식물생명공학회지 제32권 제4호
Korean J. Plant Biotechnol.
Vol. 32, No. 4, 281~285 (2005)

산호수 (*Ardisia pusilla* DC.)의 기내 대량번식

강관호[1,2*], 오월선[1,2], 구대회[3], 은종선[2], 김형무[2]
[1]오윤바이오텍, [2]전북대학교 농업생명과학대학, [3]원예연구소 화훼과

In vitro Mass Propagation of *Ardisia pusilla* DC.

Gwan-Ho Kang[1,2*], Owel-Sun Oh[1,2], Dae-Hoe Goo[3], Jong-Seon Eun[2], Hyung-Moo Kim[2]
[1]Ohyoonbiotech Co., Kongju 314-833, Korea
[2]College of Agriculture & Life Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
[3]National Horticultural Research Institute, RDA, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT To establish the mass proliferation system of *Ardisia pusilla* DC, the shoot tips of *Ardisia pusilla* DC were cultured on the MS and half-strength MS medium supplemented with 0~5.0 mg/L BA or 0~0.5 mg/L thidiazuron(TDZ), respectively. A few multiple shoot formation observed when the shoots were cultured on MS medium containing TDZ. However, the frequency of multiple shoot formation was reached up to 82.4%, when the shoots were cultured on half-strength MS medium supplemented with 0.5 mg/L BA. Also the number of shoot per explant was 7.1. To promote rooting from multiple shoot, newly formed shoots were transferred to half-strength MS medium containing 0.5 mg/L IBA or 0.5 mg/L NAA, respectively. Regenerated plantlets were grown to normal mature plants in soil.

Key words: *Ardisia pusilla*, BA, micropropagation, shoot tip, thidiazuron

서 론

산호수 (*Ardisia pusilla* DC.)는 우리나라 남부 해안지방과 제주도에서 자생하고 있는 자금우 (*Ardisia*)속 식물로써 해발 300 m 이하의 남부 해안지대의 상록수림에서 자라며 상록 소관목으로 지하경 끝이 지상경으로 되며 줄기에 적갈색 털이 빽빽이 나는 식물이다 (Kim 1996). 산호수는 백량금이나 자금우에 비하여 열매가 더 크고, 색깔이 고우며, 윤기가 나고, 잎의 모양도 독특하며 6월에 꽃이 핀 후 9월에 열매가 성숙하여 다음해 꽃이 필 때까지 떨어지지 않아 연중 붉은 열매를 감상할 수 있는 특징이 있다. 산호수의 열매는 자신, 가족, 이웃의 사랑실천운동의 상징인 "사랑의 열매"라는 의미가 있으며, 한해를 시작할 시기에 가까이 두면 재수가 좋다는 길상목이지만 그다지 주목받지 못하고 있었다. 최근 산호수에 대한 관심이 높아지면서 지피식물용, 실내분식용, 실내조경용 및 실내공기정화용으로 소비되는등 수요가 계속적으로 증가하고 있다. 또한 일부화훼농가에서 관엽 식물로 출하하여 화훼소비자나 일본 수출바이어로부터 호평을 받고 있으나 수출할 수 있을 만큼 수량을 확보하지 못하고 있는 실정이다.

산호수의 번식방법은 주로 삽목법 (Lee 2002; Lee et al. 2005)이 쓰이고 있으나 그 수량에는 한계가 있고, 증식률이 낮으며 일시에 균일한 대량의 식물체를 얻기 어렵기 때문에 대량번식체계의 확립이 필요하다. 번식방법 중 종자번식을 할 때 당년에 채종하여 즉시 파종한 경우 90.7%의 발아율을 보였으나 1개월 저온 저장한 경우에는 25.2%의 발아율을 보여 (Lee 2002) 채종 즉시 직파해야 하는 번거러움이 있으며 균일한 생육이 어렵고 또한 종자로 번식된 산호수는 지피식물로 이용시 광택이 나는 잎만 감상할 수 있으며, 꽃이나 열매 등의 색감을 빠른 시기에 볼 수 없어 실내조경용으로 적합하지 않다. 이와 같이 산호수에서는 영양번식이나 종자번식의 단점으로 인하여 새로운 대량번식체계의 개발이 요청되고 있다. 조직배양에 의하여 번식된 식물체는 분지가 많고 생육이 왕성하며, 조직배양된 모본에서 채취한 삽수는 강한 생장력을 가지고 있다고 보고되어 있다 (Hackett 1985; Han et al. 1997; Han et al. 2004). 그러나 산호수에 대한 증식 및 재배연구는 아직

