

기내배양 백출 교잡종 ‘다출’(Dachul, *Atractylodes macrocephala* x *A. japonica*)에 미치는 생장조절제처리효과

고우리, 조준형*, 박춘근¹, 안영섭¹, 박충범¹

동국대학교 바이오환경과학과, ¹국립원예특작과학원 약용작물과

Effect of Plant Growth Regulators on *in vitro* Cultured *Atractylodes* Hybrid ‘Dachul’ (*A. macrocephala* x *A. japonica*)

Woo-Li Koo, Joon-Hyeong Cho*, Chun-Geon Park¹, Young-Sup Ahn¹ and Chung-Berm Park¹

Department of Biological and Environmental Science, Dongguk University, Seoul 100-175, Korea

¹Department of Herb Crop Resources, NIHHS, RDA, Eumseong 369-873, Korea

Abstract - This study was conducted to establish the tissue culture system for *Atractylodes* plant which is most frequently used in oriental medicine. Root and auxiliary bud of Dachul cv., which is *Atractylodes* hybrid (*A. macrocephala* x *A. japonica*), were used as target tissues for *in vitro* culture. In root culture, callus induction rate was higher in the treatment of BAP combined with NAA than others, however, 2-iP was more effective for callus proliferation and root induction. Although calli were effectively induced from the root and proliferated in lower concentration of cytokinin combined with higher auxin, root tissue was inappropriate for shoot regeneration. For plant regeneration with axillary bud, BAP combined with NAA was more effective than 2-iP with NAA or IBA. Number of regenerated plant per bud was 3.8, which was highest, and stem diameters was shown as 5.0mm under the conditions of 1 mg/L BAP combined with 1 mg/L NAA. Although, plant height was tend to be higher in 2-iP than BAP, number of the regenerated plant was lower via versus. Furthermore, root proliferation of regenerated plant was more effective in higher concentration of sucrose (7%) than in lower concentration (3%). In results, auxiliary bud was an efficient target tissue for producing regenerated plant of *Atractylodes* under the conditions of 1 mg/L BAP combined with 1 mg/L NAA and higher concentration of sucrose was effective for root proliferation of regenerated plants.

Key words - *Atractylodes* hybrids, Dachul cultivar, *A. macrocephala*, *A. japonica*, Micropropagation, Plant growth regulators

서 언

삼주(*Atractylodes* spp.)는 국화과 삼주속의 다년생 초본 식물로, 한국, 일본, 중국 등 동아시아 지역에서 널리 이용되는 약용식물이다. 삼주속 식물에는 *A. lancea*, *A. chinensis*, *A. ovate*, *A. japonica*, *A. macrocephala* 등 총 5종이 있으며, 우리나라의 『대한약전 제 9개정』에서는 *A. japonica*, *A. macrocephala* 그리고 *A. ovata*를 백출로, *A. lancea*와 *A. chinensis*를 창출로 규정하는 반면, 중국에서는 *A. macrocephala*만을 백출로 분류하며, *A. japonica*, *A. lancea* 및 *A. chinensis* 등은 창출로 규정하

고 있다(Lee *et al.*, 2002; 식품의약품안전청, 2007).

*A. macrocephala*와 *A. japonica*의 근경은 1.5%의 휘발성 정유성분을 포함하며, 주성분은 atractylone, atractylenolide(I, II, III), 3β-hydroxyatractylone 및 3β-acetoxyatractylone 등이 함유되어 있다(Chung *et al.*, 2004). 백출의 주요 효능은 정장, 이뇨, 발한, 한선, 간 조직의 재생촉진, 진통, 항진균, 항염증 등으로 보고되고 있다(Kim *et al.*, 2002).

국내 자생종인 *A. japonica*는 종자 결실율이 매우 낮고, 근경의 성장 속도가 느리며, 생산량이 적은 문제점이 있다. 따라서 1990년대 초반부터 *A. macrocephala*가 도입되어 국내농가에서 재배되고 있으나, 습해에 약하고 뿌리병 등

*교신저자(E-mail) : jhcho@dongguk.edu

으로 인한 문제로 재배 생산량이 많지 않아 수입에 의존하고 있는 실정이다(Lee *et al.*, 1998; Bang *et al.*, 2004).

따라서 백출의 재배적 문제점을 해소하고 뿌리병 피해 감소와 수량성 향상을 위하여 농촌진흥청 국립원예특작과학원 약용작물과에서 *A. japonica* × *A. macrocephala*를 교잡하여 “다출” 품종을 개발하였다. 다출은 자주색으로 개화하고 구근은 *A. macrocephala*와 유사한 특징을 가지며 재래종보다 수량성이 높고 약효성분 또한 우수하다(농촌진흥청, 2008).

이와 같은 백출의 여러 가지 문제점과 종근을 통한 재배 생산의 어려움으로 인해 백출의 조직배양에 대한 연구가 요구되고 있다. 현재까지 국내에서 백출 조직배양에 관한 연구가 시도된 바 있으나 연구의 유의성이 낮아 보고되지 않았다. 국외에서는 *A. macrocephala*와 *A. lancea*의 기내조직 연구가 수행되었으나, hybrid 계통의 기내 조직배양 연구는 전무한 실정이다(Hiraok *et al.*, 1984; Mao *et al.*, 2009).

