

삽주시험관싹증식에 미치는 몇가지 요인들의 영향

리성, 송은희, 박철진

국화과에 속하는 여러해살이약용식물인 삽주는 제약공업에서 중요한 의의를 가지지만 그 원천이 제한되어있는것으로 하여 수요를 충족시키지 못하고있다.

우리는 조직배양방법으로 삽주의 합리적인 번식방법을 확립할 목적에서 싹유도조건을 밝힌데 기초하여 삽주시험관싹증식에 미치는 몇가지 요인들의 영향을 검토하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

재료로는 2018년 4월에 채집한 조선삽주(*Atractylodes koreana*)와 큰삽주(*Atractylodes chinensis*)의 5년생 뿌리줄기로부터 유도한 싹을 리용하였다. 시험관싹증식에 미치는 질소이온농도비($[\text{NH}_4^+]:[\text{NO}_3^-]$)와 린, 칼리움이온농도의 영향검토에서는 MS배지를 기준으로 하여 시험구를 설정하였다.

배양조건은 온도 $(25\pm 2)^\circ\text{C}$, 비침도 1 500~2 000lx, 14~16h/d, 배양기일 40일로 보장하였다.

결과 및 논의

1) 질소이온농도비의 영향

식물에 흡수되는 질소의 이온형태는 NH_4^+ 과 NO_3^- 이 기본이며 두 이온에 대한 요구성은 식물에 따라 각이하다.[1] 따라서 배지의 총질소농도를 MS배지의 총질소농도와 같게 하고 $[\text{NH}_4^+]:[\text{NO}_3^-]$ 를 변화시킬 때 그것이 싹증식에 미치는 영향을 검토하였다.(표 1)

표 1. 시험관싹증식에 미치는 질소이온농도비의 영향

품종	$[\text{NH}_4^+]:[\text{NO}_3^-]$	싹수/개	싹길이/cm	갈변화정도	증식비
조선삽주	1:1	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.1	++++	0.7 ± 0.1
	1:2(대조)	2.2 ± 0.2	3.0 ± 0.2	+++	1.2 ± 0.2
	1:3	2.4 ± 0.3	3.5 ± 0.1	+	2.4 ± 0.2
	1:4	1.5 ± 0.2	3.4 ± 0.2	—	1.5 ± 0.2
큰삽주	1:1	0.8 ± 0.1	2.5 ± 0.1	+++	0.4 ± 0.1
	1:2(대조)	1.7 ± 0.2	3.0 ± 0.2	++	1.2 ± 0.1
	1:3	2.0 ± 0.3	4.2 ± 0.1	—	2.0 ± 0.2
	1:4	1.2 ± 0.2	4.5 ± 0.2	—	1.4 ± 0.2

배지 MS, 성장조절제 6-BA 1mg/L+NAA 0.2mg/L, 온도 $(25\pm 1)^\circ\text{C}$, 비침도 1 500~2 000lx, 14h/d, 재료크기 1.0~1.5cm, 조사개체수 30개

표 1에서 보는바와 같이 $[\text{NH}_4^+]:[\text{NO}_3^-]$ 가 대조(1:2)보다 높은 시험구(1:1)에서 조선삼주와 큰삼주의 시험관싹수는 각각 1.5, 0.8개이지만 배지와 닿은 줄기밑부분의 갈변화는 심하여 싹증식비는 각각 0.7, 0.4로서 낮았다. 농도비가 대조보다 낮은 시험구(1:4)에서 싹길이는 3.4~4.5cm이고 갈변화는 없지만 싹수가 적으므로 증식비는 1.5이하로서 대조와 차이가 없었다.

$[\text{NH}_4^+]:[\text{NO}_3^-]$ 를 1:3으로 한 시험구에서는 갈변화가 적거나 없었는데 증식비는 조선삼주의 경우 2.4, 큰삼주의 경우 2.0으로서 대조보다 높았다.