*Corresponding author Tel 041-857-4758 Fax 041-857-4759
E-mail: plant_kgh@naver.com

미미한 실정이며, 조직배양을 통한 대량증식의 연구는 전무한 실정이다. 따라서 산호수의 조직배양을 통하여 우수하고 균일한 묘를 대량생산 할 수 있는 기내번식의 조건을 확립하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

실험재료는 전남 완도 해안지대에서 자생하고 있는 산호수 (*Ardisia pusilla* DC.)를 사용하였으며, 생장이 왕성한 신초 경정을 채취하여 전개된 엽은 모두 제거하고 2 cm 정도가 되도록 정리하여 소독하였다. 소독은 신초 경정을 70% 에틸알코올에 1분간 침지한 다음 멸균수로 3회 세척하였으며 10% (v/v) NaOCl 용액에 10분간 침지하여 감압살균을 한 다음 멸균수로 3회 세척 하였고 다시 70% 에탄올에 30초간 침지한 후 멸균수로 3회 세척하였다. 소독 후 신초경정을 5~10 mm 크기로 절취하여 각각의 배지에 치상한 후 온도는 22±1℃로 조절되는 배양실에서 약 20 $\mu Mm^{-2}sec^{-1}$의 광도로 16시간/일 조명하면서 배양하였다.

배지조성

배지는 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지와 1/2MS 배지를 이용하였고, 각각의 배지에 sucrose 20 g/L와 활성탄 1 g/L가 첨가하였다. 모든 배지는 pH를 5.7로 조정하고 120×80mm (SPL Phytohealth 310120)의 배양용기에 80 mL의 배지를 분주하였으며, 121℃에서 15분간 고압멸균하여 사용하였다.

식물체의 증식 및 발근

산호수의 경정 생장에 미치는 생장조절물질의 영향을 비교하고자 BA 0~5.0 mg/L , TDZ 0~0.5 mg/L를 첨가하여 비교실험 하였다. 또한 BA 0.5 mg/L가 첨가된 1/2 MS 배지에 sucrose 10~35 g/L를 첨가하여 4주간 sucrose 농도가 다아체의 형성 및 캘러스 발생에 미치는 영향을 조사하였으며, 기내에서 형성된 신초를 발근시키기 위하여 1/2 MS 배지에 IBA 0.1~2.0 mg/L와 NAA 0.1~2.0 mg/L를 처리하여 발근정도를 비교하였다. 배양용기 당 25개의 절편체를 배양하여 처리 당 배양용기 5개로 5반복하였고, 배양 8주 후 신초 수, 신초 길이, 발근 수, 발근 길이 등을 조사하였다. 배양조건은 22±1℃로 조절되는 배양실에서 약 20 $\mu Mm^{-2}sec^{-1}$의 광도로 16시간/일 조명하면서 배양하였다. 산호수가 내음성이 강한 반음지성 식물이기 때문에 일반적으로 제시되는 배양조건과는 달리 온도와 광도를 낮추어서 수행하였다. 식물체의 토양 순화는 뿌리와 신초가 발달한 정상적인 식물체를 원예용상토를 사용한 포트에서 실시하였다.

결과 및 고찰

산호수의 경정을 MS 배지와 1/2MS 배지에 BA 및 TDZ를 각 농도별로 처리한 후 배지에 치상하여 배양하였다 (Table 1). MS 기본배지에서는 신초의 개수가 0.9개였으며, BA 첨가배지에서 신초수는 3.7~5.7개 정도로 양호했으나, TDZ 첨가배지에서는 신초수가 1.1~1.5개로 BA첨가배지와 비교하여 적었다. 그러나 TDZ 첨가배지가 BA 첨가배지에 비하여 캘러스 형성이 과다하였다. 1/2MS 배지에서는 MS배지와 마찬가지로 신초 수는 BA 첨가 배지가 양호하였고, 캘러스형성도 마찬가지로 TDZ에서 높게 나타났다. 산호수의 초대배양은 1/2MS배지에 BA 0.5~2.0 mg/L 첨가배지가 MS배지에 비하여 신초 수가 많았으며, 특히 BA 0.5 mg/L를 첨가한 배지에서 신초 수가 7.1개로 가장 많았고 82.4%의 높은 multiple shoot 유도율을 보였으며, 생육도 다른 첨가구에 비해 빠른 경향으로 나타났다 (Table 1, Figure 1).