식물조직배양은 식물의 무병주 육성 및 대량번식을 위해 활용되며 잎, 뿌리, 줄기 등 다양한 식물조직이 이용된다. 식물의 조직은 배지의 종류, 호르몬의 종류와 농도 및 혼합 비율 등에 따라 각각 다르게 반응한다(Chang *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2004). 약용식물의 조직배양 연구에서 동근잎평의비름과 지황의 경우 NAA와 BAP가 첨가된 배지에서 캘러스 유도 및 증식이 효과적으로 이루어졌고, IBA는 다양한 식물의 기내배양에서 뿌리 유도와 생장에 효과적이라고 보고된 바 있다(Gendaram and Bae, 2005; Kwon and Yoon, 2010). 백합과 감자의 기내배양 연구에서는 높은 농도의 sucrose가 첨가된 처리구에서 자구와 소피경의 비대가 효과적으로 이루어진다고 보고된 바 있다(Lee *et al.*, 1995).

따라서 본 연구는 약용식물로서의 경제적 가치가 높으나 낮은 국내 재배생산량, 번식용 종근의 오염, *P. drechsleri*에 의한 역병발생 등의 문제로 인해 국내 재배생산량이 낮은 백출의 기내배양을 통한 대량생산체계 확립 및 무병주 육성을 위해 수행되었다.

재료 및 방법

공시재료, 조직의 멸균 및 배양조건

백출 교잡종(*A. macrocephala* × *A. japonica*) 육성품

종인 ‘다출(DaChul)’을 농촌진흥청 국립원예특작과학원 약용작물과로부터 분양 받아 공시재료로 이용하였으며, 조직 배양을 위한 대상조직으로는 액아와 뿌리조직을 사용하였다. 다출 품종은 중국 도입종 백출과 한국자생종 백출을 교잡한 후 수량성이 우수하고 뿌리 습해에 강한 후대 계통을 선발하여 육성한 것으로 형태적 특성은 중국종과 유사하다.

백출 뿌리조직의 배양을 위해 백출의 줄기를 MS 기본배지에서 12주간 배양한 후 유도된 식물체의 잔뿌리를 치상체로 사용하였다. 치상체는 70% 에탄올과 0.8% sodium hypochlorite 용액에 각각 2분간 표면소독 후 멸균수로 4~5회 수세하였으며, 멸균된 조직은 멸균 여과지를 이용하여 수분을 제거한 다음 0.5 mm의 크기로 잘라 배지에 치상하였다.

백출의 액아배양을 위해 잎을 제거한 줄기를 70% 에탄올에 5분간 표면살균하고 50 µl Tween 20이 첨가된 0.8% sodium hypochlorite에 3분간 2회 신탄 소독한 후 멸균수로 5~6회 수세하였다. 멸균된 조직체는 여과지에 옮겨 수분을 제거한 후 배지에 치상하였다.

백출의 뿌리와 액아배양을 위한 기본 배지로는 30 g/L sucrose와 2.5 g/L phytagel이 포함된 MS(Murashige and Skoog, 1962) 배지로 하였다. 모든 배지는 pH 5.8로 고정된 후 121°C, 1.2기압에서 20분간 고압 멸균하여 사용하였으며, 배양조건은 25 ± 2°C에서 광주기 16시간, 광도 2500 Lux의 조건에서 배양하였다.

뿌리 및 액아배양을 위한 식물생장조절제의 처리

식물생장조절제가 뿌리조직으로부터 캘러스 유도와 재분화에 미치는 영향을 구명하기 위해 MS기본배지에 1, 3, 5 mg/L NAA와 IBA, BAP, 2-iP를 각각 혼합하여 처리하였고, 재분화는 동일 조성의 배지에서 유도하였다. 배양 2주 후 캘러스 형성율을 조사하였고, 8주 후 캘러스의 생체중, 재분화율 및 갈변율을 조사하였다.

액아배양 시 식물체의 기내 생육에 미치는 식물생장조절제의 영향을 구명하기 위해 MS기본배지에 0.1, 1.0 mg/L NAA와 IBA, 1.0, 3.0, 5.0 mg/L BAP와 2-iP를 혼용하여 처리하였다. 절편체 치상 8주 후 각 처리 간 액아 절편체로부터 발생한 신초의 생육을 비교하기 위해 식물체 길이, 줄기 직경, 뿌리 직경, 줄기의 수 등을 측정하였다.

Sucrose 농도가 뿌리비대에 미치는 영향

기내배양 시 sucrose 농도가 뿌리 비대에 미치는 영향을 구명하기 위해, 액아를 포함한 줄기를 MS배지에 치상한 후 재분화 식물체를 유도하였으며, 재분화 식물체를 30, 50, 70 g/L sucrose가 첨가된 MS배지에 이식하였다. 이식된 식물체를 12주간 배양한 후 각각의 sucrose 농도조건에서 생육된 식물체의 초장, 근장, 경직경, 근직경, 줄기 및 엽수 등을 조사하여 비교하였다.

