

섬시호(*Bupleurum latissimum* Nakai)의 조직배양을 통한 대량생산

김효진*, 조한직¹, 김이엽¹, 김무열², 박학봉
전북대학교 원예학과, ¹(주)파낙시아, ²전북대학교 생물과학부

Mass Propagation by *In Vitro* Culture of *Bupleurum latissimum* Nakai

Hyo-Jin Kim*, Han-Jik Cho¹, Ee-Youp Kim¹, Mu-Yeol Kim² and Hark-Bong Park
Department of Horticulture, Graduate School, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
¹Panaxia Co. Ltd 452-32 jangdong, Deokjingu, Jeonju, Jeonbuk, 561-360, Korea
²Division of Biological Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

Abstract - This study was carried out to establish the micropropagation system of *Bupleurum latissimum* Nakai that is a Korean native endangered species. Callus were induced from the leaf, petiole and floral bud and the percentage of callus formation was highest in the floral bud on the MS medium containing 2.0 mg · L⁻¹ 2,4-D. Especially, callus induced from floral bud was formed 77.8% and the percentage of shoot formation was 42.6% on the MS medium containing 2.0 mg · L⁻¹ 2,4-D plus 1.0 mg · L⁻¹ TDZ. For simultaneously callus formation and shoot regeneration, 1/2 MS medium was more effective than MS medium. The percentage callus formation, shoot regeneration and rooting were 46.3%, 13.0%, 13.0% in 1/2 MS medium, respectively. Shoot regeneration from callus was good in 1/2 MS medium supplemented with 2.0 mg · L⁻¹ 2,4-D plus 1.0 mg · L⁻¹ BA where percentage of shoot regeneration was 74.1%, and the number of shoot per explant was 2.4. The percentage of rooting was lowest (57.8%) in control while it was highest (97.8%) in 1.5 mg · L⁻¹ NAA. In acclimatization of regenerated plantlets, the percentage of survived plantlets was highest (86.1%), and plant height, root length and fresh weight were good in the soil for horticulture.

Key words - *Bupleurum latissimum*, Callus, Shoot, Regeneration, Propagation

서 언

섬시호(*Bupleurum latissimum* Nakai)는 세계적으로 울릉도에만 한정 분포하는 한국 특산식물이며(김, 2004), 환경부가 지정한 멸종위기 식물 II급에 속하는 식물로 매우 귀중한 유전자원이다. 섬시호는 산형과(Umbelliferae) 중에서도 가장 큰 시호속에 속하는데 시호속은 주로 유라시아에 150여종이 분포한다(Neves and Watson, 2004). 한국에는 시호(*B. falcatum* Linné), 개시호(*B. longiradiatum* Turcz), 등대시호(*B. euphorbioides* Nakai), 섬시호(*B. latissimum* Nakai), 참시호(*B. scorzonrifolium* Willd) 등의 5군이 분포한다(이, 1980).

섬시호는 1970년대까지 울릉도 서쪽 해안일대에서 흔히 볼 수 있었지만 서식지 환경의 급속한 변화로 그 동안 많은 학자들의 정밀 탐사에서도 발견되지 않았다. 2000년에 멸종된 것으로

알려졌던 섬시호가 일부 자생지에서 발견되어 학계에 관심을 끌었으나 현재까지도 다른 멸종 위기식물들과 함께 일부 식물원에만 남아있다. 따라서 적극적인 자원 보존 대책이 요구되고 있으며 개체 증식을 위한 번식 방법과 더불어 종자 발아 및 재배에 대한 연구가 절실히 요구되고 있다.

1917년 Nakai에 의해 섬시호가 신종으로 발표된 이래 Kim과 Youn(1990), Ahn(2004)에 의해 섬시호를 포함한 한국산 시호속에 대해 해부학적, 화분 및 세포학적인 연구가 수행되어 왔으며 Choi 등(1996)은 RFLP와 ITS 염기서열에 의한 유연관계를 조사하였다. 또한 시호에서는 조직배양을 통한 부정배의 형성 및 분화에 대한 연구(Hiraoka *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1988; Amano *et al.*, 1989; Park *et al.*, 1994a; 1994b)는 물론 약 및 원형질체의 배양(Park *et al.*, 1995; Xia *et al.*, 1992; Jeong *et al.*, 1994), 조직 배양근으로부터 함량이 증가된 사이코사포닌의 추출(Hiraoka 등, 1986)등이 보고되기도 하였다. 그러나 섬시호의 경우 현재 실험재료의 부족으로 활발한 연구가 수행되지 못하고 있는 실정이며 번식에 대한 체계적인 연구 또

*교신저자(E-mail) : cattleya@hanmail.net

한 거의 이루어진 적이 없다.

따라서 본 연구는 멸종 위기에 처한 섬시호의 대량 증식을 위해 조직배양을 통한 번식체계를 확립하고자 적합한 배양 절편체를 선정하고 선정된 절편체로부터 캘러스 유도, 식물체 재분화, 발근에 효과적인 식물생장조절물질의 종류와 농도를 구명하며 재분화 식물체의 생존율을 향상시킬 수 있는 순화용토를 선발하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에서 사용한 섬시호는 종자를 2005년 8월 환경부 서식지의 보전기관인 기척산식물원에서 채취하여 전북대학교 온실에서 발아시킨 후 실험재료로 사용하였다.

