

삼지구엽초의 다량번식을 위한 기내 식물체 분화

한영희 · 최병렬 · 소호섭 · 이성재 · 최영진 · 김세영^{1*}

경기도농업기술원, ¹경희대학교 생명과학부

In Vitro Plant Regeneration for Mass Propagation of *Epimedium koreanum* Nakai

Young-Hee Han, Byoung-Ryoul Choi, Ho-Seob Soh, Seong-Jae Lee, Young-Jin Choi, and Se-Young Kim^{1*}

Kyonggido ARES, Hwasong 445-972, Korea

¹School of Life Science and Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea

*corresponding author

ABSTRACT As an endeavor to establish a micropropagation system for *Epimedium koreanum* Nakai., this study was carried out to define methods to disinfect its explants and media for callus induction, proliferation and plant regeneration. The lowest infection rates by fungi or bacteria on apical and axillary bud explants of rhizome were observed when they were immersed in 0.3% NaOCl solution for 20 min after soaked in 0.1% AgNO₃ solution for 30 min, but leaf explants were seldom infected with fungi or bacteria by this disinfectant method. The highest rate of plantlet formation was obtained from the explants disinfected in 0.3% NaOCl solution for 20 min after soaked in 0.1% AgNO₃ solution for 60 min for tip buds and in 0.1% AgNO₃ solution for 30 min for axillary buds of rhizome. Induction rate of callus was the highest from the explants disinfected in 0.3% NaOCl solution for 20 min after soaked in 0.2% AgNO₃ solution for 15 min. Callus growth was proper in a modified 1/2 MS medium including half strength of NH₄NO₃ with 0.02–0.2 mg · L⁻¹ BA and 2.0 mg · L⁻¹ NAA. Low rate of plantlet regeneration was obtained in 1/2 UM or 1/2 White medium with 2.0 mg · L⁻¹ BA and 0.2 mg · L⁻¹ NAA.

Additional key words: *Berberidaceae*

서 언

삼지구엽초(*Epimedium koreanum* Nakai.)는 매자나무과(*Berberidaceae*)에 속하는 속근초로서 오래 전부터 한약재로 이용되어 왔으며(농촌진흥청, 1989) n-alkanes, sterols, flavonoids 등 여러 성분을 함유하고 있다. 이 중 flavonoid인 icariin이 주성분으로 한방에서는 강정, 항암, 항바이러스, 이노 등에 효능이 있는 것으로 알려져 있다(강 등, 1988, 1994). 삼지구엽초는 강원, 경기, 평안남북도, 함경남북도에 자생하고 있으나(송 등 1989), 자생종을 무분별하게 채취하여 점차 소멸되어가고 있는 실정이며 생태계 보존과 수요충족을 위해 작물화에 대한 재배법이 절실히 요구되고 있다. 번식은 종자가 미립종이어서 노지 발아가 어려워 지하부의 근경을 이용하고 있다(농촌진흥청, 1989; 송 등, 1989).

노지에서의 삼지구엽초 번식시험은 근경절편묘 다량번식용 상토와 발근, 재식기, 근경절편 길이 등의 시험이 이루어졌으나 대량번식은 어려운 실정이다(최와 강, 1996). 삼지구엽초에 대한 기내 다량번식 시험은 *E. dipyllum*에서의 flavonol glycoside 물질생산을

위해 2,4-D로 캘루스를 유도, 배양한 바 있고(Yamamoto 등 1992), 최 등(1998)은 다양한 식물생장조절제 처리에 의해 줄기와 엽조직에서 식물체 재분화를 통한 다량번식이 시도한 바 있으나 다량번식체계는 아직 확립되지 못하였다.

