J Plant Biotechnol (2018) 45:266-272
DOI:https://doi.org/10.5010/JPB.2018.45.3.266

ISSN 1229-2818 (Print)
ISSN 2384-1397 (Online)

Research Article

층층둥굴레(*Polygonatum stenophyllum* Maxim.)의 캘러스 유도 및 기내 식물체 분화

박민완 · 류시현 · 이윤영 · 송재모 · 김진호 · 안영희 · 배기화

Callus induction and *in vitro* plant regeneration of *Polygonatum stenophyllum* Maxim.

Min Wan Park · Shi Hyun Ryu · Yoon Young Lee · Jae-Mo Song · Jin Ho Kim · Young-Hee Ahn · Kee Hwa Bae

Received: 10 August 2018 / Revised: 23 August 2018 / Accepted: 23 August 2018

Abstract A*Polygonatum stenophyllum* Maxim. is an important endangered plant belonging to the family Liliaceae. A method was developed for the rapid micropropagation of *P. stenophyllum* through plant regeneration from rhizome (1-year, 3-years, and 5-years) explant-derived calli. The rhizome segments were cultured in Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with varying concentrations of 2,4-D (0, 0.5, 1.0, 1.5 mg·L^{-1}) for callus induction. In media supplemented with 0.5 mg·L^{-1} of 2,4-D, 87% of 3-years rhizome produced callus. Subsequently, the callus was transferred to 1/2MS medium supplemented with various concentrations of IAA, IBA, NAA, and 2,4-D (0, 0.1, 0.5 and 1.0 mg·L^{-1}) for adventitious shoot formation. The highest percentage of adventitious shoot induction (57%) was observed in 1/2MS medium containing 0.5 mg·L^{-1} of NAA. Elongation of the adventitious shoot was achieved in 1/2MS medium supplemented with 0.1 mg·L^{-1} of BA. Rooting was achieved in 1/2MS medium without any hormones. It is hypothesized that the stated *in vitro* propagation protocol will be useful for conservation and mass propagation of the endangered *Polygonatum stenophyllum* Maxim. for bio-resources.

Keywords Adventitious shoot, Rhizome, Root induction

M. W. Park · S. H. Ryu · K. H. Bae (✉)
국립낙동강생물자원관
(Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju, 37242, Republic of Korea)
e-mail: khbae7724@nnibr.re.kr

Y. Y. Lee
황학산수목원
(Hwanghaksan Arboretum, Yeoju, 12653, Republic of Korea)

J.-M. Song
강원도산림개발연구원
(Forest Science Institute of Gangwon Province, Chuncheon 24207, Republic of Korea)

M. W. Park · J. H. Kim
경북대학교
(Kyungpook National University, Sangju, 37224, Republic of Korea)

Y.-H. Ahn
중앙대학교
(Department of Plant System Science, Chung-Ang University, Anseong 17546, Republic of Korea)

서 론

층층둥굴레(*Polygonatum stenophyllum* Maxim.)는 백합과(Liliaceae) 둥굴레속(*Polygonatum*)에 속하는 다년생식물이다. 본 연구의 대상종인 층층둥굴레가 속한 둥굴레속은 북반구 온대지방에 30 ~ 40여종이 자라며, 우리나라에는 10종, 4변종이 분포하고 있는 것으로 알려져 있다. 우리나라에서는 경기도, 강원도, 충청도 일대의 강이나 모래가 퇴적된 하천주변에 자생하며, 야생 생육형태 중 지하부의 특징으로는 수평방향으로 지하경이 신장한다. 줄기는 30 ~ 90 cm로 털이 없어 표면이 매끈하며 잎의 앞면은 녹색이고 뒷면은 연한 녹색을 띠며 대생한다. 층층둥굴레는 마디사이가 위로 올라갈수록 넓어지는 것이 다른 둥굴레와 다른 특징이다. 꽃은 6월에 피고 황색이며 잎겨드랑이에 달린다. 열매는 장과(漿果)로 9월에 검게 익는다(Jang et al. 1998).

예로부터 층층둥굴레가 포함된 둥굴레속은 자양, 강장의 효능이 있다고 전해지며 말린 근경은 황정(黃精), 편황정(片黃精), 옥죽(玉竹)이라는 이름의 한방약재로 사용되어 왔다(Kim 1996; Ahn 2003). 이러한 효능을 검증하기 위해 10여년 전부터 둥굴레속 식물의 천연물 연구와 관련하여 여러 연구자들에 의해 항비만(Ko et al. 2015), 항산화와 항피로(Kim et al. 2016), 지방세포분해억제(Jang and Jung 2010), 항암효능(Jeong and Jeong 2011), 미백효과(Kim 2008) 등이 연구되었다.