일반적으로 배지에 첨가된 적당한 량의 NH_4^+ 은 배지의 pH완충성보장, 세포벽형성, 성장조절제활성에 유리하다. 그러나 지나치게 높은 농도의 NH_4^+ 은 식물체내에서 폴리페놀산화효소의 활성을 높여 갈변화를 일으키는 키논류물질들이 많이 형성되게 하며 당질대사를 제한하여 세포벽형성을 억제하고 유리질화된 싹들을 형성시키므로 싹의 형태발생에 부정적인 영향을 준다.

삼주의 시험관싹증식에서 $[\text{NH}_4^+]:[\text{NO}_3^-]$ 가 대조보다 낮은 경우(1:3, 1:4) 싹의 갈변화 현상이 적거나 나타나지 않았으므로 싹증식에 적합한 $[\text{NH}_4^+]:[\text{NO}_3^-]$ 를 1:3으로 하는것이 좋다고 본다.

2) 린의 영향

조직배양에서 린은 주로 오르토린산이온의 형태로 흡수되는데 MS배지의 린산이온농도는 1.25mmol/L이다. 식물에 따라 린산이온요구성이 서로 다르며 특히 고체배양이나 적은 량의 배지에서 많은 량의 조직과 기관들을 배양하는 경우에는 MS배지의 린산이온농도가 몇주내에 거의 령으로 줄어드는 경우도 있다.[1, 2]

그러므로 $[\text{NH}_4^+]:[\text{NO}_3^-]$ 를 1:3으로 하고 시험관싹증식에 미치는 H_2PO_4^- 농도의 영향을 검토하였다.(표 2)

표 2. 시험관싹증식에 미치는 린의 영향

품종	$\text{H}_2\text{PO}_4^- / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	싹수/개	싹길이/cm	잎색	증식비
조선삼주	0.63	2.0±0.1	2.3±0.1	어두운 풀색	1.8±0.1
	1.25(대조)	2.4±0.3	3.5±0.1	풀색	2.4±0.1
	2.5	3.1±0.2	3.2±0.1	풀색	3.1±0.2
	3.75	2.7±0.2	1.7±0.1	연풀색	3.1±0.2
	0.63	1.8±0.1	2.5±0.1	어두운 풀색	1.5±0.1
큰삼주	1.25(대조)	2.0±0.1	4.2±0.2	풀색	2.0±0.1
	2.5	2.6±0.2	4.0±0.2	풀색	2.6±0.1
	3.75	2.1±0.1	2.0±0.1	연풀색	2.1±0.2

배지총질소농도 60mmol/L($[\text{NH}_4^+]:[\text{NO}_3^-]=1:3$), 기타 조건은 표 1과 같음.

표 2에서 보는바와 같이 H_2PO_4^- 의 농도가 대조(1.25mmol/L)보다 낮으면 조선삼주와 큰삼주에서 싹수와 싹길이는 대조보다 작으며 증식비는 각각 1.8, 1.5로서 매우 낮다. 또한 표에는 반영하지 않았지만 농도가 대조보다 낮은 시험구에서는 과물기성으로 하여 유리질화되는 싹들이 나타났는데 이것은 배양물의 질소흡수와 동화과정에 리용되는 ATP의 합성량이 린부족으로 줄어들어 질소흡수와 동화, 당질대사가 낮아지거나 억제된 결과이다.

또한 농도를 대조보다 3배 높이면 싹수는 대조보다 적고 싹의 자라기기간이 짧아져 싹길이는 대조의 절반정도이고 잎색도 연한데 이것은 린이 식물에 많이 요구하는 원소이지만 높은 농도의 $H_2PO_4^-$ 이 칼시움을 비롯한 일부 미량원소(Fe 등)들을 배지속에 침전시켜 그 흡수를 제한하므로 성장이 약화된 결과라고 본다.

그러나 농도를 대조보다 2배 높이면 싹길이와 잎색은 대조와 차이가 없지만 싹수가 증가하여 증식비는 조선삽주에서 3.1, 큰삽주에서 2.6으로서 대조보다 1.3배정도 증가하였다. 그러므로 삽주의 시험관싹증식에서는 $H_2PO_4^-$ 의 농도를 2.5mmol/L로 하는것이 적합하다는 것을 알수 있다.