치상 절편체 부위 및 성장조절물질에 따른 캘러스 유도

캘러스 형성률이 높은 치상 절편체를 찾기 위하여 식물체가 약 30cm로 자랐을 때 5~7번째의 잎과 엽병을 채취하여 잎은 5×5mm, 엽병은 7mm로 절취하였고 생육 4개월 후 발달 초기의 화뢰가 3~5mm 정도 자랐을 때 배양 재료로 채취하였으며, 채취된 재료는 70% 알코올에 수 초간 표면 소독한 다음 7% calcium hypochlorite 수용액에 15분간 침지 후 멸균수로 4~5회 수세하였다. MS 기본배지(Murashige and Skoog, 1962)에 오옥신류인 2,4-D(2,4-dichlorophenoxy acetic acid)와 싸이토키닌류인 BA(6-benzyl amino purine), kinetin, TDZ(Thidiazuron)를 0, 1.0, 1.5, 2.0 및 3.0mg · L⁻¹로 단용처리하여 pH 5.8로 조정하였고 phytagel 3g · L⁻¹을 첨가하여 고온고압멸균기로 121℃, 1.2기압에서 15분간 멸균하였다. 페트리 접시에 분주한 후 절편체를 치상하여 온도 25±2℃, 광도 50μmol · m⁻²s⁻¹, 광주기 16/8h으로 조절되는 성장상에서 배양하였다. 절편체 부위별로 10개체씩 3반복으로 처리하여 캘러스 형성률을 조사하였다.

또한 캘러스를 통한 대량증식과 식물체 재분화를 동시에 수

행하기 위하여 식물생장조절물질을 단용처리 하였을 때 캘러스 형성률이 가장 좋았던 2.0mg · L⁻¹ 2,4-D를 MS 기본배지에 첨가한 후 1.0mg · L⁻¹ BA와 1.0mg · L⁻¹ TDZ를 처리하여 절편체 부위별로 10개체씩 3반복으로 치상하여 캘러스 형성률과 식물체 재분화율을 조사하였다.

무기염류의 농도 및 식물생장조절물질에 따른 식물체 재분화

캘러스 형성률이 높았던 화뢰를 실험재료로 하여, MS 및 1/2 MS배지에 치상하였는데 이 때 두 처리구 모두 1.0mg · L⁻¹ NAA(α -naphthalene-acetic acid)와 1.5mg · L⁻¹ BA를 첨가하였으며 처리별로 10개체씩 3반복으로 캘러스 형성률, 신초 재분화율, 발근율 등을 조사하였다.

캘러스 형성률이 높았던 2.0 mg · L⁻¹ 2,4-D가 첨가된 1/2 MS배지를 기본배지로 하고 BA와 TDZ를 0~2.0mg · L⁻¹로 달리하여 화뢰를 10개체씩 3반복으로 치상하여 신초 재분화율 및 절편체당 신초수를 조사하였다.

오옥신의 종류 및 농도에 따른 발근

캘러스에서 분화된 초장 1.5~2.0cm의 신초를 분리하여 1/2 MS배지에 NAA와 IAA를 0~1.5mg · L⁻¹으로 단용처리하고 배양병에 10개체씩 3반복으로 치상한 후 발근율을 조사하였다.

생존율 높은 순화 용토 선발

6×6식 포트에 원예용상토, 버미큘라이트, 펄라이트의 단독 및 버미큘라이트와 펄라이트를 혼합(50 : 50)한 인공용토를 담은 후 기내에서 재분화된 식물체를 이식하여 온실에서 재배하였으며 순화 후 초장, 근장, 생체중 및 생존율 등을 조사하였다.

결과 및 고찰

치상 절편체 부위 및 성장조절물질에 따른 캘러스 유도

잎, 엽병, 화뢰를 MS 기본배지에 오옥신류인 2,4-D와 싸이토키닌류인 BA, kinetin, TDZ를 농도별로 단용처리하여 캘

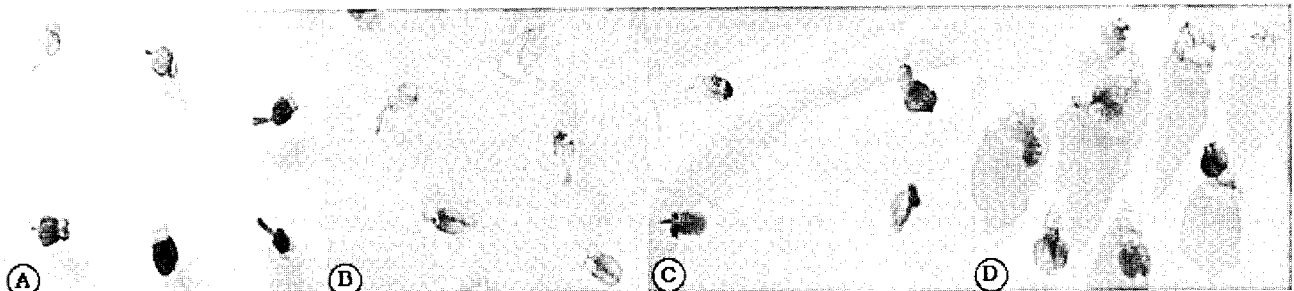


Fig. 1. Callus formation from floral bud culture of *B. latissimum* were cultured on MS medium with 2.0 mg · L⁻¹ 2,4-D and 1.0mg · L⁻¹ TDZ. Yellowish callus was induced from pedicel and surface of floral buds on induction media after 2 or 4 weeks of culture.

러스 형성에 미치는 영향을 살펴본 결과, 치상체의 부위에 따른 캘러스 형성시기에 차이가 있었는데 잎과 엽병은 배양 2주일 후 절편체의 절단면이 팽대하기 시작하였으며 4주일 후에 캘러스가 형성되었다. 화뢰의 경우 배양 1주일 후 화뢰를 비롯 화뢰 전체가 팽대하기 시작하여 2주일경에는 담황색의 부드러운 캘러스가 형성되어 가장 빠른 반응을 보였다(Fig. 1).

치상 절편체별로 성장조절물질을 단용처리한 결과(Table 1), 잎은 2.0mg · L⁻¹ 2,4-D에서 캘러스가 43.2% 발생되어 대조구 7.4%에 비해 캘러스 형성률이 높았고 농도별(1.0, 1.5, 2.0, 3.0mg · L⁻¹)로 보면 2,4-D에서는 9.3~43.2%로 다양한 결과를 보였으며 kinetin은 7.4~17.3%로 전반적으로 저조하였다. BA는 13.0~30.9%의 캘러스 형성률을 보였으며 TDZ는 24.7~35.8%로 농도에 따른 효과가 적게 나타났다.