MS배지보다 1/2MS배지에서 생장이 더 양호한 것은 산호수의 자생지가 남부해안가로 질소원이 부족한 곳에서 잘 자라기 때문에 배지 내 질소원인 NH_4^+와 NO_3^-의 함량차이에 의한 것으로 판단되며, 이들 질소원은 세포 및 조직의

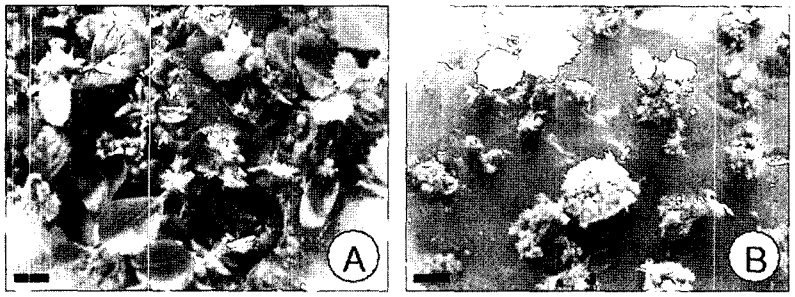

Figure 1. *In vitro* propagation of *Ardisia pusilla*. A, Multiple shoot formation from shoot tips in MS medium with 0.5 mg/L BA and 20 g/L sucrose; B, Callus formation from shoot tips in 1/2 MS medium with 0.05 mg/L TDZ and 20 g/L sucrose. Bars = 1 cm.

Table 1. Effects of plant growth regulators on shoot formation from shoot tip explant of *Ardisia pusilla* DC. after 8 weeks of culture

Medium	Cytokinin (mg/L)	Callus formation[x]	Frequency of shoot formation(%)	No. of shoots /explant	Shoot length (cm)
MS	Control	+	9.6±5.4[y]	0.9±0.2	0.5±0.2
	BA 0.2	++	52.0±8.9	3.7±0.4	1.9±0.5
	0.5	++	72.8±5.9	5.7±1.1	2.9±0.5
	1.0	++	66.4±6.1	5.3±0.8	2.3±0.6
	2.0	+++	64.0±5.7	5.6±0.4	1.9±0.4
	5.0	+++	66.4±5.4	5.6±1.0	1.8±0.8
	TDZ[z] 0.01	+++	14.4±2.2	1.2±0.5	0.9±0.5
	0.05	+++	18.4±3.6	1.5±0.3	1.2±0.1
	0.1	+++	13.6±3.6	1.2±0.1	1.1±0.1
	0.5	+++	12.8±3.3	1.1±0.5	1.4±0.4
1/2 MS	Control	+	12.0±2.8	1.4±0.1	0.4±0.2
	BA 0.2	++	73.6±9.2	3.9±0.4	3.4±0.2
	0.5	++	82.4±4.6	7.1±0.5	3.7±0.4
	1.0	++	80.8±8.7	5.6±0.4	3.9±0.3
	2.0	+++	70.4±8.8	5.8±0.5	3.6±0.6
	5.0	+++	64.8±5.2	5.1±1.1	4.1±0.8
	TDZ[z] 0.01	+++	20.0±4.9	1.3±0.1	1.2±0.1
	0.05	+++	19.2±4.4	1.4±0.2	1.4±0.1
	0.1	+++	16.8±3.3	1.1±0.1	1.4±0.2
	0.5	+++	17.6±5.4	1.2±0.1	1.3±0.1

[z] thidiazuron
[y] data represent the mean ± SE
[x] +: poor, ++: moderate and +++: good

생장과 유용물질 생산에 상당한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Liu and Zhong 1997; Kwon et al. 2003; Bae et al. 2004).