3) 칼리움의 영향

일반적으로 칼리움은 세포팽압을 유지하고 식물의 당질합성 및 축적과 이동, 단백질 합성 및 축적에 좋은 영향을 주며 린 흡수속도에도 영향을 준다. 이로부터 삽주의 시험관 싹증식에 미치는 K^+ 의 영향을 검토한 결과는 표 3과 같다.

표 3. 시험관싹증식에 미치는 칼리움의 영향

품종	$K^+/(mmol \cdot L^{-1})$	싹수	싹길이/cm	유리질화	증식비
조선삽주	10.0	2.0±0.1	2.3±0.2	+	1.8±0.1
	20.0(대조)	3.1±0.2	3.2±0.1	—	3.1±0.2
	40.0	3.6±0.2	3.2±0.1	—	3.6±0.2
	60.0	2.8±0.2	1.7±0.2	—	2.8±0.2
큰삽주	10.0	1.9±0.1	2.5±0.1	++	1.2±0.1
	20.0(대조)	2.6±0.1	4.0±0.2	+	2.1±0.1
	40.0	2.6±0.1	4.0±0.2	—	2.6±0.1
	60.0	2.0±0.2	2.0±0.1	—	2.1±0.1

배지 총질소농도 60mmol/L ($[NH_4^+]:[NO_3^-]=1:3$), $H_2PO_4^-$ 2.5mmol/L, 기타 조건은 표 1과 같음.

표 3에서 보는바와 같이 조선삽주와 큰삽주에서 K^+ 의 농도를 40.0mmol/L로 하는 경우 싹증식비는 각각 3.6, 2.6으로서 가장 높고 싹의 유리질화현상도 없었다. 큰삽주의 경우 K^+ 의 농도가 20.0mmol/L(대조)와 40.0mmol/L일 때 싹수에서 차이가 없지만 대조의 경우 유리질화된 싹이 생기므로 싹증식비는 2.1로서 낮았다.

K^+ 농도를 대조보다 낮게 한 시험구에서는 유리질화된 싹들이 생기고 60.0mmol/L인 시험구에서는 싹수가 적어지므로 싹증식비는 낮았다.

일반적으로 칼리움의 결핍은 린산염 흡수속도를 낮추어 당질대사를 억제할뿐만아니라 식물체내에 NH_3 과 폴림성유기질소화합물을 축적하고 단백질합성을 억제하여 누른풀색의 변두리가 마르는 잎이 생기게 하며 엽록소가 없거나 물렁물렁한 유리질화된 새로운 싹들이 생기게 하므로[2] 우에서 나타나는 현상도 여기에 기인된다고 생각된다. 높은 농도의 칼리움은 칼시움과 엷서기작용을 하므로 60mmol/L의 K^+ 시험구에서 싹수의 감소에 대하여서는 앞으로 더 연구해볼 필요가 있다.

이상의 결과로부터 삽주시험관싹증식에는 40mmol/L의 K^+ 이 적합하다는것을 알수 있다.

4) 성장조절제의 영향

삽주시험관싹증식에서 성장조절제는 6-BA와 NAA가 비교적 적합하며 농도비는 경우

에 따라 다르다는 선행연구자료[3]에 기초하여 싹증식에 미치는 6-BA와 NAA의 영향을 검토하였다.(표 4)

표 4. 시험관싹증식에 미치는 6-BA와 NAA의 영향

품종	6-BA/(mg·L ⁻¹)	NAA/(mg·L ⁻¹)	싹수/개	싹길이/cm	갈변화	증식비
조선삽주	1.0		3.2±0.1	2.5±0.1	++	1.9±0.1
	1.0	0.2	3.6±0.2	3.2±0.1		3.6±0.2
	1.0	0.5	2.8±0.2	4.0±0.2		3.1±0.1
	2.0		4.3±0.2	2.0±0.1	+++	2.2±0.1
	2.0	0.4	4.2±0.1	4.8±0.2		4.2±0.1
	2.0	1.0	2.5	5.1±0.2		2.5±0.1
큰삽주	0.5		3.4±0.1	2.9±0.1	+	1.9±0.1
	0.5	0.1	3.6±0.2	3.2±0.1		3.6±0.2
	0.5	0.25	3.1	4.0±0.2		3.1±0.1
	1.0		2.5±0.1	3.5±0.1	++	2.2±0.1
	1.0	0.2	2.6±0.1	4.0±0.2		2.6±0.1
	1.0	0.5	2.1±0.1	4.7±0.3		2.1±0.1

배지 총질소농도 60mmol/L([NH₄⁺]:[NO₃⁻]=1:3), H₂PO₄⁻ 2.5mmol/L, K⁺ 40mmol/L, 기타 조건은 표 3과 같음.