엽병은 1.0mg · L⁻¹과 2.0mg · L⁻¹의 BA에서 42.0%의 캘러스가 발생되어 대조구 5.6%에 비해 월등히 캘러스 형성률이 높았으며 성장조절물질의 종류에 따라 2,4-D는 24.7~38.3%로 고른 경향을 보인 반면 kinetin과 TDZ에서는 캘러스 형성률이 낮았다.

화뢰에서는 캘러스 형성률이 2.0mg · L⁻¹ 2,4-D에서 71.6%로 가장 높았는데 이는 대조구 9.3%에 비해 62.3%나 높았으며 성장조절물질의 농도에 따라 2,4-D는 13.6~71.6%로 큰 폭의 차이를 보인 것에 비해 kinetin은 11.1~23.5%로 변화의 폭이 적었다.

TDZ의 경우 2,4-D보다는 캘러스 형성률이 다소 떨어졌지만

1.5~3.0mg · L⁻¹에서 48.2~55.6%로 고른 경향이였다. 본 연구에서 가장 높은 캘러스 형성률을 보인 식물체 부위는 화뢰였으며 성장조절물질 2.0mg · L⁻¹ 2,4-D에서 71.6%로 캘러스 형성률을 보였다. 그러나 식물체 부위와 식물성장조절물질의 처리 모두에서 캘러스만 형성되었을 뿐 신초와 뿌리 분화는 이루어지지 않았다.

본 실험과 마찬가지로 平岡 등(1983)도 삼도시호의 화뢰는 캘러스 형성률이 100%로 좋다고 하였다. 반면 참시호의 캘러스 유도는 잎과 화뢰의 유조직에서 잘 유도되었으며, 유엽에서 캘러스 형성률이 65%로 화기 44%보다 양호하다고 하였다(Park *et al.*, 1994b). 성장조절물질의 종류와 농도에 관해 참시호의 경우 2.0mg · L⁻¹ 2,4-D에서 70.8%의 캘러스 형성률을 보여(Park *et al.*, 1994b) 본 실험과 유사한 결과를 나타내었으며 삼도시호는 0.5mg · L⁻¹ TDZ에서 31.6%, 2.0mg · L⁻¹ TDZ에서 12.0%의 캘러스 형성률을 보여 고농도보다는 저농도에서 캘러스 형성률이 좋았다고 하였는데 이는 본 실험의 결과와 상이하였다.

또한 삼도시호의 유엽 절편체는 2.0mg · L⁻¹ 2,4-D에서 83%의 캘러스 형성률을 보였으며(Park *et al.*, 1994b), 참시호에서는 0.5mg · L⁻¹ 2,4-D가 첨가된 MS 배지에서 캘러스 유도가 잘 된다고 보고(Lee *et al.*, 1988) 되어 같은 속일지라도 종이나 재료, 성장조절물질 처리별로 캘러스 유도에 다른 결과를 보였다.

캘러스를 통한 대량증식과 식물체 재분화를 동시에 수행하기

Table 1. Effects of plant growth regulators on callus induction through each explant sources of *B. latissimum* after 4 weeks of culture

PGRs (mg · L ⁻¹)		Callus formation(%)					
		Leaf		Petiole		Floral bud	
Control		7.4±2.3 ^a	h ^a	5.6±2.5	i	9.3±3.2	f
2,4-D	1.0	9.3±2.6	h	34.6±1.2	bc	13.6±1.2	f
	1.5	38.3±3.3	ab	24.7±3.3	de	38.3±2.5	c
	2.0	43.2±1.2	a	38.3±2.5	ab	71.6±1.2	a
	3.0	24.7±1.7	de	28.4±0.9	cd	40.7±3.0	cd
BA	1.0	24.7±2.5	de	42.0±1.2	a	16.1±2.5	ef
	1.5	30.9±1.2	cd	28.4±1.2	cd	32.1±3.3	cd
	2.0	22.2±2.1	fe	42.0±1.2	a	50.6±5.4	b
	3.0	13.0±2.6	gh	29.6±2.3	cd	27.8±2.5	de
Kinetin	1.0	12.4±1.2	gh	9.9±3.3	hi	12.4±2.5	h
	1.5	16.1±1.2	fg	13.6±1.2	gh	23.5±3.3	de
	2.0	17.3±1.2	fg	16.1±1.2	gh	11.1±2.1	f
	3.0	7.4±2.1	h	11.1±2.6	hi	16.7±2.5	ef
TDZ	1.0	33.3±2.1	bd	22.2±2.1	def	13.6±1.2	f
	1.5	24.7±1.2	de	11.1±2.1	hi	53.1±2.5	b
	2.0	35.8±1.2	bc	19.8±1.2	efg	55.6±2.1	b
	3.0	27.8±2.5	de	16.7±2.5	gh	48.2±3.7	bc

^aData represent the mean ± S.E. of three replicates.

^bMean separation within columns by Duncan's multiple range test 5% level.

위하여 식물생장조절물질을 단용처리 하였을 때 캘러스 형성률이 가장 좋았던 2.0mg · L⁻¹ 2,4-D를 MS 기본배지에 첨가한 후 1.0mg · L⁻¹ BA와 1.0mg · L⁻¹ TDZ를 처리하여 절편체 부위별로 치상한 결과(Fig. 2), BA 처리에서 캘러스 형성률은 화뢰에서 38.9%로 양호하였고 잎은 13.0%, 엽병은 24.1%이었으며 신초 재분화율은 화뢰에서 53.7%로 양호하였고 잎은 14.8%, 엽병은 5.6%로 낮았다. TDZ 처리구 역시 BA와 마찬가지로 화뢰의 캘러스 형성률은 77.8%로 가장 높게 나타났으며 잎은 46.3%, 엽병은 35.2%이었으며 신초 재분화율은 화뢰에서 42.6%, 잎은 16.7%, 엽병은 3.7%로 낮아졌다.