재분화 식물체의 순화

기내 식물체 중 초장이 10 cm 이상이며 뿌리가 유도된 식물체의 뿌리로부터 배지를 제거한 후, 0.1%(v/v) Hyponex 용액을 이용하여 25 ± 2°C, 2500 Lux, 일장 16시간 조건의 배양실에서 7일간 뿌리의 생장을 촉진하였다. 생육이 왕성한 식물체는 식양토와 마사토가 1:1로 혼합된 토양에 이식한 후 약 7일간 뿌리를 활착시켰으며, 다시 지름이 9 cm 인 육묘용 포트에 이식하여 1주간 순화 후 생존율을 조사하였다.

결과 및 고찰

뿌리배양 시 식물생장조절제가 식물 생장에 미치는 영향

백출의 뿌리 절편 배양 시 식물생장조절제의 영향을 구명하기 위하여, BAP, 2-iP, IBA, NAA를 혼합 처리한 결과, 모든 호르몬 처리구에서 캘러스가 유도되었으나 호르

몬의 종류와 농도에 따라 차이를 보였다. 뿌리 절편체는 배양 5일 후부터 팽대하여 2주 후부터 연노란색의 단단한 캘러스가 형성되었으며, 배양 4주 후에는 캘러스의 녹화와 뿌리의 유도가 관찰되었다(Fig. 1A). 2-iP와 NAA의 혼합 처리 시 1 mg/L의 낮은 NAA조건에서는 캘러스 형성율이 60.5%~88.9%로 낮은 경향이었고, 동일농도의 2-iP 조건에서 혼용된 NAA 농도가 증가함에 따라 캘러스 유도율은 증가하는 경향이었으며, 1.0 mg/L 2-iP와 3.0 mg/L NAA 조건에서는 캘러스의생체중이 가장 높았다(Table 1). 또한 2-iP와 IBA의 혼용 처리 시에는 2-iP의 농도가 1.0 mg/L로 낮을 때 IBA의 농도에 상관없이 캘러스 형성율은 97.5%~100.0%로 높게 나타났으며, 싸이토키닌인 2-iP의 농도가 증가함에 따라 동일농도의 IBA조건에서 캘러스 형성율이 낮아지는 경향을 보였다(Table 2). 뿌리의 유도에 있어서는 1.0 mg/L의 2-iP와 3.0 mg/L의 NAA 혹은 IBA에서 각각 27.2%와 16.0%의 뿌리 유도율을 보였으나, 다른 모든 처리에서는 0%~4.9%로 매우 낮았다. 그러나 싸이토키닌을 2-iP에서 BAP로 전환하는 경우 캘러스 유도율은 다소 증가하였지만 캘러스의 증식 및 뿌리의 유도 등에는 아무런 효과가 없었다(data not shown).

따라서 뿌리조직의 기내배양 시 식물생장조절제가 미치는 영향에 있어서 낮은 싸이토키닌의 농도와 높은 옥신의 농도가 캘러스의 유도 및 증식에 유리한 조건을 제공하였다. 또한 뿌리의 유도에는 2-iP처리가 BAP처리에 비해 유리하였으나, 2-iP와 옥신인 IBA가 혼용 처리되는 경우 캘

Table 1. Effect of 2-iP and NAA on root tissues of Dachul (*A. macrocephala* x *A. japonica*) at 8 weeks after *in vitro* culture

Treatments (mg/L)		No. of explants (ea)	Callus induction rate (%)	Callus fresh weight (mg)	Browned (%)	Rooting (%)
2-iP	NAA					
1	1	150	72.8 ± 2.1 ^{Ybz}	0.333 ± 0.2 ^{ab}	0.0 ± 0.0 ^b	27.2 ± 2.1 ^a
	3	150	97.5 ± 0.6 ^a	0.411 ± 0.3 ^a	27.2 ± 4.2 ^a	2.5 ± 0.6 ^b
	5	150	100.0 ± 0.0 ^a	0.224 ± 0.1 ^{abc}	1.2 ± 0.6 ^b	0.0 ± 0.0 ^b
3	1	150	88.9 ± 3.6 ^a	0.119 ± 0.1 ^{bc}	0.0 ± 0.0 ^b	11.1 ± 3.6 ^b
	3	150	90.1 ± 1.5 ^a	0.256 ± 0.2 ^{abc}	1.2 ± 0.6 ^b	9.9 ± 1.5 ^b
	5	150	98.8 ± 0.6 ^a	0.104 ± 0.0 ^{bc}	4.9 ± 1.2 ^b	1.2 ± 0.6 ^b
5	1	150	60.5 ± 5.5 ^b	0.139 ± 0.1 ^{bc}	0.0 ± 0.0 ^b	39.5 ± 5.5 ^a
	3	150	92.6 ± 1.0 ^a	0.143 ± 0.0 ^{bc}	1.2 ± 0.0 ^b	7.4 ± 1.0 ^b
	5	150	95.1 ± 1.2 ^a	0.049 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^b	4.9 ± 1.2 ^b

^YValues represent the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments.

^ZMean Separation in columns by Duncan's multiple range test, *p*=0.05.

