.

摘 要

柴胡 (*Bupleurum falcatum* L.) 캘러스로부터 不定根 形成에 미치는 生長調節物質의 영향을 조사하였다. 柴胡의 不定根 誘導에는 2,4-D 0.1 mg/l가 가장 좋았으며, 不定側根의 형성에서도 동일하였다. 또한 生長調節物質別로 일정시간 前處理하여 生長調節物質 無處理 培地에 치상하였을 때 2,4-D前處理에서 캘러스 형성이 가장 좋았다. 시호의 마이크로 캘러스를 120시간 전처리하여 生長調節物質 無處理培地에 배양하는 것이 不定根 形成이 양호하였으며, 4주 간격으로 繼代培養하는 것이 캘러스 형성에 가장 효과적이었다.

引用文獻

1. Bae H. H., S. G. Kim, D. Y. Cho, W. Y. Soh and R. S. Seong. 1994. Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on adventitious root formation from callus of *Bupleurum falcatum* L. and its histological observation. J. Korean Plant Tissue Culture. 21 (1) : 41 - 46.
2. Cho, D. Y. and W. Y. Soh. 1981. Effect of endogenous IAA transport on adventitious root formation in *Phaseolus vulgaris* hypocotyl cuttings. J. Korean Bot. 32 : 323 - 330.
3. Davies, F. J. and J. N. Joiner. 1980. Growth regulator effects on adventitious root formation in leaf bud cuttings of juvenile and mature *Ficus pumila* L. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105 : 91 - 95.
4. _____, J. E. Lazarte and J. N. Joiner. 1982. Initiation and development of root in juvenile and mature leaf bud cuttings of *Ficus pumila* L. J. Amer. Bot. 69 : 804 - 811.
5. Fuijita, Y., Y. Hara, C. Suga and T. Morimoto. 1981. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Plant Cell Rep. 1 : 61 - 63.

6. _____, M. Tabata, A. Nishi and Y. Yamada. 1982. New medium and production of secondary compounds with the two-staged culture method. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. 399-400.
7. Furuya, T., H. Kojima, K. Syono, T. Ishii, K. Uotani and M. Nishio. 1973. Isolation of saponins and sapogenins from callus tissue of *Panax ginseng*. Chem. Pharm. Bull. 21(1) : 98-101.
8. _____, T. Yoshikawa, T. Ishii and K. Kajii. 1983. Regulation of saponin production in callus cultures of *Panax ginseng*(1). Planta Medica. 47 : 200-204.
9. _____, _____, Y. Orihara and H. Oda. 1983. Saponin production in cell suspension cultures of *Panax ginseng*. Planta Medica. 48 : 83-87.
10. Geuns, J. M. C. 1988. Synergism between IAA and corticalin in the adventitious root formation in mung bean cuttings. J. Plant Physiol. 132 : 370-377.
11. Gonzalez, A., A. Casares, T. R. Sanchez and R. Rodriguez. 1991. Adventitious root induction in *Corylus avellana* L. cotyledon slices *in vitro*. Cell Dev. Biol. 279 : 125-131.
12. Hirose, M., T. Yamakawa, T. Kodama and A. Kormamine. 1990. Accumulation of betacyanin in *Phytolacca americana* cells and of antocyanin in *Vitis* sp. cells in relation to cell division in suspension cultures. Plant Cell Physiol. 31 : 267-271.
13. Hirotsu, M. and T. Furuya. 1977. Restoration of cardenolide-synthesis in redifferentiated shoots from callus cultures of *Digitalis purpurea*. Phytochem. 16 : 610-611.
14. Ikenaka, T., K. Mimura, H. Ohashi and S. Kikuta. 1989. Growth and naphthoquinone pigment production in *Lithospermum erythrorhizon*(II). Effect of night temperature. Shoyakugaku Zasshi. 43(1) : 83-85.
15. Jo, P. H., R. S. Seong, H. H. Bae, W. Y. Soh and D. Y. Cho. 1990. Saikosaponin contents in *Bupleurum falcatum* root produced by tissue culture. J. Korean Pharmacogn. 21(3) : 205-209.
16. Kim, S. G., D. Y. Cho and W. Y. Soh. 1995. Saikosaponin content in adventitious root formed from callus of *Bupleurum falcatum* L. J. Korean Plant Tissue Culture. 22(1) : 29-33.
17. Ladeinde, T. A. O. and W. Y. Soh. 1991. Effect of different growth regulators on organogenesis and total fresh weight gain in cultured leaf tissue of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Phytomorph. 41 : 99-107.
18. Liu, J. R., S. R. Min and S. G. Yang. 1992. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid at a single concentration determining various morphogenesis patterns in shoot apical meristem cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas*). J. Korean Plant Tissue Culture. 19(3) : 167-170.
19. Mizukami, H., M. Nakamura, K. Tomita, K. Higuchi and H. Ohashi. 1991. Effects of macronutrients on anthocyanin production in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) callus cultures. Plant Tissue Culture Lett. 81(1) : 14-20.
20. Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-497.
21. Ohiyama, K. and S. Oka. 1980. Bud and root formation in hypocotyl segments of *Broussonetia kazinoki* Siev *in vitro*. Plant Cell Physiol 21(3) : 487-492.
22. Pierik, R. L. M. 1987. Adventitious root

- formation in vitro culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. pp 203 - 209.
23. Reynolds, T. L. 1986. Somatic embryogenesis and organogenesis from callus culture of *Solanum carolinense*. J. Amer. Bot. 73 : 914 - 918.
 24. Sakuta, M., T. Takagi and A. Komamine. 1986. Growth related accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca americana* L. J. Plant Physiol. 125 : 337 - 343.
 25. Shibaoka, H. 1971. Effects of indoleacetic, P-chlorophenoxyisobutylic and 2, 4, 6-trichlorophenoxyacetic acid on three phase of rooting in azukia cuttings. Plant & Cell Physiol. 12 : 193 - 209.
 26. Soh, W. Y. and U. D. Yeo. 1986. 식물배양 세포에 있어서 분화와 물질 생산. '86 국내의 한국과학기술자 학술회의 하계 symposium 논 문집. 337 - 340.
 27. Vinterhalter, D. and B. Vinterhalter. 1992. Effect of inorganic nutrition on the formation of lateral roots in *Dracaena fragrans* Ker-Gawl cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 28 : 267 - 274.
 28. Yamamoto, H., T. Sano, S. Takeuchi, M. Tanaka and T. Tomimori. 1989. Flavonoid production by two-stage cultures and differentiated roots of *Scutellaria baicalensis* callus in liquid medium. Shoyakugaku Zasshi. 43(2) : 188 - 191.
 29. _____, _____ and T. Tomimori. 1989. Growth and flavonoid formation of *Scutellaria baicalensis* callus cultures in liquid medium. Shoyakugaku Zasshi. 43(2) : 87 - 92.