특히 엽병에서는 캘러스가 유도되었지만 신초 재분화율이 BA에서 5.6%, TDZ에서 3.7%로 매우 낮았으며 대부분의 BA와 TDZ 처리 모두 절편체 대부분에서 캘러스 형성률이 신초 재분화율보다 높았다. 또한 TDZ에서 BA에 비해 캘러스 형성이 양호하였으나 화뢰의 BA 처리구에서는 신초 재분화율이 캘러스 형성률보다 높았다.

삼시호의 잎과 엽병에서는 캘러스 형성이 저조하였고 화뢰조직에서 캘러스 형성이 양호하였으며 신초 재분화율 역시 화뢰조직에서 높게 나타났는데 이러한 원인으로 화뢰 부위는 식물체 조직 중 지표면과 떨어져 있으므로 병원균에 의한 감염률이 낮고 타기관에 비해 분화력이 높아서 대량증식에 적합하다고 보고된 바 있다(Chung *et al.*, 1983; Homma and Asahira, 1985). Park 등(1994b)은 참시호 2.0mg · L⁻¹ 2,4-D와 1.0mg · L⁻¹ TDZ의 혼합배지에서 92%로 높은 캘러스 형성률을 보였다고 하였는데 본 실험 역시 유사한 경향이었으나 캘러스 형성률이 다소 낮았다. Park 등(1994b)은 또한 삼도시호에서 가장 좋은 캘러스 형성 배지는 47.6%의 캘러스 형성률을 보인 2.0mg · L⁻¹ 2,4-D와 0.5mg · L⁻¹ TDZ 혼합배지라고 보고하였으며 참시호의 경우 유엽조직에서 2.0mg · L⁻¹ 2,4-D와 0.5mg · L⁻¹ BA 혼용처리시 73.1%로 캘러스 형성이 양호하였고, 삼도시호에서는 48.1%의 캘러스 형성률을 보였다고 하였다. 또한 Lee 등(2002)

은 국화과인 민들레의 경우 유식물의 뿌리, 배축, 자엽의 모든 절편이 2.0mg · L⁻¹ BA 처리에서 식물체 재분화율이 67%로 높게 나타났고, kinetin을 처리한 경우에는 뿌리에서만 높다고 보고하였다.

Jeong(1999)은 기린초속 평의비름의 잎 절편으로부터 2.0 mg · L⁻¹ 2,4-D와 1.0mg · L⁻¹ BA 혼합배지에서 100%의 캘러스 형성률을 얻었으며, Choi 등(1994)도 바위솔의 줄기배양에서 4.0mg · L⁻¹ 2,4-D와 2.0mg · L⁻¹ BA의 혼합률이 2 : 1일 때 캘러스 형성이 가장 효과적이라고 하였다. 고추냉이(*Armoracia rusticana*)의 경우에도 높은 BA 농도는 기부에 캘러스 형성을 촉진시키고 신초 유도와 신장을 억제한다고 한다(Kim and Park, 1988).

이러한 결과에 대해 Ryu 등(1992)은 이미 식물 종에 따라 캘러스 형성 반응은 상이하며, 동일 속이라 할지라도 품종이나 배양에 이용되는 조직 절편의 종류에 따라 상당한 차이가 있을 수 있고, 배지에 첨가하는 식물생장조절물질의 조성이나 배양 조건 등에 의해서도 식물체 재분화 양상이 크게 다르다고 언급하였다.

무기염류의 농도 및 식물생장조절물질에 따른 식물체 재분화

캘러스 형성률이 높았던 화뢰를 MS 및 1/2 MS배지에 치상하였는데 이때 두 처리구 모두 1.0mg · L⁻¹ NAA와 1.5mg · L⁻¹ BA를 첨가하였으며 캘러스 형성률, 신초 재분화율, 발근율 등을 조사하였다(Fig. 3).

캘러스 형성률은 1/2 MS배지에서 46.3%로 MS배지보다 16.7%가 높았고, 신초 재분화율과 발근율 모두 13.0%로 나타났으나 MS배지에서는 4주일 후부터 캘러스가 갈변하기 시작하면서 신초 재분화율이 5.6%로 급격히 낮아진 후 발근되는 모습을 관찰할 수 없었다. 이러한 결과는 시호의 경우 성장조절물질을 첨가하지 않고 sucrose의 농도를 1%로 감소시킨 1/2 LS배지에

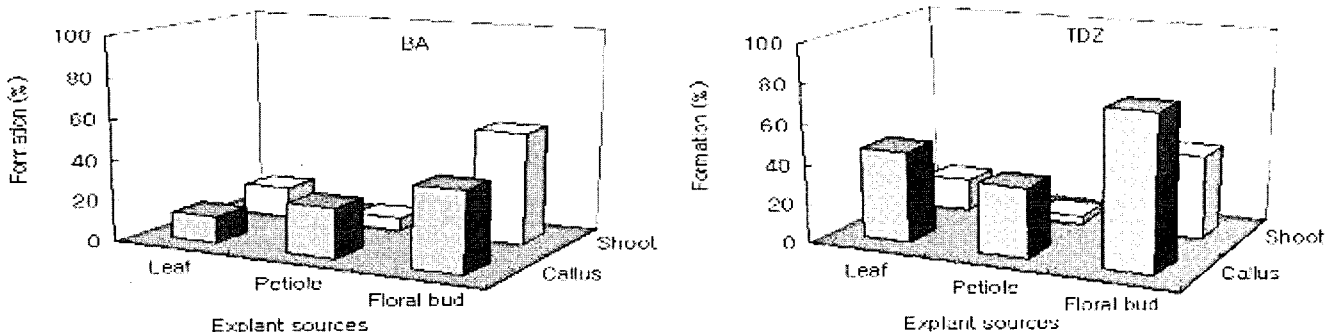


Fig. 2. Effect of 1.0mg · L⁻¹ BA and 1.0mg · L⁻¹ TDZ on MS medium supplemented with 2.0mg · L⁻¹ 2,4-D by explant sources on callus and shoot formation of *B. latissimum* after 12 weeks of culture.