Table 2. Effect of 2-iP and IBA on root tissues of Dachul (*A. macrocephala* x *A. japonica*) at 8 weeks after *in vitro* culture

Treatments (mg/L)		No. of explants (ea)	Callus induction rate (%)	Callus fresh weight (mg)	Browned (%)	Rooting (%)
2-iP	NAA					
1	1	150	100.0 ± 0.0 ^{Yaz}	0.456 ± 0.2 ^a	0.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^f
	3	150	98.8 ± 0.6 ^a	0.316 ± 0.2 ^{abc}	16.0 ± 3.1 ^b	1.2 ± 0.6 ^f
	5	150	97.5 ± 0.6 ^{ab}	0.380 ± 0.3 ^{ab}	4.9 ± 1.5 ^c	2.5 ± 0.6 ^{ef}
3	1	150	51.9 ± 6.2 ^c	0.048 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	48.1 ± 6.2 ^b
	3	150	79.0 ± 2.1 ^{bcd}	0.090 ± 0.1 ^{bc}	0.0 ± 0.0 ^c	20.9 ± 2.1 ^{cde}
	5	150	85.2 ± 0.6 ^{abc}	0.184 ± 0.1 ^{abc}	0.0 ± 0.0 ^c	14.7 ± 1.0 ^{def}
5	1	150	28.4 ± 0.6 ^f	0.030 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	71.6 ± 0.6 ^a
	3	150	64.2 ± 4.5 ^{de}	0.045 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^c	35.8 ± 4.5 ^{bc}
	5	150	76.5 ± 2.3 ^{cd}	0.091 ± 0.1 ^{bc}	0.0 ± 0.0 ^c	23.5 ± 2.3 ^{cd}

^YValues represent the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments.

^ZMean Separation in columns by Duncan's multiple range test, *p*=0.05.

Table 3. Effect of BAP and NAA on plant regeneration and growth of axillary bud of Dachul (*A. macrocephala* x *A. japonica*) at 8 week after *in vitro* culture

Treatments (mg/L)		No. of cultured explants	No. of induced shoots	Plant height (mm)	Stem diameter (mm)	Root diameter (mm)
BAP	NAA					
1	0.1	100	3.8 ± 1.2 ^{Yaz}	44.2 ± 6.6 ^{ab}	5.1 ± 1.2 ^a	6.5 ± 0.6 ^{ab}
	1.0	100	3.8 ± 0.3 ^a	45.0 ± 9.2 ^{ab}	5.0 ± 0.8 ^a	7.0 ± 0.6 ^a
3	0.1	100	3.6 ± 0.4 ^a	35.4 ± 1.7 ^{bc}	5.0 ± 0.3 ^a	5.5 ± 0.3 ^{bc}
	1.0	100	2.2 ± 0.1 ^{bc}	48.3 ± 4.3 ^a	4.3 ± 0.2 ^{ab}	5.9 ± 0.6 ^{ab}
5	0.1	100	1.4 ± 0.1 ^c	35.2 ± 4.4 ^{bc}	3.4 ± 0.5 ^b	4.7 ± 1.0 ^c
	1.0	100	2.4 ± 0.1 ^b	30.1 ± 0.4 ^c	3.7 ± 0.0 ^b	6.3 ± 0.2 ^{ab}

^YValues represent the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments.

^ZMean Separation in columns by Duncan's multiple range test, *p*=0.05.

러스의갈 변화율은 높아지는 경향을 보였다. 본 연구결과 싸이토키닌과 옥신의 다른 혼용처리는 백출 뿌리조직의 캘러스 유도과 증식 및 뿌리의 유도에 각각 다른 효과를 제공 하였으나 신초의 출현에는 적합하지 않은 것으로 사료된다. Ko *et al.*(2005)은 *Hippeastrum hybridum* Hort. 'Dazzler'의 소화경 배양에서 NAA와 IBA를 처리하였을 때 뿌리의 유도에는 두 호르몬 간의 차이가 없었다고 하였으나, Oh *et al.*(2007)은 약용식물인 *Echinacea purpurea* L.의 캘러스 유도과 뿌리 증식을 위한 실험에서 옥신 및 싸이토키닌의 종류 및 농도변화가 각각 다른 조직배양특성을 보인다고 하였다.

액아배양 시 식물생장조절제의 효과

백출 액아배양 시 식물생장조절제의 효과를 구명하기 위하여, MS기본배지에 싸이토키닌류인 BAP, 2-iP와 옥신류인 NAA, IBA를 각각 1.0, 3.0, 5.0 mg/L와 0.1, 1.0 mg/L로 혼용 처리하였다. 전반적으로 옥신의 종류와 농도에 관계없이 BAP가 혼용된 처리구의 식물체는 잎이 말리고 마디의 전개가 많이 일어나는 경향을 보였다(Fig. 1B).

BAP와 NAA의 혼용 처리 시 1.0 mg/L BAP와 1.0 mg/L NAA의 혼용 처리구에서 신초의 출현이 3.8개로 가장 높았고, 초장, 경직경, 근직경 등의 식물체 생장이 전반적으로 양호하였다(Table 3). 그러나 NAA를 IBA로 전용한 경우, 액아당 신초 출현율은 1.3개~2.7개로 다소 낮아지는 경향을 보이지만 1.0 mg/L BAP와 0.1 mg/L IBA의 혼용 처리 조건에서 액아당 2.7개의 신초가 출현하여 대조

Table 4. Effect of BAP and IBA on plant regeneration and growth of axillary bud of *Dachul (A. macrocephala x A. japonica)* at 8 week after *in vitro* culture