또한 둥굴레속의 근경은 점액질이 풍부하고 전분질, 아미노산, 알카로이드 등의 성분을 많이 함유하고 있어 식품학적으로도 우수한 것으로 보고되었다(Lee et al. 2000). 말린 근경을 볶았을 때 구수한 풍미가 더해져 예로부터 전통차로 많이 음용되었다(Park et al. 2000). 이러한 이유로 근래에는 전통차 중 둥굴레차가 녹차 다음으로 많이 음용되고 또한 근경의 수요도 늘어날 것으로 전망하고 있다(Ryu et al. 1995). 그리고 본 연구의 대상종인 층층둥굴레의 새순과 여린 줄기는 식약청 식품원재료서비스에 등록된 식용가능 식물자원이여서 앞으로 다양한 생물소재로도 활용이 가능할 것으로 보여 진다(Lee et al. 2000; Jang et al. 2004).

이러한 식·의학적 가치에 비해 둥굴레속의 증식에 관한 연구는 매우 미비한 실정이다. 둥굴레 종자의 발아에 미치는 저장기간, 온도 및 priming 처리의 영향에 관한 연구(Jang and Lee 2007)만 수행되었을 뿐 조직배양 등 개체증식에 관한 전반적인 연구는 국내외적으로 전무한 실정이다.

한편, 층층둥굴레는 경제개발에 따른 급속한 환경파괴와 전지구적 기후변화 등으로 인해 자생지가 교란되면서 법정보호식물(멸종위기야생식물 2급)로 지정되어 보호를 받았다. 하지만 층층둥굴레는 환경부에서 2017년 멸종위기야생생물 목록 재개정 시 자생지내 개체수 증가 등의 이유로 목록에서 제외가 되어 관심종으로 분류되었다. 우리는 층층둥굴레가 멸종위기야생생물에서 해제되기 전부터 그들의 증식과 보전을 위하여 자생지 조사와 더불어 생리적 특성에 대해 면밀히 조사를 하고 있었다. 또한 증식과 보전연구의 일환으로 종자 번식, 기내증식 등의 지속적인 연구도 수행하고 있다. 따라서 본 연구는 층층둥굴레의 세포에서 유래된 재분화 개체의 증식법을 연구하여 또 다시 멸종위기에 처하지 않도록 복원에 대한 안전한 가이드라인을 제시하고, 생물소재 활용을 위한 대량증식 매뉴얼 개발의 기초자료를 확보하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 배양조건

본 실험에 사용된 층층둥굴레(*Polygonatum stenophyllum* Maxim)는 여주에 위치한 황학산수목원에서 종자와 3년생, 5년생 개체를 분양받았고, 3년생, 5년생 개체는 근경을 분리하여 살균 후 기내 도입하였다. 층층둥굴레 근경의 살균 방법은 분리한 3년생, 5년생 근경에 묻은 이물질을 흐르는 물에서 수세하고 멸균된 증류수로 1차 세척한 다음 70% ethanol에 1분간 표면 살균한 후, 1% NaOCl 용액에 침지하여 20분간 흔들어 주었다. NaOCl용액을 제거하기 위해 멸균된 증류수로 5회 수세한 후 배지에 치상하였다. 종자도 위와 동일한 방법으로 살균하여 1/3MS배지에 올린 후 발아된 개체의 근경을 실험에 사용하였다. 모든 배양은 온도 22± 1°C, 광주기 16/8시간, 광도 46 $\mu mol \cdot m^{-2}s^{-1}$의 배양실에서 배양하였다. 사용된 배지는 MS (Murashige and Skoog 1962)배지에 30 $g \cdot L^{-1}$ sucrose (Duchefa, Netherland), 4.0 $g \cdot L^{-1}$ gelrite (Duchefa, Netherland), pH 5.7)를 기본으로 제조하고 옥신류 및 사이토키닌 호르몬을 첨가하여 페트리디쉬(12 × 5 cm)에 50 mL씩, 4각 plastic 배양병(SPL, Korea)에 각각 100 mL씩 분주하였다.

층층둥굴레 연생별 근경의 캘러스 유도

층층둥굴레의 1년, 3년, 5년생 근경 절편으로부터 캘러스를 유도하기 위한 배지는 MS 기본 배지에 옥신류 호르몬인 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid, Duchefa, Netherland)를 각각 0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 $mg \cdot L^{-1}$을 첨가하고 sucrose 30 $g \cdot L^{-1}$, gelrite 4.0 $g \cdot L^{-1}$, pH 5.8로 조정하고 121°C, 20분간 고온고압의 증기멸균을 한 다음, 페트리디쉬에 50 mL씩 분주하여 제조하였다. 준비된 배지 위에 1 × 1 cm로 절단한 1년생, 3년생, 5년생 층층둥굴레 근경을 배지별로 30개씩 3 반복하여 치상한 다음 28℃ 암조건에서 5주간 배양하고 2주간 동안은 1회 계대배양을 하였다. 배양 5주후에 연생별 근경 절편으로부터 캘러스 유도율을 조사하였다.