본 시험은 삼지구엽초에 대한 다량번식을 위해서 절편체 살균방법, 캘루스 유도 및 증식, 식물체분화 적정배지를 구명하여 기내 다량번식 가능성을 알아보고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 배양 절편체의 살균

공시재료는 경기도 농업기술원 내의 전특작 포장에서 생육중인 삼지구엽초를 11월에 수확하여 근경 벤레이트-T 200배액에 소독한 후에 수태로 감싼 후 비닐봉지에 넣어 4℃에서 60일간 저온처리한 후에 근경의 정단과 액아를 채취하여 사용하였으며, 엽은 포장에서 생육중인 막 전개된 어린잎을 채취하여 사용하였다. 근경의 정단과 액아는 여러 쪽으로 절단하여 흐르는 수돗물에 세척한 후에

수돗물과 세제를 담은 비이커에 넣어 씻고 다시 흐르는 물에 씻었다. 근경에 있는 세균은 모두 제거한 후에 정단과 액아를 포함한 조직을 각 3cm 정도 크기로 절단하였다. 이와 같이 조제한 시료와 유엽 시료는 70% 에탄올에 30초간 침적한 후에 멸균수로 3회 세척하였다. 정단, 액아, 유엽의 살균액 처리는 0.5% NaOCl에 30분, 0.1% AgNO₃ 30분과 1시간, 0.2% AgNO₃ 15분간과 30분 동안 1차 살균한 후에 멸균수로 5회 세척한 다음 0.5% NaOCl에 30분간 처리는 0.3% NaOCl에 30분간, AgNO₃ 4처리는 0.3% NaOCl에 20분간 2차 살균한 후에 멸균수로 1차 살균배와 마찬가지로 세척하였으며 각각의 살균액에 Tween-20을 넣고 진탕하였다. 살균된 재료는 배지에 치상하여 120일간 배양하였다. NH₄NO₃량을 표준량에 비해 1/2로 낮춘 1/2 MS 배지에 NAA 0.2mg · L⁻¹과 BA 2.0mg · L⁻¹을 첨가하고 agar 8g · L⁻¹과 sucrose 30g · L⁻¹을 첨가하여 사용하였다. 배양조건은 형광등을 광원으로 사용하여 500lx에 16시간 일장과 23±5℃에서 배양하였다.

생육조사는 진균과 박테리아의 오염률, 고사율, 식물체 분화 및 캘러스 유도율을 조사하였으며 진균 및 박테리아의 오염 판정은 진균은 육안으로, 박테리아인 경우 배양조사로 판정한 후, 같은 증상은 육안으로 판정하였다.

2. 캘러스 증식

공시재료는 실험 1에서 얻은 캘러스를 이용하여 배지에 치상하여 55일간 배양하였다. 처리배지는 변형 1/2 MS 배지에 NAA 0, 0.02, 0.2, 2.0과 BA 0, 0.02, 0.2, 2.0 mg · L⁻¹을 단용 또는 혼용 첨가한 배지를 사용하였다. 배양조건은 형광등을 광원으로 사용하여 500lx에 16시간 일장과 23±5℃에서 배양하였다.

3. 식물체 분화

공시재료는 실험 2에서 얻은 캘러스를 이용하여 처리는 변형된 1/2 MS와 MS, 1/2 UM, 1/2 LS, 1/2 SH, 1/2 White 배지 등(정,

1996)에 NAA 0.2와 BA 2.0 mg · L⁻¹을 각각 첨가한 6가지의 배지를 사용하였으며 배양조건은 형광등을 광원으로 사용하여 500lx에 16시간 일장과 23±5℃에서 배양하였다. 생육조사는 배양 후 50일에 식물체 분화를 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 배양 절편체의 살균

살균제의 1차와 2차 살균처리방법에 의해 절편체별 고사율과 감염률을 보면 모든 절편체는 0.5% NaOCl 용액에서 30분간 침지한 1차 살균 후에 0.3% NaOCl 용액에서 30분간 침지하여 2차 살균하는 것이 가장 고사율이 낮았다. AgNO₃의 1차 살균처리구에서는 0.1%와 0.2% 농도에서의 단기처리에서 고사율이 낮았지만 유엽에서는 모든 처리에서 전체적으로 고사율이 높았다. 진균과 세균류에 대한 감염률은 근경의 정단과 액아의 경우, 1차 살균을 저농도 AgNO₃에 장시간 처리했을 때 가장 낮았고 유엽에서는 모든 처리에서 감염이 거의 발견되지 않았다. NaOCl 처리는 0.2% AgNO₃ 15분간 처리를 제외하고는 AgNO₃에 비해 진균과 세균류에 대한 감염률이 높았다(Table 1).