Treatments (mg/L)		No. of cultured explants	No. of induced shoots	Plant height (mm)	Stem diameter (mm)	Root diameter (mm)
BAP	IBA					
1	0.1	100	2.7 ± 0.4 ^{YaZ}	39.5 ± 8.2 ^{ab}	4.3 ± 0.1 ^a	6.1 ± 0.2 ^b
	1.0	100	2.4 ± 0.1 ^{ab}	37.1 ± 4.3 ^{abc}	4.1 ± 0.2 ^a	7.2 ± 0.2 ^a
3	0.1	100	2.2 ± 0.1 ^b	32.4 ± 0.5 ^{bc}	4.0 ± 0.2 ^a	4.2 ± 0.0 ^d
	1.0	100	1.3 ± 0.3 ^{cd}	42.5 ± 3.1 ^a	4.1 ± 0.2 ^a	4.8 ± 0.1 ^c
5	0.1	100	1.2 ± 0.3 ^d	31.2 ± 2.0 ^c	3.6 ± 0.3 ^b	4.4 ± 0.4 ^d
	1.0	100	1.7 ± 0.1 ^c	32.6 ± 0.5 ^{bc}	3.4 ± 0.1 ^b	5.0 ± 0.0 ^c

^YValues represent the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments.

^ZMean Separation in columns by Duncan's multiple range test, *p*=0.05.

Table 5. Effect of 2-iP and NAA on plant regeneration and growth of axillary bud of *Dachul (A. macrocephala x A. japonica)* at 8 week after *in vitro* culture

Treatments (mg/L)		No. of cultured explants	No. of induced shoots	Plant height (mm)	Stem diameter (mm)	Root diameter (mm)
2-iP	NAA					
1	0.1	100	1.2 ± 0.2 ^c	66.0 ± 3.4 ^a	4.3 ± 0.5 ^b	7.0 ± 0.3 ^{bc}
	1.0	100	1.8 ± 0.6 ^b	50.5 ± 12.3 ^b	5.5 ± 0.6 ^a	8.7 ± 1.4 ^{ab}
3	0.1	100	1.2 ± 0.1 ^c	23.1 ± 2.7 ^c	3.3 ± 0.0 ^c	6.0 ± 0.3 ^c
	1.0	100	2.2 ± 0.1 ^{ab}	26.2 ± 2.3 ^c	3.6 ± 0.7 ^{bc}	10.4 ± 2.2 ^a
5	0.1	100	2.7 ± 0.1 ^a	28.4 ± 1.2 ^c	3.9 ± 0.3 ^{bc}	7.2 ± 0.2 ^{bc}
	1.0	100	2.2 ± 0.1 ^{ab}	30.0 ± 1.1 ^c	5.4 ± 0.1 ^a	10.4 ± 1.4 ^a

^YValues represent the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments.

^ZMean Separation in columns by Duncan's multiple range test, *p*=0.05.

Table 6. Effect of 2-iP and IBA on plant regeneration and growth of axillary bud of *Dachul (A. macrocephala x A. japonica)* at 8 week after *in vitro* culture

Treatments (mg/L)		No. of cultured explants	No. of induced shoots	Plant height (mm)	Stem diameter (mm)	Root diameter (mm)
2-iP	IBA					
1	0.1	100	1.2 ± 0.3 ^c	53.6 ± 2.6 ^a	3.8 ± 0.5 ^b	5.2 ± 0.4 ^c
	1.0	100	1.3 ± 0.1 ^{bc}	44.6 ± 8.2 ^b	5.3 ± 0.3 ^a	6.7 ± 0.1 ^a
3	0.1	100	1.2 ± 0.3 ^c	22.9 ± 1.3 ^d	2.7 ± 0.5 ^c	3.9 ± 0.1 ^c
	1.0	100	1.8 ± 0.3 ^{ab}	24.1 ± 0.1 ^d	3.0 ± 0.1 ^c	4.6 ± 0.3 ^d
5	0.1	100	1.9 ± 0.3 ^a	28.7 ± 0.8 ^{cd}	3.8 ± 0.1 ^b	4.6 ± 0.3 ^d
	1.0	100	1.4 ± 0.1 ^{bc}	31.8 ± 0.8 ^c	4.3 ± 0.4 ^b	6.2 ± 0.2 ^b

^YValues represent the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments.

^ZMean Separation in columns by Duncan's multiple range test, *p*=0.05.

구보다 우수하였다(Table 4).

사이토키닌인 2-iP와 옥신인 NAA 또는 IBA의 혼용처리 시 액아조직의 재분화 결과는 Table 5 및 Table 6과 같다. 2-iP와 NAA의 혼용 처리한 경우, 5 mg/L 2-iP와 0.1

mg/L NAA의 혼용 처리조건에서 액아 당 신초의 출현 개수가 2.6개로 대조군보다 높았으나 식물 생장은 저조하였다(Table 5). 특히 재분화 식물체 초장의 경우 옥신인 NAA의 농도에 상관없이 저농도의 2-iP 조건에서 큰 경향

Table 7. Effect of sucrose on plant growth of Dachul (*A. macrocephala* x *A. japonica*) at 16 weeks after *in vitro* culture

Sucrose (g/L)	No. of shoot	No. of leaves	Plant height (mm)	Length of root (mm)	Diameter of stem	Diameter of root
30	4.1 ± 0.9 ^{Yaz}	7.8 ± 1.0 ^a	211.4 ± 9.3 ^a	175.6 ± 6.7 ^a	7.6 ± 0.4 ^a	13.0 ± 0.8 ^b
50	4.3 ± 0.3 ^a	7.5 ± 0.7 ^a	191.2 ± 4.0 ^b	115.3 ± 7.1 ^b	7.4 ± 0.2 ^a	15.2 ± 1.4 ^a
70	3.8 ± 1.9 ^a	6.0 ± 1.6 ^a	187.2 ± 5.1 ^b	103.0 ± 8.0 ^c	6.2 ± 0.9 ^b	17.0 ± 1.3 ^a

^YValues represent the mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments.