Auxin류 호르몬 처리농도별 부정아 유도

층층둥굴레 캘러스 유래의 부정아 유도조건을 조사하기 위해 호르몬이 첨가되지 않은 MS배지에서 2회에 걸쳐 계대배양한 캘러스를 절단하여 100 ~ 200 mg 취해 옥신류 호르몬인 IAA (Indole acetic acid, Duchefa, Netherland), IBA (Indole butiric acid, Duchefa, Netherland), 2,4-D, NAA (Naphthalene acetic acid, Duchefa, Netherland)를 각각 0, 0.1, 0.5, 1.0 $mg \cdot L^{-1}$씩 처리한 1/2MS배지(20 $g \cdot L^{-1}$ sucrose, 4.0 $g \cdot L^{-1}$, gelrite, pH 5.7)에 20개씩 5반복 치상하여 4주간 배양한 후 처리구당 부정아 유도율을 조사하였다.

BA와 Kinetin 처리에 따른 부정아 신장

층층둥굴레 캘러스 유래 부정아의 줄기 신장을 조사하기 위해 부정아를 호르몬이 첨가되지 않은 MS배지에서 2주간 전배양하였다. 그런 다음 BA (Benzylaminopurine, Duchefa, Netherland)와, Kinetin (Duchefa, Netherland)을 각각 0.5, 1.0, 3.0 $mg \cdot L^{-1}$씩 처리한 1/2MS배지(20 $g \cdot L^{-1}$ sucrose, 4.0 $g \cdot L^{-1}$ gelrite, pH 5.7)에 20개씩 3반복 치상하여 4주간 배양한 후 처리구당 신초 신장에 따른 길이를 측정하였다. 광주기 16/8h, 온도 22 ± 1℃에서 4주간 배양한 후 부정아 줄기의 길이를 조사하였다.

발근 및 기내 증식

층층둥굴레 캘러스 유래의 부정아의 신초가 자란 후 뿌리의 신장을 살펴보기 위하여 옥신류 호르몬인 NAA, IBA, 2,4-D를 각각 0, 0.1, 0.5, 1.0 $mg \cdot L^{-1}$ 씩 처리한 1/2MS배지(20 $g \cdot L^{-1}$ sucrose, 4.0 $g \cdot L^{-1}$ gelrite, pH 5.7)에 4개씩 5반복 치상하여 4주간 배양한 후 처리구당 뿌리 신장 길이를 측정하였다.

통계분석

모든 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였고, 집단 간 변이 차이를 알아보기 위해서 one-way ANOVA를 실시하여, 유의성이 있는 경우 Duncan's multiple range test로 사후검증을 실시하였다. 통계적 유의성은 $P<0.05$로 설정하여 분석하였다.

결과 및 고찰

연 근경별, 호르몬 종류 및 농도별 층층둥굴레 캘러스 유도

대량 재배조건이 확립되지 않은 야생식물의 조직배양을 통한 대량증식체계 확립을 위해서는 초기 배양재료의 선택이 중요하다. 층층둥굴레는 야생에서 채취가 어렵고 2년 발아를 한다고 알려져 있어 조직배양을 통한 야생복원과 생물소재로 활용하기가 매우 까다롭다. 따라서 조직배양을 통한 원활한 식물체 생산을 위해 본 연구에서는 우선 근경의 노화 정도에 따라 캘러스 유도율을 조사하였다. 층층둥굴레의 연근경별 캘러스 유도에 미치는 각각의 호르몬종류와 농도를 알아보기 위해 1년(Fig. 1A)생, 3년(Fig. 1B)생, 5년(Fig. 1C)생 근경을 절단하여 옥신류 호르몬이 첨가된 MS배지에 배양한 결과, 호르몬 무처리구에서는 캘러스가 전혀 유도되지 않았다(Fig. 1D, Table 1). 하지만 근경의 생육기간 별 캘러스