시토키닌은 보편적으로 지하부의 발육을 억제하고 지상부의 생육을 촉진한다고 알려져 있으며 (Pennazio 1975), 시토키닌 중에서 BA는 활성이 높아 많은 화훼작물의 증식에 사용되고 있으며 (Earle and Langhans 1974; Kusey 1980; Takayama and Misawa 1982; Han et al. 1997), TDZ는 기내배양된 식물의 생장이나 분화에 시토키닌과 유사한 효과를 나타내고 특히 목본류의 부정아 유도와 액아의 분열촉진에 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Lu 1993; Mok et al. 1987). 또한 원형질체로부터 체세포배를 형성시키고 이로부터 식물체를 재생시키는 능력이 옥신이나 기타 시토키닌 보다 월등히 우수하며 (Tegeder et al. 1995), 많은 식물 종에서 분열조직의 형성 및 신초증식을 촉진시키는 시토키닌 중 매우 우수한 효과를 나타나는 것으로 입증 되었고 (Reynolds 1987), 포도의 액아배양에서는 줄기형성 촉진의 효과가 보고되어 (Gribaudo and Fronda 1991) 있다. 그러나 본 연구에서 목본류인 산호수에 TDZ를 처리하였으나 분열조직의 형성 및 신초증식 등의 효과가 나타나지 않았으며, 오히려 BA가 더욱 효과적인 것으로 나타났다. Han 등 (2004)은 *Philodendron* 배양에서 BA의 농도가 증가할수록 캘러스의 발생이 증가하였으나, 발생한 캘러스가 다아체 절편체를 덮어 부정아의 증식 및 신초의 발생을 오히려 억제시켰다고 보고하였는데 산호수 초대배양에서도 BA의 고농도 처리 (2.0~5.0 mg/L)와 TDZ가 첨가된 배지에서는 캘러스발생이 과다하여 신초 발생을 억제시켰다 (Table 1).

산호수 신초 증식 시 발생하는 캘러스를 억제하기 위하여 배지의 sucrose 농도를 달리하여 4주간 배양한 결과 캘러스 형성은 sucrose 35 g/L 첨가구에서 많았으며, sucrose 농도가 낮을수록 캘러스 발생이 적었다 (Table 2). Sucrose 20 g/L 첨가배지에서는 multiple shoot 유도율이 80.8%로 가장 양호하였고, 신초수가 4.7개, 신초길이 3.9 ㎝로 신초의 증식, 생장 및 다아체 형성이 양호하였고, 캘러스 발생이 효과적으로 억제되었다 (Table 2). 이는 Han 등 (2004)이 *Philodendron wend-imbe* 기내배양에서 배지의 sucrose농도가 낮을수록 캘러스 발생이 억제된다는 보고와 유사한 경향이었다.

형성된 다수의 신초를 신장 시키고 발근하기 위하여 신초

Table 2. Effect of sucrose on shoot proliferation and callus formation from segment of *Ardisia pusilla* after 4 weeks culture with 1/2 MS medium containing 0.5 mg/L BA

Sucrose (mg/L)	Callus formation[y]	Frequency of shoot formation(%)	No. of shoots /explant	Shoot length (cm)
10	+	64.0±6.3[z]	1.9±0.2	1.5±0.2
15	++	70.4±8.3	3.0±1.2	2.6±0.4
20	+++	80.8±5.9	4.7±0.4	3.9±0.5
25	+++	78.4±6.7	4.4±1.1	3.6±0.5
30	++++	76.8±4.4	3.6±0.3	2.7±0.4
35	++++	76.0±7.6	4.1±0.5	2.2±0.4

[z] data represent the mean±SE

[y] +: poor, ++ :moderate, +++: good and ++++: excellent.

Table 3. Effects of IBA and NAA on elongation and rooting of shoots of *Ardisia pusilla* DC. after 8 weeks with culture on 1/2 MS medium

Auxin (mg/L)		No. of shoots /explant	Shoot length (cm)	No. of roots /explant	Root length (cm)
Control		1.0±0.1[z]	3.5±0.4	1.0±0.4	4.8±0.4
IBA	0.1	1.1±0.1	3.6±0.5	1.3±0.3	4.7±0.4
	0.5	1.4±0.1	4.0±0.7	1.5±0.4	9.3±0.8
	1.0	1.1±0.2	4.4±0.3	1.1±0.1	5.3±0.2
	2.0	1.1±0.1	3.5±0.4	1.2±0.1	5.4±0.6
NAA	0.1	1.2±0.5	3.7±0.4	1.3±0.1	5.1±0.4
	0.5	1.5±0.3	4.7±0.5	1.6±0.4	10.7±1.8
	1.0	1.2±0.1	4.6±0.3	1.4±0.3	10.4±1.9
	2.0	1.1±0.5	4.6±0.4	1.4±0.2	9.1±0.7

[z] data represent the mean±SE.