^ZMean Separation in columns by Duncan's multiple range test, *p*=0.05.

을 보였으며, 2-iP의 농도가 증가한 경우 초장은 급격히 감소하였다. 2-iP와 IBA를 혼용 처리한 경우 신초의 출현율은 5.0 mg/L 2-iP와 0.1 mg/L IBA 혼용 처리구에서 1.9개로 가장 많았지만, 다른 호르몬 혼용 처리구에 비해 가장 낮았으며 식물생장 또한 좋지 않았다(Table 6).

액아배양에서 직접 식물체로 재분화되는 경우 식물에 따라 효과적인 식물생장조절제의 종류와 농도는 각기 다르게 나타난다. 백출의 액아배양 시 재분화 식물체의 생산을 위한 식물생장조절제 처리에 관한 본 연구에서는 BAP와 NAA의 혼용처리가 2-iP와 NAA 혹은 IBA 처리보다 효과적인 것으로 사료되며, 1.0 mg/L BAP와 1.0 mg/L NAA 조건에서 액아 당 신초 출현 개체수가 3.8개로 가장 많았고, 경직경이 5.0 mm 이상으로 양호하였다. 그러나 BAP를 2-iP로 대체하는 경우 재분화 식물체의 초장은 큰 경향을 보이거나 액아 당 재분화 식물체의 수가 적은 것으로 조사되었다.

정단배양 또는 마디배양에 의한 식물조직배양 시 캘러스화 과정을 거치지 않고 신초가 생성되는데(Ko *et al.*, 2003), 배의 경정배양에서 BAP와 NAA의 혼용 처리 시 신초의 발생 및 생장에 효과적이지 않다고 하였으나(Lee *et al.*, 1998), 본 연구의 백출 액아 배양에서는 저농도의 BAP와 NAA의 혼용 처리가 신초 유도에 가장 좋은 효과를 보였다. 관목 허브식물인 *Simmondsia chinensis*(Link) Schnieder의 액아배양 시, 3.0 mg/L BAP와 0.2 mg/L NAA의 혼용 처리에서 신초의 재분화 개체수가 높게 나타났으며, 1.0 mg/L BAP와 0.05 mg/L NAA의 혼용 처리에서 가장 낮다고 하였다(Meyghani *et al.*, 2005). 또한 마늘(*Allium sativum* L.)의 단축경 배양을 통한 지상부 발생에는 2.0 mg/L BAP와 0.2 mg/L NAA의 혼용 처리구보다 2.0 mg/L 2-iP와 0.2 mg/L NAA의 혼용 처리구가 각각 23.7개, 18.6개로 더 효율적이라고 보고하여(Kim *et al.*,

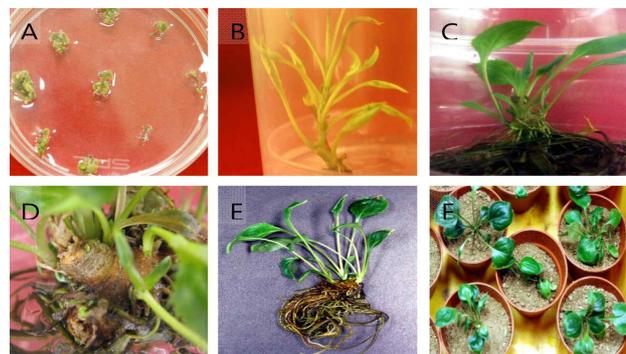


Fig. 1. Procedures of *in vitro* culture of *Atractylodes* cultivar Dachul (*A. macrocephala* x *A. japonica*).

A : callus induction from the root tissue, B : shoot regeneration from auxiliary bud, C : root induction and growth, D : root proliferation on MS medium containing 7% (w/v) sucrose, E : regenerated plant of auxiliary bud, F : planting in pot and acclimatization of the regenerated plants.

2006), 본 연구의 결과와 유사한 경향을 보였다. 따라서 백출의 액아배양을 통한 지상부 유도와 재분화 식물의 생산을 위해 2-iP보다 BAP가 더 효율적인 것으로 판단된다.