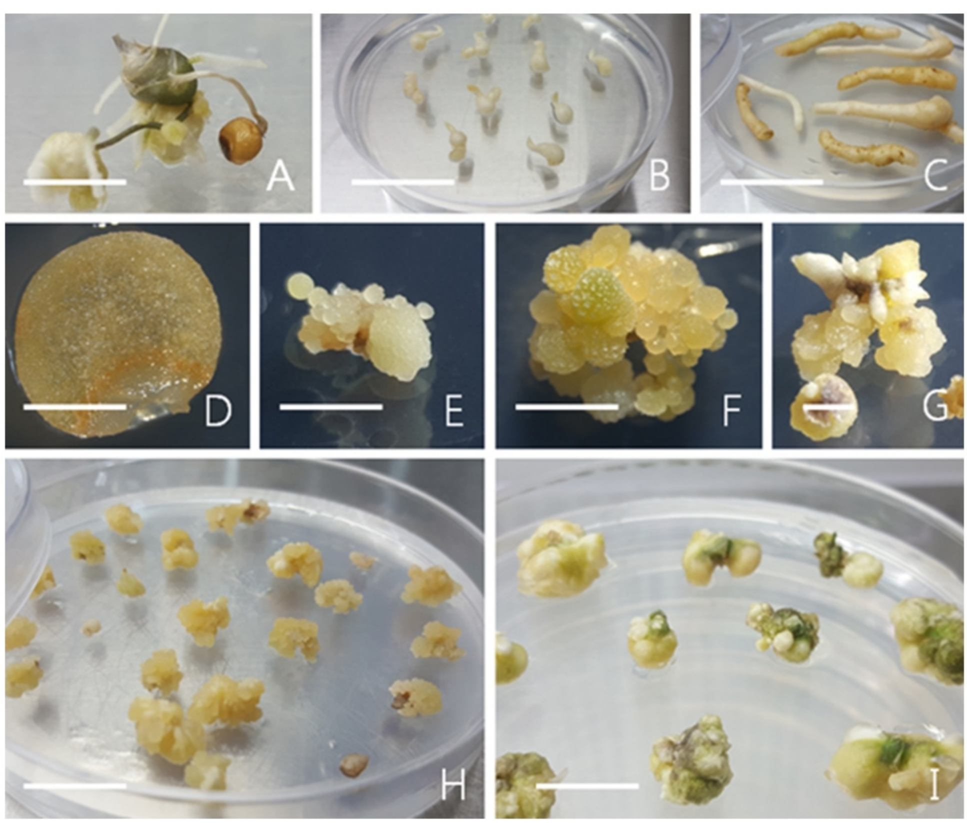

Fig. 1 Callus induction of *P. stenophyllum*. A: 1-year rhizome (scale bar, 2 cm), B: 3-years rhizome (scale bar, 4 cm), C: 5-years rhizome (scale bar, 4 cm), D: Without 2,4-D (scale bar, 50 mm), E: 1-year rhizome in the presence of 0.5 $mg \cdot L^{-1}$ 2,4-D (scale bar, 30 mm), F: 2-years rhizome in the presence of 0.5 $mg \cdot L^{-1}$ of 2,4-D (scale bar, 20 mm), G: 5-years rhizome in the presence of 0.5 $mg \cdot L^{-1}$ of 2,4-D (scale bar, 20 mm), H: Yellowish callus induction in the presence of 0.5 $mg \cdot L^{-1}$ of 2,4-D after 6 weeks of culture (scale bar, 2 cm), I: Development of greenish callus in the presence of 1.0 $mg \cdot L^{-1}$ of BA and 0.1 $mg \cdot L^{-1}$ of NAA after 6 weeks of culture (scale bar, 2 cm)

Table 1 Effect of varying concentrations of 2,4-D and age of rhizome on callus induction of 5 weeks old culture of *P. stenophyllum* in MS medium supplemented with 30 $g{\cdot}L^{-1}$ of sucrose and 4.0 $g{\cdot}L^{-1}$ of gelrite

Concentration of 2,4-D ($mg{\cdot}L^{-1}$)	Callus induction (%)		
2,4-D concentrations ($mg{\cdot}L^{-1}$)	1-year rhizome	3-years rhizome	5-years rhizome
0	0	0	0
0.1	42.4±5.2b	44.8±3.4b	21.6±7.1b
0.5	67.8±6.4a	87.6±7.2a	50.6±12.1a
1.0	39.4±7.2c	38.4±5.3c	21.4±7.8b
1.5	9.2±4.5d	12.2±2.1d	6.4±2.2c

*Data are the means ± SD, of three experiments. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncan's multiple range tests at $P < 0.05$.