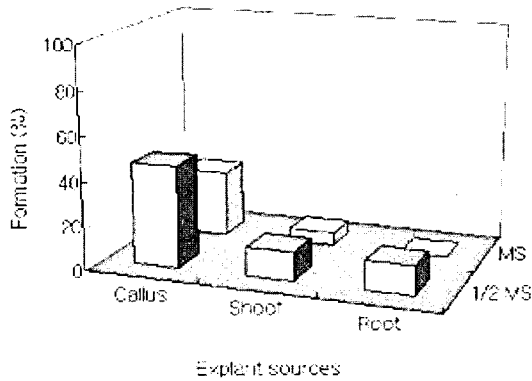


Fig. 3. Effect of MS and 1/2 MS medium supplemented with 1.0mg · L⁻¹ NAA and 1.5mg · L⁻¹ BA on callus, shoot and root formation in floral bud culture of *B. latissimum* after 12 weeks of culture.

서 부정배로부터의 양호한 식물체를 획득하였다는 平岡 등 (1983)의 보고와 유사하였다. 천궁 역시 MS배지보다 1/2 MS배지가 신초 재분화율이 높은 경향이있으며(Park and Chae, 1994), 산약의 기내배양에서도 MS 무기염 농도를 1/2, 1/4, 1/8로 처리한 결과 농도가 낮아질수록 신초의 길이와 출엽률이 모두 증가하는 경향을 보여(Lee et al., 1993; Lee et al., 1994b) 캘러스 형성과 신초 재분화 등은 무기염류 농도와 상당히 깊은 연관관계가 있을 것으로 추측된다.

캘러스 형성률이 높았던 2.0mg · L⁻¹ 2,4-D가 첨가된 1/2 MS배지를 기본배지로 하고 BA와 TDZ를 0~2.0mg · L⁻¹로 처리한 후 화뢰를 치상하여 신초 재분화율 및 절편체당 신초수를 조사하였는데 4주일 후부터 신초 재분화 모습이 관찰되었다 (Fig. 4, 5).

신초 재분화는 BA, TDZ 모두 1.0mg · L⁻¹의 농도에서 양호하였으며, 재분화율은 BA 처리에서 74.1%로 TDZ의 57.4%에 비해 16.7% 높았다. 절편체당 신초수는 1.0mg · L⁻¹ BA에서 2.4개로 TDZ의 1.2개보다 2배 높았다. 그러나 BA와 TDZ를 처리하지 않았던 대조구에서는 신초 재분화가 전혀 관찰되지 않았다. 또한 1.5mg · L⁻¹ 이상의 BA 농도에서는 고농도일수록 신초 재분화율이 감소되는 경향이있고 0.5~1.0mg · L⁻¹의 낮은 농도에서 오히려 신초 재분화율과 신초수가 높았다.

시호의 경우에도 BA와 kinetin 모두 0.1mg · L⁻¹의 농도에서 신초 형성이 양호하였고 싸이토키닌 농도가 높을수록 신초 재분화가 억제되는 경향을 보였으며(Park, 1995), BA와 NAA 등의 성장조절물질을 0.1~1.0mg · L⁻¹의 저농도로 첨가한 배지에서 캘러스 유도과 체세포배로부터 효과적인 식물체 재분화가 가능하다고 하였는데(Lee et al., 1988; Park et al., 1994a; 1995) 이러한 결과는 본 실험과 유사하였다. 산형과인 천궁은 1.0mg · L⁻¹ BA와 1.0mg · L⁻¹ GA3를 혼용하였을 때 신초의 형성이 효과적이었으나 재분화된 신초의 기내 증식을 유도하고자

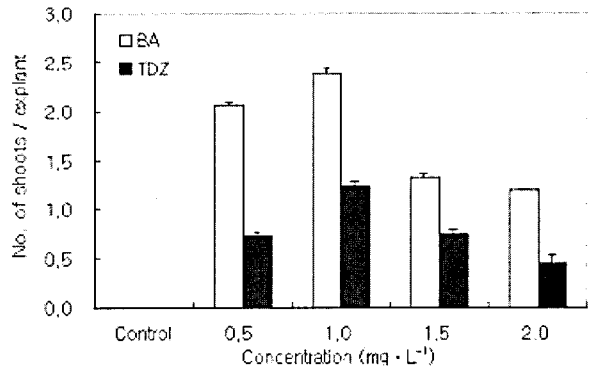
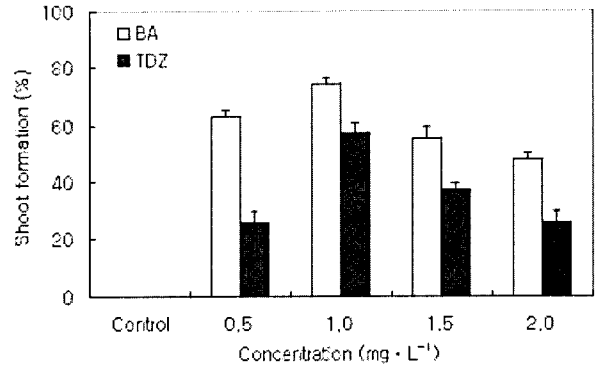


Fig. 4. Shoot formation and the number of shoot per explant by concentration of BA and TDZ on 1/2 MS medium supplemented with 2.0mg · L⁻¹ 2,4-D after 8 weeks of subculture in floral bud derived callus of *B. latissimum*.