살균제의 처리방법에 의해 절편체별 캘러스 유도 및 식물체 분화를 보면 근경의 정단과 액아에 대한 캘러스 및 식물체 분화는 0.1% AgNO₃에 30-60분간 1차 살균 후에 0.3% NaOCl 20분간 처리와 0.5% NaOCl에 30분간 1차 살균 후 0.3% NaOCl 30분간 처리한 것이 식물체 분화 및 캘러스 형성이 좋았으며, 특히 근경의 정단은 0.1% AgNO₃에 60분간 1차 살균한 경우와 액아는 0.1% AgNO₃에 30분간 1차 살균 후 0.3% NaOCl 20분간 처리한 것이 식물체 분화가 가장 좋았다. 그렇지만 유엽은 모든 처리구에서 살균액으로 인해 고사율이 높았으며 캘러스 유도율은 농도는 높으나 단기간 동안 살균한 0.2% AgNO₃ 용액에 15분간 1차 처리한 후 0.3% NaOCl 20분간 처리한 절편체에서 26%로 가장 높았다. 성

Table 1. Withering and infection rate after disinfectant treatments on explants of *E. koreanum* Nakai.

Explant	Disinfectant treatment	Withering rate (%)	Infected rate (%)	
			Fungi	Bacteria
Apical bud in rhizome	0.5% NaOCl 30 min+0.3% NaOCl 30 min	10	20	30
	0.1% AgNO ₃ 30 min+0.3% NaOCl 20 min	17	17	33
	0.1% AgNO ₃ 60 min+0.3% NaOCl 20 min	17	17	17
	0.2% AgNO ₃ 15 min+0.3% NaOCl 20 min	9	64	18
	0.2% AgNO ₃ 30 min+0.3% NaOCl 20 min	27	27	27
Axillary bud in rhizome	0.5% NaOCl 30 min+0.3% NaOCl 30 min	6	50	22
	0.1% AgNO ₃ 30 min+0.3% NaOCl 20 min	25	31	19
	0.1% AgNO ₃ 60 min+0.3% NaOCl 20 min	31	25	6
	0.2% AgNO ₃ 15 min+0.3% NaOCl 20 min	29	29	12
	0.2% AgNO ₃ 30 min+0.3% NaOCl 20 min	38	25	13
Leaf	0.5% NaOCl 30 min+0.3% NaOCl 30 min	81	2	0
	0.1% AgNO ₃ 30 min+0.3% NaOCl 20 min	81	0	0
	0.1% AgNO ₃ 60 min+0.3% NaOCl 20 min	100	0	0
	0.2% AgNO ₃ 15 min+0.3% NaOCl 20 min	74	0	0
	0.2% AgNO ₃ 30 min+0.3% NaOCl 20 min	95	0	0

Table 2. Effect of disinfectant treatment on callus induction and plantlet formation from explants of *E. koreanum* Nakai.

Explant	Disinfectant treatment	Callus induction	Plantlet formation
		(%)	(%)
Apical bud of rhizome	0.5% NaOCl 30 min+0.3% NaOCl 30 min	10	30
	0.1% AgNO ₃ 30 min+0.3% NaOCl 20 min	0	33
	0.1% AgNO ₃ 60 min+0.3% NaOCl 20 min	8	42
	0.2% AgNO ₃ 15 min+0.3% NaOCl 20 min	0	9
	0.2% AgNO ₃ 30 min+0.3% NaOCl 20 min	9	9
Axillary bud of rhizome	0.5% NaOCl 30 min+0.3% NaOCl 30 min	0	22
	0.1% AgNO ₃ 30 min+0.3% NaOCl 20 min	0	25
	0.1% AgNO ₃ 60 min+0.3% NaOCl 20 min	19	19
	0.2% AgNO ₃ 15 min+0.3% NaOCl 20 min	12	18
	0.2% AgNO ₃ 30 min+0.3% NaOCl 20 min	19	6
Leaf	0.5% NaOCl 30 min+0.3% NaOCl 30 min	17	0
	0.1% AgNO ₃ 30 min+0.3% NaOCl 20 min	19	0
	0.1% AgNO ₃ 60 min+0.3% NaOCl 20 min	0	0
	0.2% AgNO ₃ 15 min+0.3% NaOCl 20 min	26	0
	0.2% AgNO ₃ 30 min+0.3% NaOCl 20 min	5	0