유도는 2,4-D 호르몬이 첨가하여 배양하면 1년생(Fig. 1E), 3년생(Fig. 1F), 5년생(Fig. 1G) 근경 모두에서 노란색의 캘러스가 유도되었다. 캘러스 유도율은 0.5 $mg{\cdot}L^{-1}$ 2,4-D가 첨가된 배지에 3년생 근경을 배양할 경우 87%로 가장 높게 조사되었다(Table 1). 한편, 2,4-D의 농도가 높아지면 캘러스 유도율이 감소하는 경향을 보였다(Table 1). 각각의 층층둥굴레 근경으로부터 유도된 캘러스를 핀셋으로 절취하여 0.5 $mg{\cdot}L^{-1}$ 2,4-D가 첨가된 배지에 6주간 배양한 결과 구형의 노란색 캘러스 덩어리가 다량으로 증식된다(Fig. 1H). 6주 후 증식된 캘러스를 1.0 $mg{\cdot}L^{-1}$ BA와 0.1 $mg{\cdot}L^{-1}$ NAA가 혼합 처리된 배지에 치상하면 경화된 초록색의 캘러스가 유도 되고(Fig. 1I) 이렇게 유도된 캘러스를 절단하여 부정아 유도의 실험재료로 사용하였다. 층층둥굴레를 비롯한 둥굴레속 식물의 근경을 이용한 캘러스 유도는 현재까지 연구된 바가 없다. 동속은 아니지만 백합과의 조경수종인 소엽맥문동의 캘러스유도를 통한 식물체 재분화 연구에서도 1.0 $mg{\cdot}L^{-1}$ 2,4-D 처리구에 근경을 배양하면 91%의 캘러스 유도율을 보인다고 하여 본 연구와 비슷한 결과를 보였다(Bae and Yoon 2013).

층층둥굴레 캘러스 유래의 부정아 기내증식

경화된 층층둥굴레 캘러스(Fig. 1I)를 절단하여 부정아를 유도하기 위해 옥신류 호르몬 종류와 농도가 다르게 처리된 배지에서 8주간 배양한 결과, 옥신류 호르몬이 첨가되지 않은 대조구(1/2MS배지)에서는 부정아가 유도되지 않았지만 (Table 2), 0.5 $mg{\cdot}L^{-1}$ NAA 처리구에서는 배양 4주 후부터 절단부위에 캘러스가 만들어 지고 6주가 경과되면 부정아가 유도되었다(Fig. 2A). 한편, NAA를 제외한 다른 옥신류 처리구에서는 부정아 유도율이 5%미만으로 조사되었고(Table 2), 사이토키닌류인 BA와 Kinetin을 처리구는 전혀 부정아 유도가 이루어지지 않았다(데이터 미제시). 본 실험 결과 층층둥굴레 캘러스로부터 부정아를 유도하기 위해서는 NAA의 처리가 가장 효과적인 것을 확인할 수 있었다. Matsuoka와 Hinata (1979)에 의해 8.0 $mg{\cdot}L^{-1}$ NAA처리는 *Solarium melongena*의 배축절편으로부터 부정아 유도의 최적조건이 라고 보고한 바 있다. 이후 종마다 다르지만 BA 또는 Kinetin의 조합처리가 부정아 유도에 효과적인 것을 많은 연구자들에 의해 연구되고 있다(Meyer and van Staden 1998; Shibli and Ajlouni 2000; Koh 2005; Madubanya et al. 2006).

층층둥굴레의 캘러스로부터 유도된 부정아의 신장과 발근에 적합한 호르몬의 종류와 농도를 조사하였다. 부정아의 신장에 적합한 호르몬 처리를 알아보기 위해 1/2MS 배지에 0.1, 0.5, 1.0 $mg{\cdot}L^{-1}$ BA와 Kintin을 단용 처리하여 4주간 배양한 결과는 Table 3과 같다. 층층둥굴레 부정아를 0.1 $mg{\cdot}L^{-1}$ BA가 첨가된 배지에 치상하여 배양할 경우, 4주후에 신초길이는 3 cm로 신장하였고(Fig. 2B), BA의 농도가 높아질수록 감소하는 경향을 보였다. 신초가 신장된 후 호르몬이 첨가되지 않는 1/2MS배지로 옮겨 4주간 배양하면 본엽이 신장되었다(Fig. 2C). 그리고 기내에서 무균적으로 온전한 개체를 생산하기 위해 shoot 부위가 신장된 부정아에서 발근에 적합한 배지를 조사하였다. 발근에 적합한 호르몬 처리농도를 알아보기 위해 신장된 부정아를 옥신류 호르몬이 농도별로 첨가된 배지에 치상하여 4주간 배양한 결과, 호르몬을 처리하지 않은 대조구에서 뿌리의 길이가 11 cm로 조사되었다 (Table 4). 층층둥굴레 부정아 유래의 뿌리는 배양 2주가 경과하면 4 ~ 5개가 배지의 아래 부분으로 길게 1차 신장을 한다. 신장 이후 근단 부분부터 곁뿌리가 유도된다(Fig. 2C). Malabadi 등(2004)은 *Vanda coerulea*에서, Emst(1994)는 *Doritaenopsis*와 *Phalaenopsis*에서 식물생장조절제의 농도가 높은 배지에서 생장, 분화된 신초일수록 발근율이 감소한다고 하였다. 일반적으로 기내배양체(초본, 목본류)의 발근은 토양순화 시 토양활착을 양호하게 하기 위한 전단계로 정상적인 기내발근이 이루어져야 토양순화 후 배양체가 생존할 확률이 높아지는 것이다. 하지만 내생옥신(endogenous auxin)이 많은 식물의 경우 식물생장조절물질이 첨가되지 않은 배지에서도 발근이 잘 이루어지는 것으로 알려져 있다. 특히 목본류인 개느삼(*Echinosophora koreansis*)과 팔손이(*Fatsia japonica*), 초본류인 고추나물(*Hypericum erectum*)의 경우 옥신류 식물생장조절물질 무첨가 배지에서도 20 ~ 50% 이상의 발근률을 보였다(Choi et al. 2005; Kim et al. 2006; Moon and Kim 2008). 층