할 때는 BA에 GA3를 혼용처리 했을 때보다 0.5mg · L⁻¹ BA를 단독 처리시 오히려 신초수가 많아 효과적인 것으로 보고되었다 (Lee et al., 1994a). 또한 글라디올러스와 같은 화훼류 역시 캘러스로부터의 기관 재분화를 위해서는 외생 싸이토키닌이 필수적이기는 하지만, 고농도를 필요로 하지 않는다고 하여(Kim et al., 1999) 캘러스로부터 신초가 재분화할 경우는 싸이토키

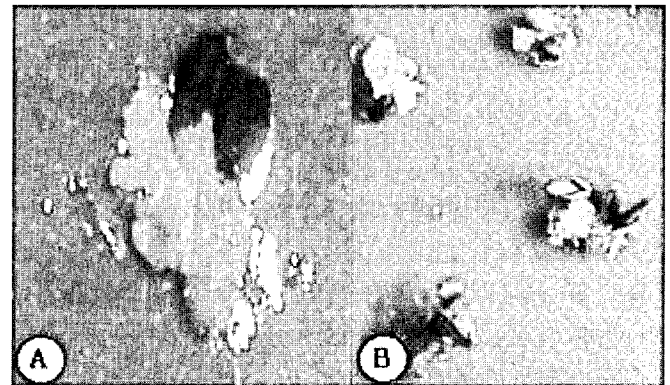


Fig. 5. Formation of shoot from callus in floral bud culture of *B. latissimum* on 1/2 MS medium supplemented with 2.0mg · L⁻¹ 2,4-D and 1.0mg · L⁻¹ BA. A, shoot formation after 4 weeks; and B, shoot formation after 8 weeks.

닌 중 BA가 효과적이며 고농도보다는 저농도에서 오히려 양호할 것으로 생각된다.

오옥신의 종류 및 농도에 따른 발근

캘러스에서 분화된 초장 1.5~2.0cm의 신태를 분리하여 1/2 MS배지에 NAA와 IAA를 단용처리한 결과 계대배양 2주일 후부터 신태의 기부 또는 기부에서 형성된 캘러스에서 발근이 시작되었으며 가늘고 흰 실 같은 모양의 뿌리가 분화되었는데 NAA 처리구가 발근에 효과적이었다(Fig. 6).

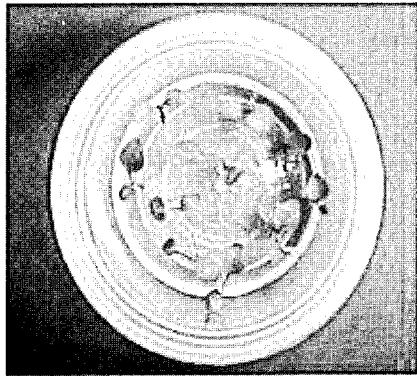


Fig. 6. Rooting from *in vitro* shoots of *B. latissimum* on 1/2 MS medium supplemented with 1.5mg · L⁻¹ NAA after 4 weeks of subculture.

또한 발근율은 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 대조구에서 57.8%를 보였으나 NAA 0.5mg · L⁻¹ 처리구에서는 92.2%를 나타냈고 농도가 증가함에 따라 향상되어 1.5mg · L⁻¹에서는 97.8%로 높았다(Fig. 7). 그러나 IAA 처리구는 대조구와 별다른 차이를 보이지 않았다.

식물생장조절물질은 기관 형성에 매우 중요한 요인으로 오옥신과 사이토키닌의 비율이 줄거나 뿌리의 분화를 유도하는데 결정적인 역할을 하는데(Skoog and Miller, 1957), 신태가 형성될 때는 사이토키닌에 의해 뿌리의 발생이 억제되고 뿌리가 발생하는 동안에는 오옥신에 의해 신태의 형성이 억제된다.

Lee 등(1994a)의 보고에 의하면 같은 산형과 식물인 천궁에서 MS배지보다는 1/2 MS배지일 때 발근율이 높다고 하였으며 Park 등(1995)은 시호의 발근 촉진을 위해 오옥신류인 IAA, NAA, IBA를 달리 처리하였을 때 신태당 발근수는 오옥신 종류에 따라 큰 차이를 보이지 않았으나, 신태의 발근과 신장에 효과적인 오옥신은 IAA라고 보고하였다. 또한 본 실험과 같이 기무릇(*Pinellia ternata*)도 0.5~1.0mg · L⁻¹ NAA를 단용처리하였을 때 발근과 근수 증가에 효과적이었다고 Seong 등(1987)은 보고하였다.

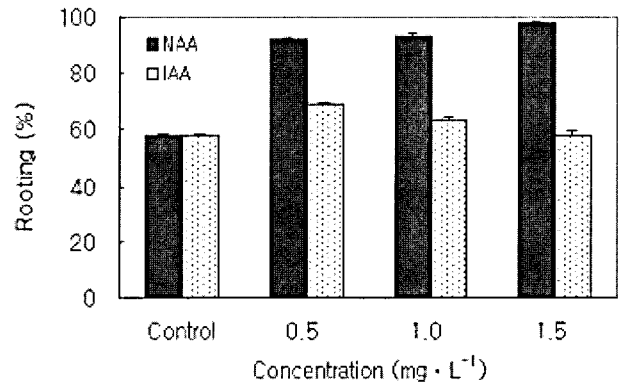


Fig. 7. Root formation from *in vitro* shoots of *B. latissimum* on 1/2 MS medium supplemented with NAA and IAA after 4 weeks of subculture.

생존율을 높은 순화 용토 선발

원예용상토, 버미큘라이트, 펄라이트의 단독 및 버미큘라이트와 펄라이트를 혼합한 인공용토에 순화한 결과(Table 2), 원예용상토에서 유식물체 생육이 양호하였으며, 버미큘라이트와 펄라이트 혼합구에서는 저조하였다(Fig. 8).