과 환(1994)은 anthurium의 지하부에 있는 액아를 0.5% NaOCl 30분간 1차 살균 후 0.3% NaOCl 30분간 살균시에 오염률이 높지만 고사율은 낮고 식물체 분화율이 높다고 보고한 바 있다. 한편 삼지구엽초를 포장에서 소독하지 않고 5°C에 60일간 저장한 후에 살균된 근경의 정단과 액아의 절편체는 세균오염으로 극히 낮은 생존율을 보인 바 있다(한 등, 1996).

따라서 Table 1과 2의 결과를 종합할 때, 삼지구엽초의 살균은 근경의 정단과 액아 절편체는 고농도 살균에서 크기가 비교적 작은 눈에 심하게 영향을 미치지만 저농도에서는 비교적 고사율이 적었으며 잎 절편체가 살균액과의 접촉표면적이 커서 고사율은 1차 살균액 농도가 높더라도 처리시간이 짧은 것이 생존율이 높은 것으로 생각되었다. 살균액 간에는 AgNO₃가 NaOCl보다 진균과 박테리아에 감염이 낮은 경향을 보였으며 또한 처리시간이 길거나 농도가 높으면 식물체로의 분화보다 켈루스가 유도되는 경향을 보였다. 배양시 모두 켈루스가 유도되는 잎은 모든 처리에서 살균액의 농도가 적정 농도보다 높았다고 생각되어 보다 낮은 살균액의 농도와 시간이 구명되어야 할 것으로 생각되었다.

2. 켈루스 증식

삼지구엽초의 유도된 켈루스를 BA와 NAA가 첨가된 1/2 MS 배지에 계대배양, 증식된 결과는 Table 3과 같다. 갈변 고사율은 BA 농도간에는 차이가 없었으나 NAA 농도간에는 농도가 높을수록 낮았으며 BA 0.02mg·L⁻¹과 NAA 2.0mg·L⁻¹의 혼용처리에서는 갈변고사된 배양체는 발견되지 않았다. 켈루스 생장물은 BA 농도간에는 0.2mg·L⁻¹가, NAA 농도간에는 2.0mg·L⁻¹에서 높았으나 BA 0.02-0.2mg·L⁻¹과 NAA 2.0mg·L⁻¹ 혼용 첨가된 처리에서 가장 좋은 증식을 보였다(Fig. 1A). 삼지구엽초의 켈루스 생장은 BA에서 효과적이었으며 두 성장조절제의 혼용처리에서 보다 더 효과적이었다. 삼지구엽초의 켈루스 생육은 치상 후 30일이 지나면 급격하게 갈변물질이 생성되어 고사하는 경향을 보였고 또한

Table 3. Effect of BA and NAA on callus growth in subculture of *E. koreanum* Nakai.

	Growth regulator		Withering rate (%)	Callus growth ^z
	BA (mg·L ⁻¹)	NAA (mg·L ⁻¹)		
0		0	32	1.6
		0.02	14	1.5
		0.2	10	1.3
		2.0	0	2.5
0.02		0	15	2.3
		0.02	14	1.9
		0.2	13	2.1
		2.0	0	2.6
0.2		0	7	2.5
		0.02	15	2.3
		0.2	8	2.3
		2.0	26	2.6
2.0		0	13	1.9
		0.02	15	2.2
		0.2	21	2.3
		2.0	8	2.3

^zCallus growth: 1, poor; 2, average; 3, excellent

Table 4. Effect of culture medium on plantlet regeneration from callus 50 days after culture of *E. koreanum* Nakai.