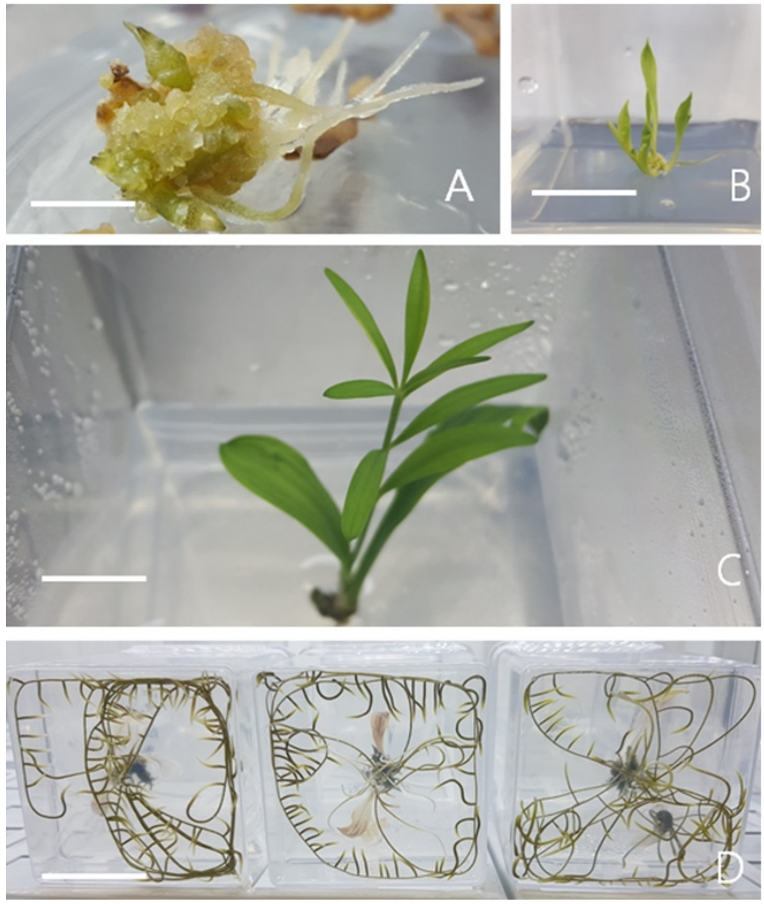

Fig. 2 Plant regeneration from callus derived from *P. stenophyllum*. A: Adventitious shoot induction from callus in 1/2MS medium supplemented with 0.5 mg·L^{-1} of NAA (scale bar, 80 mm), B: Shoot elongation from adventitious shoot in 1/2MS medium supplemented with 0.1 mg·L^{-1} of BA (scale bar, 2 cm), C-D: Shoot conversion and rooting in 1/2MS without PGR's, after 4 weeks of culture (scale bar, 3 cm)

Table 2 Effect of varying concentrations of auxin on adventitious shoot induction of 4 weeks old culture of *P. stenophyllum* callus in 1/2MS medium supplemented with 20 g·L^{-1} of sucrose and 4.0 g·L^{-1} of gelrite

Concentration of auxin (mg·L^{-1})				Adventitious shoot induction (%)
IAA	IBA	NAA	2,4-D	Adventitious shoot induction (%)
0	0	0		0±0*g
0.1				1.3±0.2g
0.5				1.2±0.2g
1.0				1.3±0.1g
	0.1			3.3±0.8e
	0.5			4.3±0.6d
	1.0			2.3±0.6f
		0.1		50.1±2.2c
		0.5		57.3±1.5a
		1.0		53.3±2.1b
			0.1	1.1±0.2g
			0.5	1.3±0.1g
			1.0	1.2±0.3g

*Data are the means ± SD, of three experiments. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncan's multiple range tests at $P < 0.05$.