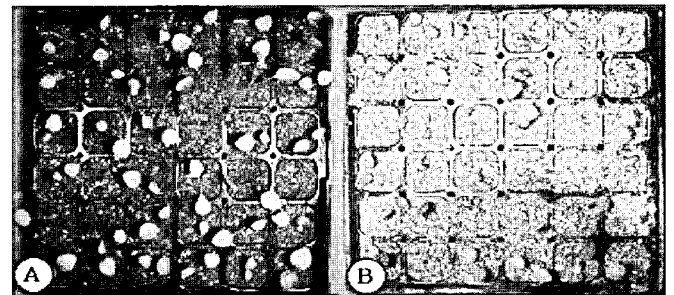


Fig. 8. Acclimatization of plantlets regenerated from callus of *B. latissimum*. Artificial soil: A, soil of horticulture; and B, mixture of 1/2 vermiculite and 1/2 perlite.

생존율은 원예용상토에서 86.1%로 가장 높았으며 버미큘라이트에서는 75.0%, 펄라이트에서는 52.8%, 버미큘라이트와 펄라이트 혼합구에서는 38.9%를 보였다.

재분화 식물체의 토양 이식에 따른 생존율은 초본식물의 경우 충분한 순화과정을 거쳐 상당히 향상시킬 수 있는데, 털머위는 버미큘라이트에서 95%, 펄라이트에서 75%의 높은 생존율을 보였다(Lee *et al.*, 2002). 그러나 가시오갈피의 생존율은 원예용상토에서 41%로 양호한 반면 버미큘라이트, 펄라이트, 버미큘라이트와 펄라이트 혼합구 모두 20% 이하로 낮았다(Li *et al.*, 2005).

이상으로 섬시호의 기내 대량 증식을 위해서는 화퇴 조직을 이용하는 것이 좋으며 캘러스 형성을 위해서는 2.0mg · L⁻¹

Table 2. Effect of artificial soils on plant growth of plantlets regenerated from callus of *B. latissimum* at acclimatization

Artificial soils	Plant height (mm)		Root length (mm)		Fresh weight (mg)		Percentage of survived plantlet	
Soil for horticulture*	35.5 ± 1.3 ^a	a ^y	26.4 ± 3.2	a	126.2 ± 2.9	a	86.1 ± 1.6	a
Vermiculite	25.5 ± 1.0	bc	22.2 ± 4.4	b	108.8 ± 4.3	b	75.0 ± 3.2	b
Perlite	27.5 ± 1.4	b	19.8 ± 4.2	b	95.3 ± 3.4	c	52.8 ± 3.2	c
1/2 vermiculite+1/2 perlite	22.6 ± 1.2	c	18.1 ± 1.1	c	95.9 ± 2.7	c	38.9 ± 1.6	d

^aData represent the mean ± S.E. of three replicates.

^yMean separation within columns by Duncan's multiple range test 5% level.

*Soil for horticulture were mixed 55% cocopeat, 25% peatmoss, 10% vermiculite and 10% zeolite.

2,4-D에 1.0mg · L⁻¹ TDZ를 첨가한 배지를 사용하고 식물체 재분화는 1/2 MS 배지를 기본배지로 한 2.0mg · L⁻¹ 2,4-D에 1.0mg · L⁻¹ BA 혼용처리에서 양호하며 발근 배지로는 1/2 MS 배지에 1.5mg · L⁻¹ NAA를 첨가하는 것이 좋고 생존율을 높이기 위해서 순화용토로 원예용상토를 사용하여 고산면에 5,000주를 순화중에 있다.

적 요

엽, 엽병과 화퇴 등의 치상 절편체 부위 모두에서 캘러스가 형성되었으며 특히 화퇴에서 캘러스 형성률이 71.6%로 가장 높았다. 화퇴배양시 2.0mg · L⁻¹ 2,4-D와 1.0mg · L⁻¹ TDZ의 혼용처리구에서 캘러스 형성이 77.8%로 양호했으며 신초 재분화율 역시 42.6%를 보였다. 캘러스 형성과 신초 재분화를 동시에 시킬 때 1/2 MS배지가 효과적이었는데 1/2 MS배지에서 캘러스 형성률은 46.3%, 신초 재분화율은 13.0%, 그리고 발근율은 13.0%를 보였다. 캘러스를 통한 신초의 재분화를 위해 1/2 MS 배지에 2.0mg · L⁻¹ 2,4-D와 1.0mg · L⁻¹ BA를 첨가했을 때 신초 재분화율은 74.1%를 보였고 절편체당 신초수는 2.4개로 좋았다. 발근율은 대조구에서 57.8%로 낮았으나 1.5mg · L⁻¹ NAA 첨가된 배지에서 97.8%로 높았다. 재분화된 기내 식물체를 원예용 상토에 순화했을 때 생존률이 86.1%로 높았으며 초장, 근장, 생체중 역시 양호하였다

사 사

본 연구는 환경부 한국환경기술진흥원 차세대핵심환경기술 개발사업의 연구비 지원(과제번호 052-061-050)으로 수행되었습니다.

인용문헌

Ahn, J.K. 2004. Taxonomic relationship of *Bupleurum latissimum* Nakai (Apiaceae), endemic to Ulleung island, Korea. MS Thesis.

Chonbuk Nat' I Univ., Korea.

Amano A., K. Fujimoto, K. Ohashi, K. Matrunaga and H. Mizukami. 1989. Chromosome number variation in *Bupleurum falcatum* plant regenerated through somatic embryogenesis of callus cultures. Shoyakugaku Zasshi 43: 13-18.

Choi, H.K., H.J. Kim, H.C. Shin and Y.D. Kim. 1996. Phylogeny and ribosomal DNA variations of *Bupleurum* (Umbelliferae). Kor. J. Plant Tax. 26: 219-233.

Choi, S.U., S.H. Nam, G.J. Yang, M.J. Cho and M.S. Yang. 1994. Plant regeneration from the stem tissue of *Orostachys japonicus*. A. Berger. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 21: 65-68.