Sucrose 농도가 뿌리비대에 미치는 영향

액아배양 시 탄소원인 sucrose의 농도가 식물의 생장과 뿌리 비대에 미치는 영향을 구명하기 위하여 MS기본배지에 식물생장조절제를 첨가하지 않고 sucrose 농도를 3, 5, 7%(w/v)로 하여 액아조직을 배양하였다. 배양 초기 3%(w/v) sucrose 처리구는 엽색이 녹색이었으나, sucrose의 농도가 높아질수록 엽색이 얼어지는 경향을 보이는데, 7%(w/v) sucrose 조건에서는 엽색이 연노랑색에 가까워지거나 갈변화되기도 하였다. 근직경은 7%(w/v) sucrose 처리구에서 가장 잘 비대되었으나, 식물체 길이, 뿌리길이, 지상부 직경 등은 다른 처리구에 비해 낮은 경향을 보였고, 5% sucrose 처리구에서는 식물체 및 뿌리의 길이가 3%(w/v)

처리구에 비해 전반적으로 낮게 나타났다(Fig. 1C-D, Table 7).

이와 같은 현상은 구근성 작물에서 확인할 수 있는데, 많은 구근성 작물은 고농도의 당을 처리할 경우 기내 구근 및 자구의 형성은 양호하지만 신엽의 신장은 억제되는 것으로 알려져 있다(Kageyama *et al.*, 1990, Lee *et al.*, 1995). 그러나 마(*Dioscorea alata* Linne.)의 괴경의 형성 및 유효를 위한 조직배양연구에서 sucrose의 농도가 6~8%(w/v)인 처리구에서는 괴경의 형성율이 높았으나 10%(w/v)인 처리구에서는 크게 저하되었고(Chang *et al.*, 1999), 백합(*Lilium longiflorum*) 소인편 배양에서도 9%(w/v) 이상의 고농도 sucrose 처리 시 자구 비대가 양호하였지만 신엽의 생장이 억제된다고 보고된 바 있다(Lee *et al.*, 1995). 그러나 수선화과의 열대성 구근식물인 *Nerine bowdenii*의 인편배양 시 기내 자구형성을 위한 적정 sucrose 농도는 3%(w/v)가 적정하며, sucrose의 농도가 9%(w/v)로 높아지는 경우 자구 형성율은 낮아진다고 보고되었다(Lee *et al.*, 2004). Sucrose는 단당류인 D-glucose와 D-fructose로 구성된 이당류이며, 배지에 포함된 sucrose는 D-glucose와 D-fructose로 유리되어 식물조직배양과정 중 해당과정을 포함한 다양한 당대사를 통해 식물생장에 필요한 탄소원 및 에너지원으로 이용된다. 또한 배지에 포함된 sucrose 등의 당은 식물조직배양과정 중 식물조직의 삼투조절을 위해 이용되는데, 일반적으로 식물조직배양에는 3%(w/v) sucrose 혹은 maltose가 이용되거나, 2%(w/v) sorbitol 등과 혼용되기도 한다. 배지의 당 농도가 높아지는 경우 식물세포내의 수분 포텐셜이 상대적으로 높아져 식물세포는 수분흡수가 어려워지게 되며, 지상부 생육이 저하됨에 따라 근부의 비대가 이루어지는 것으로 사료된다. 따라서 본 연구결과 백출의 액아배양 시 신초의 출현을 위한 sucrose 농도는 3%(w/v)가 적정하나, 신초 출현 이후 근경의 비대를 위해서는 7%(w/v)의 sucrose 농도가 적합한 것으로 사료된다.

액아배양으로 재분화된 식물체는 7%(w/v) sucrose가 포함된 MS 배지에서 뿌리 비대과정을 거친 후 0.2%(v/v) hyponex 용액에서 7~10일간 생육시켰으며, 생장이 원활한 식물체는 사양토와 마사토가 1:1로 혼합된 pot에 이식하여 순화시켰다(Fig. 1. E-F).

사 사

본 연구는 2011년도 농촌진흥청 공동연구사업 특용작물 경쟁력 제고기술(과제번호: PJ906938) 연구비 지원에 의해 수행되었음.

적 요

본 연구는 국내에서 소비되는 약용작물 중 경제적 가치가 높은 백출의 조직배양체계 확립을 위해 수행되었다. 공시재료로는 중국백출(*A. macrocephala*)과 한국자생백출(*A. japonica*)의 교잡종인 '다출' 품종의 뿌리와 액아를 이용하였다. 뿌리배양을 위해 BAP, 2-iP, IBA, NAA를 혼용 처리한 결과, 캘러스 유도율은 BAP 처리군에서 다소 높았으나, 캘러스 증식 및 뿌리의 유도에는 2-iP 처리가 효과적이었다. 뿌리조직은 낮은 싸이토키닌의 농도와 높은 옥신의 농도에서 캘러스 유도 및 증식이 원활하였으나 식물체 재분화에는 적합하지 않았다. 백출의 액아배양 시 BAP와 NAA의 혼용처리가 2-iP와 NAA 혹은 IBA 처리보다 재분화식물체 생산에 효과적이었다. 1.0 mg/L BAP와 1.0 mg/L NAA 조건에서 액아 당 신초 출현 수가 3.8개로 가장 많았고, 경직경이 5.0 mm 이상으로 양호하였다. 그러나 BAP를 2-iP로 대체하는 경우 재분화 식물체의 초장은 큰 경향을 보이거나 액아 당 재분화 식물체의 수가 적은 것으로 조사되었다. 또한 Sucrose 농도를 70 g/L로 하는 경우 액아로부터 재분화한 식물체의 뿌리 비대에 효과적이었다. 본 실험 결과, 백출의 기내 대량증식을 위한 조직으로는 뿌리보다 액아조직이 효율적이며, 식물의 재분화에는 1.0 mg/L BAP와 1.0 mg/L NAA 적합하고, 고농도의 sucrose가 뿌리 비대에 유용한 것으로 사료된다.