Table 3 Effects of varying concentrations of BA and kinetin on adventitious shoot elongation in 4-weeks old culture of *P. stenophyllum* in 1/2MS medium supplemented with 20 $g{\cdot}L^{-1}$ of sucrose and 4.0 $g{\cdot}L^{-1}$ of gelrite

Concentration of BA ($mg{\cdot}L^{-1}$)	Concentration of KT ($mg{\cdot}L^{-1}$)	Length of the adventitious shoot (cm)
0	0	0±0*g
0.1		3.1±0.2a
0.5		2.8±0.1b
1.0		2.7±0.1c
	0.1	2.1±0.1d
	0.5	1.7±0.1e
	1.0	1.6±0.1f

*Data are the means ± SD, of three experiments. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncan's multiple range tests at $P < 0.05$.

Table 4 Effect of varying concentrations of auxin on adventitious root elongation in 4-weeks old culture of *P. stenophyllum* in 1/2MS medium supplemented with 20 $g{\cdot}L^{-1}$ sucrose and 4.0 $mg{\cdot}L^{-1}$ gelrite

Concentration of auxin ($mg{\cdot}L^{-1}$)				Length of the adventitious root (cm)
IAA	IBA	NAA	2,4-D	Length of adventitious root (cm)
0	0	0		11.8±1.8*a
0.1				1.4±0.1b
0.5				1.2±0.1b
1.0				1.3±0.1b
	0.1			1.1±0.1b
	0.5			1.3±0.1b
	1.0			1.2±0.1b
		0.1		1.6±0.1b
		0.5		1.6±0.1b
		1.0		1.2±0.1b
			0.1	1.3±0.1b
			0.5	1.1±0.1b
			1.0	1.3±0.1b

*Data are the means ± SD, of three experiments. Different alphabetical letters are significantly different according to Duncan's multiple range tests at $P < 0.05$.

층둥굴레의 발근도 호르몬 무첨가 배지에서 이루어졌다. 이는 위의 결과들과 비교하여 수종은 다르지만 층층둥굴레도 내생옥신이 많아 외부호르몬 처리 없이도 발근이 이루어졌음을 알 수 있었다. 따라서 본 연구결과에서 층층둥굴레 연생별 근경, 옥신종류 및 농도에 따른 최적의 캘러스 유도조건을 조사하였고, 유도된 캘러스를 이용하여 분화에 최적조건을 조사하였다. 또한 발근에 필요한 최적의 조건을 조사하여 성공적인 기내배양을 통한 재분화 시스템을 확립하였다. 이러한 결과는 향후 층층둥굴레의 개체보전과 생물소재 활용을 위한 소재확보에 중요한 기초자료로 사용될 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 백합과에 속하며 환경부에서는 멸종위기종 리스트 중 관심종으로 분류된 층층둥굴레의 기내 증식에 미치는 연근별, 호르몬 종류와 농도별 배양환경을 조사하기 위해 수행되었다. 효과적인 캘러스 유도조건을 알아보고자 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 $mg{\cdot}L^{-1}$의 2,4-D가 첨가된 MS배지에 1, 3, 5년생 층층둥굴레 근경을 치상한 후에 캘러스 유도율을 조사한 결과, 0.5 $mg{\cdot}L^{-1}$ 2,4-D 배지에 2년생 근경 배양한 배지에서 87%의 캘러스 유도율을 보였다. 1년생 근경은 67%, 5년생 근경은 50%로 조사되었다. 층층둥굴레 캘러스 유래의 부정아 유도는 0.5 mg/L NAA 처리구에서 57%로 조사되었다. 호르몬이 첨가되지 않은 대조구에서는 부정아가 유도되지 않았다. 층

층둥굴레 부정아의 신장과 발근에 적합한 호르몬의 종류와 농도를 조사하였다. 층층둥굴레 부정아 신장의 최적 조건은 0.1 mg·L^{-1} BA 호르몬이 첨가된 배지이고 BA의 농도가 높아질수록 감소하는 경향을 보였다. 그리고 기내에서 무균적으로 온전한 개체를 생산하기 위해 shoot 부위가 신장된 부정아에서 발근에 적합한 배지를 조사하였다. 발근에 적합한 조건은 호르몬이 첨가되지 않은 대조구이며 뿌리의 길이는 11 cm로 조사되었다. 본 연구결과에서 층층둥굴레 연생별 근경, 옥신종류 및 농도에 따른 최적의 캘러스 유도조건을 조사하였고, 유도된 캘러스를 이용하여 분화에 최적조건을 조사하였다. 또한 발근에 필요한 최적의 조건을 조사하여 성공적인 기내배양을 통한 재분화 시스템을 확립하였다. 이러한 결과는 향후 층층둥굴레의 개체보전과 생물소재 활용을 위한 소재확보에 중요한 기초자료를 제공할 것으로 생각된다.