가 형성되는 부위를 잘라 1/2MS 배지에 IBA 0.1~2.0 mg/L와 NAA 0.1~2.0 mg/L가 첨가된 배지에 신초를 배양한 결과 (Table 3, Figure 2), IBA와 NAA 첨가배지 모두에서 생육 및 발근이 양호하였다. 신초의 형성은 1~2개 정도로 적었다. 따라서 NAA, IBA 0.5 mg/L 수준으로 1/2 MS 배지에 첨가하면 발근과 신초의 생장에 효과적이었으며, IBA 또는 NAA 0.5 mg/L가 첨가된 배지에서 신초 수가 각 1.4 및 1.5개로 다른 첨가배지에 비해 많았고, 뿌리수도 각 1.5 및 1.6개로 다른 첨가배지에 비해 많았다. 8주간 배양한 신초의 길이 및 뿌리의 길이에서는 NAA 0.5 mg/L 첨가배지가 IBA 0.5 mg/L첨가 배지 보다 약간 양호한 경향을 보였으나 그 차이는 매우 미미 하였다. 또한 대량증식을 위해 8주간 배양시켜 형성된 산호수의 신초를 2 cm 정도로 잘라서 다시 1/2 MS 배지에 NAA 0.5 mg/L가 첨가된 배지에 5주간 배양하여 신초와 뿌리 형성이 정상적으로 발달하는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 2). 따라서 초대배양은 1/2 MS 배지에 BA 0.5 mg/L와 sucrose 20 g/L를 첨가하여 부정아를 유도시키고 신초를 발근시키기 위해 1/2 MS배지에 IBA 0.5 mg/L 나 NAA 0.5 mg/L가 첨가된 배지에서 sucrose 20 g/L를 첨가하여 뿌리를 발근시키는 것으로 기내번식 체계를 확립시켰다. 토양 순화는 잎과 뿌리가 잘 발달한 유식물체를 원예용 상토에 옮겨 약 90%의 습도를 유지시킨 결과 모든 개체가 정상적인 형태로 성장하였다 (Figure 2E). 이상의 결과로 우리나라 자생식물인 산호수의 조직배양에 의한 증식이 가능해졌고, 산호수의 우량 묘목을 대량으로 생산 공급할 수 있는 기반을 마련했으며, 같은 자금우과 식물인 자금우와 백량금도 조직배양을 통한 대량증식이 가능할 것이라 판단된다.

적 요

우리나라 자생식물인 산호수 (*Ardisia pusilla* DC)를 기내에서 대량증식하기 위하여 초대배양으로 산호수 경정을 MS, 1/2MS 배지에 BA와 TDZ의 농도를 달리하여 첨가된 배지에 치상하여 배양하였다. 무기염류를 달리한 배지와 생장조절물질 농도를 다르게 한 배지 중 1/2MS 배지에 BA 0.5 mg/L가 첨가된 배지가 신초 수 7개 이상으로 증식이 양호하여 산호수의 초대배양에 적정배지로 나타났다.

TDZ를 첨가한 배지에서는 캘러스형성이 과다하여 부정아

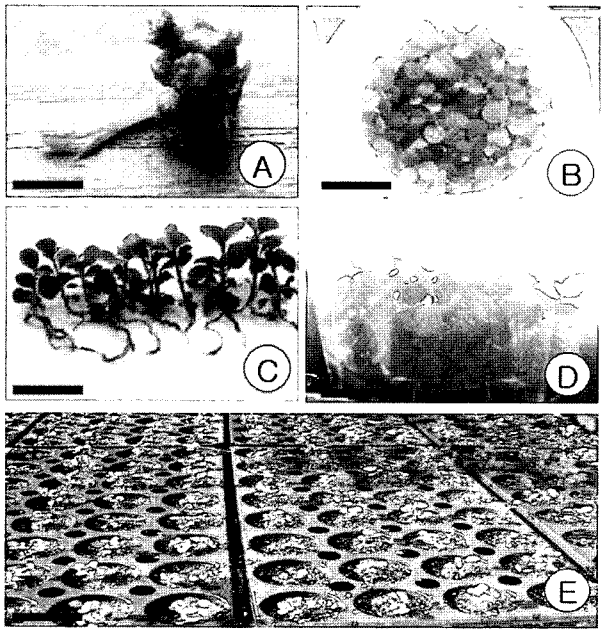

Figure 2. Shoot formation and plant regeneration of *Ardisia pusilla* DC. A, Adventitious multi-bud clusters and shoot formation on 1/2 MS medium containing 0.5 mg/L BA and 20 g/L sucrose (bar=1 cm)); B, C Shoot (bar=3 cm) and root (bar=1.5 cm) on 1/2 MS medium containing NAA 0.5 mg/L and 20 g/L sucrose; D, Shape after 4 weeks of culture on 1/2 MS medium containing NAA 0.5 mg/L and 20 g/L sucrose (bar=3.5 cm); E, Acclimatization of plantlets in soil (bar=5.7 cm).