인용문헌

- Bang G.H., J.S. Seong, C.H. Park, D.S. Kim, C.G. Park, H.S. Yu, H.U. Park and N.S. Seong. 2004. Discrimination of *Atractylodes rhizome* white using anatomical characteristics and SCAR markers. Korean J. Medicinal Crop Sci. 12(1): 53-59 (in Korean).

- Chang K.J., C.Y. Yu and C.H. Park. 1999. *In vitro* tuberization of *Dioscorea alata* Linne. Korean J. Medicinal Crop Sci. 7(3):155-161 (in Korean).
- Chung, H.G., K.H. Bang, J.K. Bang, S.E. Lee, N.S. Seong, J.H. Cho, B.S. Han and S.M. Kim. 2004. Comparison of volatile components in essential oil from different origin of *Atractylodes* spp. Korean J. Medicinal Crop Sci. 12(2): 149-153.
- Gendaram, S. and C.H. Bae. 2005. Plant regeneration from Turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapifera*) organs. Korean J. Plant Res. 8(3):286-292.
- Hiraoka, N., N. Yamada, T. Kodama and Y. Tomita. 1984. *In vitro* propagation of *Atractylodes lancea*. Plant Cell Rep. 3(3):85-87.
- Kageyama, C., T. Komatsuda and K. Nakajima. 1990. Effects of sucrose concentration on morphology of somatic embryos from immature soybean cotyledons. Plant Tiss. Cult. Lett. 7(2):108-110.
- Kim, J.K., K.L. Park and E.S. Rha. 2002. Variation analysis of *Atractylodes japonica* Koidzumi ex Kitamura based on quantitative characters. Korean J. Plant Res. 15(1):36-42 (in Korean).
- Kim, K.S., Y.S. Jang, S.S. Nam, I.H. Choi and J.K. Bang. 2006. *In vitro* bulblets formation and pattern of shoot regeneration through stem-disc culture of garlic (*Allium sativum* L.). Korean J. Hort. Sci. Technol. 24(4):436-440 (in Korean).
- Ko, J.A., M.J. Kim, Y.S. Kim and H.S. Kim. 2005. Effective *in vitro* propagation from pedicel culture of *Hippeastrum hybridum* Hort. "Dazzler". Korean J. Plant Res. 18(3):382-389 (in Korean).
- Ko, J.A., M.J. Kim, J.J. Lee, H.S. Kim and Y.S. Kim. 2003. Micropropagation from corn apical meristem culture of *Freesia refracta* hybrida. Korean J. Plant Res. 16(1):34-39.
- Kwon H.K. and E.S. Yoon. 2010. Effect of plant growth regulators on plant regeneration from the *Sedum rotundifolium* D. Lee. J. Plant Biotechnol. 37(1):84-88 (in Korean).
- Lee C.H., C.S. Kim and S.B. Kim. 1998. *In vitro* shoot tip culture of pear 'Niitaka; as related to tree vigor, sampling time and plant growth regulators. Korean J. Plant Tiss. Cult. 25(3):159-163 (in Korean).
- Lee E.M., H.J. Chung and Y.B. Lee. 1995. Regeneration of bulblets from bulblet-derived bulb-scales of *Lilium longiflorum*. Korean J. Plant Tiss. Cult. 22(2):88-93 (in Korean).
- Lee J.H., Y.K. Kim, S.P. Hong and C.S. Kim. 2002. Studies of taxonomic origins of *Atractylodes rhizma* alba and *Atractylodes rhizma*. Korean J. Orient. Medi. 8(1):55-63 (in Korean).
- Lee S.Y., J.H. Ahn and Y.J. Park. 2004. Effects of growth regulators and sucrose concentrations on the bulblet formation through *in vitro* culture of scale segment in *Nerine bowdenii*. J. Plant Biotechnol. 31(2):139-143 (in Korean).
- Mao, B., B. He, Z. Chen, B. Wang, H. Pan and B. Li. 2009. Effects of plant growth regulators on the rapid proliferation of shoots and root induction in the Chinese traditional medicinal plant *Atractylodes macrocephala*. Front. Biol. China. 4(2):217-221.
- Meyghani, H., R.F. Ghazvini and Y. Hamidoghli. 2005. Micropropagation from stem segments of salt tolerant *Jobba* seedlings. J. Korean Soc. Hort. Sci. 46(3):183-187.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15(3):473-497.
- Oh S.M., J.H. Jeong and S.T. Kwon. 2007. Callus induction and *in vitro* multiplication of Echinacea (*Echinacea purpurea* L.) adventitious Root. Flower Res. J. 15(2):82-89 (in Korean).
- 농촌진흥청. 2008. 약용작물 품종 총람. 농촌진흥청 국립원예특작과학원 약용작물과 pp. 106-109.
- 식품의약품안전청. 2007. 대한약전 9개정. 식품의약품안전청 고시. pp. 929-976.

(접수일 2011.8.29; 수정일 2011.9.7; 채택일 2011.9.19)