사 사

본 논문은 환경부 국립낙동강생물자원관 2018년 "서식지외 보전기관 운영" 사업의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

Ahn DK (2003) Illustrated Book of Korean Medicinal Herbs. Kyo-Hak Publishing Co., Ltd. Seoul pp 708-709

Bae KH, Yoon ES (2013) Callus induction and plant regeneration from *Ophiopogon japonicus* (L.f.) Ker Gawl in ornamental species. Kor J Nature Conservation 7(1):35-41

Chang YD, Lee CH (2007) Effect of storage duration, temperature and priming treatment on seed germination of *Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum*. Kor J Plant Res 20(5):481-489

Choi KM, Hwang SJ, Ahn JC, Lee HY, Kim JH, Hwang B. (2005) *In vitro* propagation from axillary bud explants of *Fatsia japonica* Deene. et Planch. Kor J Med Crop Sci 13(6): 300-303

Emst R (1994) Effects of thidiazuron on *in vitro* propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae). Plant Cell Tiss Org Cult 39:273-275

Jang JS, Jung JC (2010) Anti-adipogenic effect of kaempferol. a component of *Polygonati rhizoma*. J Kor Oriental Med 31(2):158-166

Jang KH, Park JM, Kang JH, Lee ST (1998) Growth and flowering characteristics of *Polygonatum* spp. Kor J Medicinal 6(2): 142-148

Jang KY, Song GW, Chung JI, Kang JH (2004) Analysis of genetic relationships of Korean native *Polygunatum* spp. Kor J Medicinal Crop Sci 12(3):214-218

Jeong YS, Jeong JC (2011) Anti-tumor effect of kaempferol, a component of *Polugonati rhizoma*, in lung cancer cells. Kor J Oriental Physiology & Pathology 25(5):816-822

Ko JH, Jeon UJ, Kwon HS, Yeon SU, Kang JH (2015) Anti-obesity effects of ethanolic extract of *Polygonatum sibiricum* rhizome in high-fat diet-fed mice. Kor J Food Sci Technol 47(4): 499-503

Koh JC (2005) Callus culture and plant regeneration from shoot apex of *Iris Sanguinea* Donn ex. Horn. J Plant Biotechnol 3(1):93-98

Kim IC (2008) Antioxidative properties and whitening effects of the *Polygoni Multiflori* Radix, *Polygonati Rhizoma* and *Ephedrae Herba*. Kor Oil Chemists' Society 25(4):533-538

Kim JS, Lee AR, Roh SS, Kwon OJ, Seo YB (2016) Antioxidant and anti-physical fatigue effects of *Polygonati rhizoma* and steamed *Polygonati rhizoma*. Kor J Herbol 31(3):49-57

Kim ML, Nam DW, Ahn JC, Hwang B (2006) Micropropagation of *Hypericum erectum* by axillary bud culture. Kor J Med Crop Sci 14:23-26

Kim SD, Park SY, Kim TJ, Cheong IM, Kim SM (1996) Studies on the promoting of seed germination of *Adenophora triphylla* var. *japonica* Hara. Kor J Plant Res 9:171-176

Lee GD, Lee JE, Kwon JH (2000) Application of response surface methodology in food industry. Food and Industry 33:33-45

Madubanya LA, Makunga NP, Fennell CW (2006) *Dierama luteoalbidum* : liquid culture provides an efficient system for the *ex situ* conservation of an endangered and horticulturally valuable plant. S Afr J Bot 72:584-588

Malabadi RB, Mulgund GS, Nataraja K (2004) Efficient regeneration of *Vanda coerulea*, an endangered orchid using thiadiazuron. Plant Cell Tiss. Org Cult 76: 289-293

Matsuoka H, Hinata K (1979) NAA-induced organogenesis and embryogenesis in hypocotyl callus of *Solarium melongena* L. J Exp Bot 30:363-370

Meyer HJ, van Staden J (1998) *In vitro* multiplication of *Ixia fkexuosa*. Hort Sci 23:1070-1071

Moon HK, Kim YW (2008) *In vitro* propagation of a rare and endangered species, *Echinosophora koreensis* Nakai. by axillary bud culture. Kor J Plant Biotechnol 35:229-234

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497

Park NY, Jeong YJ, Lee GD, Kwon JH (2000) Monitoring of maillard reaction characteristics under various roasting conditions of Polygonatum odoratum root. Kor Soc Food Sci Nutr 29(4):647-654

Ryu KC (1995) Optimization of the roasting conditions for high-quality *Polygonatum odoratum* tea. Kyungbuk National University, pp 39

Shibli RA, Ajlouni MM (2000) Somatic embryogenesis in the endermic Black Iris. Plant Cell Tiss Org Cult 61:15-21