Chung, J.D., C.K. Chun, Y.K. Sun and E.M. Rhee. 1983. *In vitro* propagation of *Hyacinth orientalis* L. III. Effect of auxin concentrations and light or dark incubation on organogenesis from stalk tissue and comparison of totipotency between bulb scale and flower stalk tissue. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 24: 162-168.

Hiraoka, N., T. Kodama, M. Oyangi, S. Nakano, Y. Tomita, N. Yamada, O. Iida and M. Satake. 1986. Characteristics of *Bupleurum falcatum* plants propagated through somatic embryogenesis of callus cultures. Plant Cell Reports 5: 319-321.

Homma, Y. and T. Asahira. 1985. New means of *Phalaenopsis* propagation with internode section of flower stalk. J. Japan. Hort. Soc. Sci. 54: 379-387.

Jeong, J.J. 1999. Influence of the several factors on the rooting of *Sedum rotundifolium* stem and leaf cuttings. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 40: 631-634.

Kim, J.H. and K.W. Park. 1988. Effects of NAA and BA on the organ differentiation of horseradish (*Armoracia rusticana*) cultured *in vitro*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 29: 272-282.

Kim, K.W., J.D. Choi and M.S. Byun. 1999. Effects of culture conditions on organogenesis in *Gladiolus* 'Topaz' callus. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 26: 223-227.

Kim, Y.S. and C.Y. Yoon, 1990. A taxonomic study on the genus *Bupleurum* in Korea. Kor. J. Plant Tax. 20: 209-242.

- Lee, H.S., J.D. Chung, C.B. Kim, J.T. Yoon and B.S. Choi. 1994a. *In vitro* propagation of *Cnidium officinale* Makino through shoot tip culture. Kor. J. Plant Biotech. 21: 221-225.
- Lee, H.S., J.I. Lee, S.R. Ryu, S.D. Kim and S.M. Kim. 1994b. Effect of medium, growth regulators and activated charcoal on plant regeneration from *in vitro* culture of *Dioscorea japonica* Thunberg. Kor. J. Med. Crop Sci. 2: 51-59.
- Lee, H.S., S.N. Ryu, J.I. Lee and C.Y. Cho. 1993. Effect of medium and growth regulators on tuber propagation by *in vitro* culture of yam (*Dioscorea japonica* Thunberg). Kor. J. Med. Crop Sci. 1: 28-37.
- Lee, M.H., E.S. Yoon, S.J. Jung, K.H. Bae, J.W. Seo and Y.E. Choi. 2002. Plant regeneration and effect of auxin and cytokinin on adventitious shoot formation from seedling explant of *Taraxacum platycarpum*. Kor. J. Plant Biotech. 29: 111-115.
- Lee, S.Y., S.O. Yoo, J.H. Bae and J.H. Lee. 2002. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration of *Farfugium japonica*. Kor. J. Plant Biotech. 29: 45-49.
- Lee, S.Y., T.S. Kim, H.S. Kim and Y.T. Lee. 1988. Somatic embryogenesis of *Bupleurum falcatum* L. I. Effects of growth regulator, glutamine and activated charcoal. Kor. J. Breed. 20: 191-198.
- Li, C.H., J.D. Lim, Y.J. Kim, N.Y. Kim and C.Y. Yu. 2005. Acclimatization and growth characteristics of plantlets of *Eleutherococcus senticosus* Maxim. cultured by bioreactor. Kor. J. Med. Crop Sci. 13: 133-137.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-479.
- Neves, S.S. and M.F. Watson. 2004. Phylogenetic relationships in *Bupleurum* (Apiaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence data. Ann. Bot. 93: 379-398.
- Park, C.H., C.Y. Yu, D.W. Kim J.S. Seo, S.D. Ahn and B.H. Chang. 1994a. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from root suspension culture of *Bupleurum falcatum* L.. Kor. J. Breed. 26: 41-45.
- Park, C.H., C.Y. Yu, D.W. Kim, S.D. Ahn and B.H. Chang. 1994b. Plant regeneration of *Bupleurum* spp. through somatic tissue culture. Kor. J. Med. Crop Sci. 2: 60-66.
- Park, C.H., N.S. Seong, S.T. Lee, H.G. Chung and E.S. Park. 1995. Callus formation and plantlet regeneration for anther culture in *Bupleurum falcatum* L.. Kor. J. Breed. 27: 387-393.
- Park, S.U. and Y.A. Chae. 1994. Effect of carbon and nitrogen source on somatic embryogenesis in suspension culture of *Ligusticum chuanxiang*. Hort. Kor. J. Med. Crop Sci. 2: 44-50.
- Ryu, J.H., H.S. Doo and T.H. Kwon. 1992. Induction of haploid plants by anther culture in sesame (*Sesamum indicum* L. I. Effects of growth regulators and difference between genotype on callus induction. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 19: 171-177.
- Seong, R.S., P.H. Jo, K.H. Park, H.H. Bae, W.Y. Soh and D.Y. Cho. 1987. Rapid propagation of *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit via tissue culture. Kor. J. Plant Tiss. Cult. 15: 75-80.
- Skoog, F. and C.O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. pp. 118-140. In: The Biological Action of Growth Substances. Symp. Soc. Exp. Biol. Academic Press, New York.
- Xia, G.M., Z. Li, G.Q. Guo and H.M. Chen. 1992. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of *Bupleurum scorzonerifolium* Wild.. Plant Cell Reports 11: 155-158.
- 김무열. 2004. 한국의 특산식물. 술과학. pp. 136.
- 이창복. 1980. 대한식물도감. 향문사. pp. 578.
- 정성현, 인동수, 방재욱. 1994. 시호의 원형질체 배양을 통한 식물체의 재분화. 한국약용작물학회 발표요지 pp. 42.
- 平岡昇, 鉦知子, 富田裕. 1983. 組織培養によるミシユサイユの繁殖. 生藥學雜誌 37: 62-67.

(접수일 2007.2.15 ; 수락일 2007.8.6)