표 4에서 보는바와 같이 6-BA만을 리용한 시험구에서 싹들의 기부가 갈변화되는 현상이 나타나고 농도가 높아질수록 갈변화현상이 심하게 나타나 싹증식비도 낮는데 이것은 시토키닌 단독작용에 의한 폴리페놀옥시다제의 활성강화로 키논류물질들이 많이 생기기때문이라고 볼수 있다.

그러나 시험한 농도범위에서 NAA를 혼합하여 쓰는 경우 갈변화현상은 나타나지 않았고 혼합비가 1:5인 경우 즉 조선삽주에서 2.0mg/L 6-BA와 0.4mg/L NAA를, 큰삽주에서 0.5mg/L 6-BA와 0.1mg/L NAA를 혼합할 때 싹증식비가 4.2, 3.6으로서 가장 높았다.

혼합비가 1:2인 경우에는 싹길이는 커지나 싹수는 적고 증식비가 낮았다. 이것은 높은 농도의 아옥신이 식물체의 길이성장, 뿌리유도를 촉진하지만 이른 단계에서의 에틸렌발생을 촉진시켜 싹의 결싹증식을 억제하기때문이라고 본다. 그리고 조선삽주와 큰삽주의 싹증식에 적합한 성장조절제농도의 차이는 종에 따르는 특이성과 관련된다고 본다.

그러므로 조선삽주의 싹증식에는 2.0mg/L 6-BA와 0.4mg/L NAA를, 큰삽주인 경우에는 0.5mg/L 6-BA와 0.1mg/L NAA를 혼합하여 리용하는것이 효과적이라는것을 알수 있다.

맺 는 말

1) 시험관싹증식에 적합한 조건을 밝히고 싹증식비를 조선삽주에서 4.2, 큰삽주에서 3.6으로 높였다.

2) 시험관싹증식에 적합한 [NH₄⁺]:[NO₃⁻]는 1:3이고 H₂PO₄⁻ 농도는 2.5mmol/L, K⁺농도는 40mmol/L이다.

3) 시험관싹증식에 적합한 성장조절제의 농도는 조선삽주에서 6-BA 2.0mg/L, NAA

0.4mg/L, 큰삽주에서 6-BA 0.5mg/L, NAA 0.1mg/L이다.

참 고 문 헌

- [1] C. P. Witte et al.; Plant Cell Tissue Organ Culture, 68, 103, 2002.
- [2] F. Chen et al.; Plant Cell Tissue Organ Culture, 130, 73, 2017.
- [3] 李慧; 药源植物, 27, 7, 2002.

주체109(2020)년 7월 5일 원고접수

Influence of Some Factors on Multiplication of *in vitro* Shoot of *Atractylodes*

Ri Song, Song Un Hui and Pak Chol Jin

We found the suitable conditions for multiplication of *in vitro* shoot of *Atractylodes koreana* and *A. chinensis* and raised multiplication ratio to 4.2 in *Atractylodes koreana*, to 3.6 in *A. chinensis*.

The suitable $[\text{NH}_4^+]$ to $[\text{NO}_3^-]$ concentration ratio for multiplication of *in vitro* shoot is 1 to 3 and concentration of H_2PO_4^- is 2.5mmol/L and concentration of K^+ is 40mmol/L.

The proper concentration of growth regulators for multiplication of *in vitro* shoot is 6-BA 2.0mg/L and NAA 0.4mg/L in *Atractylodes koreana* and is 6-BA 0.5mg/L and NAA 0.1mg/L in *A. chinensis*.

Keywords: *Atractylodes koreana*, *A. chinensis*, *in vitro* shoot multiplication