Medium	Callus (%)	Callus growth ^z	Leaf formation (%)	Plantlet formation (%)
1/2 MS	64	2.8	16	0
1/2 UM	84	2.9	1	8
1/2 LS	72	2.2	3	0
1/2 SH	52	2.0	13	3
1/2 White	47	1.7	29	0
MS	43	2.6	36	0

^zCallus growth: 1, bad; 2, poor; 3, average; 4, good; 5, excellent

일부 켈루스는 엽육조직으로 분화되는 경향을 보였다.

Yamamoto 등(1992)은 *E. dipylum*의 켈루스 유도에 2,4-D가 효과적이라고 보고하였고, 최 등(1998)은 BA와 NAA 혼용처리에

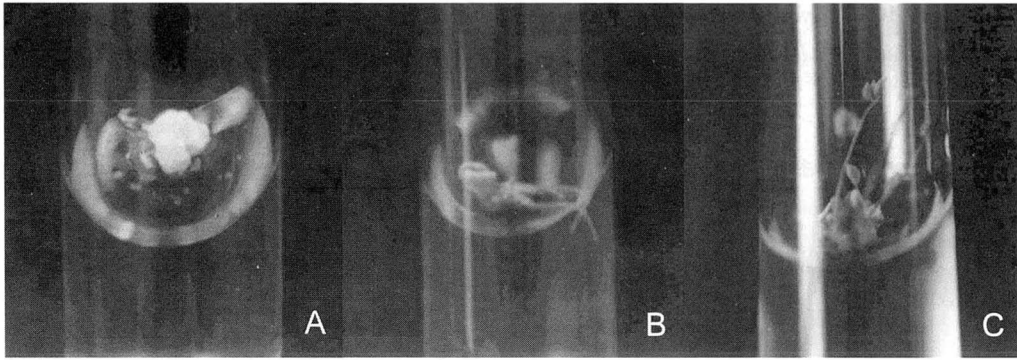


Fig. 1. Plant regeneration from culture of *E. koeanum* Nakai. A, callus induction; B, multishoot; C, plantlet.

서 켈루스 유도를 보고한 바와 같이 본 시험의 결과도 유사한 경향을 보여 BA $0.02\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 와 NAA $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 이상에서 켈루스 증식이 적절하다고 생각되었다.

3. 식물체 분화

NAA $0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 과 BA $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 을 혼합첨가한 각각의 배지에 켈루스를 치상한 후 50일 후에 관찰된 식물체 분화는 Table 4와 같다. 식물체 분화는 1/2 UM 배지와 1/2 SH배지에서 각각 8%와 3% 분화되었다. 그러나 대부분의 배지에서는 켈루스 상태로 증식되었으며 이중 1/2 UM, 1/2 LS배지가 켈루스 증식률이 가장 높았고 또한 생장은 1/2 UM배지와 1/2 MS 배지가 가장 높았다. 한편 켈루스 증식률이 낮은 MS 배지, 1/2 White 배지에서는 엽육조직으로 분화되었으며 특히 MS 배지는 1/2 MS 배지보다 엽육조직으로의 분화가 배 이상 되었다(Fig. 1B, C).

최 등(1998)은 MS 배지에 각각 $10\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 농도의 BA와 NAA 혼합첨가, NAA와 thidiazuron의 각각 $0.1 - 1.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 혼합첨가 처리에서 식물체가 분화되었다고 보고하였다. 본 시험에서는 MS 배지에서 BA와 NAA의 저농도 조합에서 분화된 식물체를 얻지 못하였지만 동일한 성장조절제를 첨가한 다른 배지에서 식물체를 얻었다.