형성을 오히려 방해하여 BA 첨가배지보다 신초증식이 양호하지 못하였다. 신초의 증식을 위해 1/2 MS 배지에 BA 0.5 mg/L와 sucrose의 농도를 달리하여 첨가한 결과, sucrose 농도 20 g/L를 첨가한 배지에서 신초의 증식, 생장 및 다아체 형성이 양호하였다. 형성된 신초의 발근은 1/2MS 배지에 IBA, NAA를 각각 첨가한 배지를 사용하였는데 두 가지 옥신류에서 0.5 mg/L의 농도에서 신초의 생장과 발근이 양호하였다.

잎과 뿌리가 잘 발달한 유식물체를 원예용 상토에 옮겨 키웠을 때 모든 개체가 정상적인 형태로 성장하였다.

인용문헌

Bae KH, Kim YS, Jeong JH, Kim YS, Choi YE, Yoon ES (2004) Induction of hariy root and bioreactor culture of *Lysium chinense*. Kor J Plant Biotech. 31: 295~300

Earle ED, Langhans RW (1974) Propagation of *Chrysanthemum in vitro*. I. Multiple plantlets from shoot tips and the establishment of tissue culture. J Amer Soc Hort 99: 128-132

Gribaudo I, Fronda A (1991) Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated in vitro. Hort Sci 26:103

Hackett WP (1985) Juvenility, maturation and rejuvenation in wood plants. Hort Rev 7: 109-158

Han BH, Joung HY, Ko JY (1997) *In vitro* propagation of *Ficus benjamina* by shoot tip culture. J Kor Soc Hort Sci 38: 315-319

Han BH, Yae BW, Goo DH, Yu HJ (2004) Micropropagation of Philodendron wend-imbe through adventitious multi-bud cluster formation. Kor J Plant Biotechnol 31: 115-119

Kim TJ (1996) Korean Resources PlantsⅢ. Seoul National University Publisher, Korea

Kwon JH, Chen HC, Yang DC (2003) Production of ginsenoside in callus of ginseng hairy roots J Ginseng Res 27: 78-85

Kusey WE, Hammer PA, Weiler TC (1980) In vitro Propagation of *Gypsophila paniculata* L 'Bristol Fairy'. HortScience 15: 600-601

Lee CH, Kwon OK, Kim YJ (2005) Rooting characteristics of stem tip cuttings in *Ardisia pusilla* as influenced by cutting stage, rooting medium, temperature, and plant growth regulator pretreatment. J Kor Soc Hort Sci 46 : 217-224

Lee SA (2002) A study on the characteristics and propagation method of *Ardisia pusilla* DC. Master's Thesis, Sungkyunkwan university.

Liu S, Zhong JJ (1997) Simultaneous production of ginseng saponin and polysaccharide by suspension cultures of *Panax ginseng*: Nitrogen effect. Enzyme Microb Technol 21: 518-524

Lu CY (1993) The use of thidiazuron in tissue culture. In Vitro Cell Dev Biol 29: 92-96

Mok MC, Mok DWS, Tumer JE, Mujer CV (1987) Biological and biochemical effects of cytokinin active phenylurea derivatives in tissue culture systems. Hort Sci 22: 1194-1196

Murashige T, Skoon F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-479

Pennazio S (1975) Effect of adenine and kinetin of development of carnation tips cultured *in vitro*. J Hort Sci 50: 161-164

Reynolds JF (1987) Chemical regulation in tissue culture; An overview. Hort Sci 22: 1192-1194

Takayama S, Misawa M (1892) Regulation of organ formation by cytokinin and auxin in Lilium bulb scales grown *in vitro*. Plant Cell Physiol 23: 67-74

Tegeder M, Gebhardt D, Schieder O, Pickardt T (1995) Thidiazuron induced plant regeneration from protoplasts of *Vicia faba* cv. Mythos. Plant Cell Rep 15: 164-169

(접수일자 2005년 9월 23일, 수리일자 2005년 12월 5일)