따라서 비록 매자나무과의 삼지구엽초는 기내배양이 어렵다고 알려져 있지만 켈루스를 형태적으로 분리하여 1/2 UM배지에 성장조절제 처리를 달리하여 치상하면 식물체로 분화될 가능성을 보였고, 또한 분화된 식물체는 장기간 배양하면 근경형태로 되어 증식할 가능성을 보였다. 한편 식물체분화에 의한 다량증식보다 켈루스나 엽육형태로 분화가 된 조직은 세포를 분리하여 icariin 함량을 조사, Yamamota 등(1992)이 flavonol glycoside 물질을 생산하는 방법과 같이 2차 대사물질 생산을 고려해 볼 만한 것으로 생각되었다.

초 록

본 연구는 삼지구엽초에 기내 다량증식체계의 설정을 위한 일환으로 절편체 별 살균방법, 성장조절제 종류 및 농도에 의한 켈루스

의 증식과 배지를 달리한 식물체 분화 조건을 구명하고자 수행하여 얻어진 결과 진균과 박테리아에 의한 감염률은 근경의 정아와 액아에서 0.1% AgNO_3 용액에 60분간 침지한 1차 살균 후 0.3% NaOCl 용액에 20분간 2차 살균한 처리가 가장 낮았으며 앞에서는 모든 처리에서 거의 오염이 발생되지는 않았지만 74% 이상이 고사되었다. 식물체 분화는 당년 지하부에서 자란 근경의 정단이 0.1% AgNO_3 용액에 30-60분간 침지한 1차 살균 후 0.3% NaOCl 용액에 20분간 2차 침지살균한 처리에서 가장 높았으며 1년 이상 지하부에서 자란 근경의 액아는 0.1% AgNO_3 30분간 1차 살균 후 0.3% NaOCl에 20분간 2차 살균한 처리에서 식물체 분화가 높았지만 callus와 식물체 분화는 0.1% AgNO_3 60분간 1차 살균 후 0.3% NaOCl에 20분간 2차 살균한 처리에서 가장 높았다. 앞은 0.2% AgNO_3 15분간 1차 살균 후 0.3% NaOCl에 20분간 2차 살균한 처리에서 켈루스 유도율이 가장 높았다. 계대배양시 켈루스 생장은 변형된 1/2 MS배지에 BA $0.02 - 0.2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 과 NAA $2.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 혼합첨가한 처리에서 증식률이 가장 높았다. 켈루스로부터 식물체분화는 대부분 켈루스 상태로 증식되고 일부는 엽육조직으로 분화되었지만 1/2 UM 배지와 1/2 SH 배지에서 각각 8%와 3%가 식물체로 분화되었다.

추가 주요어 : 매자나무과

인용문헌

- 강삼식, 신국현, 정선관, 조의환. 1988. 음양곽의 Flavonoid 성분에 관한 연구. 생약학회지 19:93-96.
- 강창성, 양장식, 박영철, 조은제. 1994. 차광조건과 생산지에 따른 삼지구엽초의 유효성분 Icarin 함량 분석. 경기농업연구 7:57-61.
- 농촌진흥청. 1989. 원색도감 한국의 자생식물(초본류). p. 195.
- 성문석, 한영희. 1994. 안스리움 기내다량번식 시험. 경기도농업기술원 연구보고서. p. 392-400.
- 송주택, 정현배, 김병우, 진희성. 1989. 한국식물대보감(상권). 한국자연식물연구소. 제일출판사. p. 950.
- Yamamoto, I.I., K. Ieda, S.I. Tsuchiya, K. Yan, T. Tanaka, M.

- Iinuma, and M. Mizuno. 1992. Flavonol glycoside production in callus cultures of *Epimedium diphyllum*. *Phytochemistry* 32:837-840.
- 정재동. 1996. 최신 생물공학(식물편 I). p. 44-54.
- 최강준, 노준현, 김승경. 1998. 삼지구엽초 체세포조직의 재분화에 대한 생장조절제의 영향. 약용작물학회 발표요지. p. 24-25.
- 최병렬, 강승원. 1996. 삼지구엽초 다량번식 재배방법 개발. 경기도농업기술원 연구보고서. p. 390-397.
- 한영희, 소호섭, 최병렬, 안영희. 1996. 삼지구엽초의 배양용 절편체 살균시험. 경기도농업기술원 연구보고서. p. 572-575.