

Thidiazuron이 半夏의 子球 및 식물체 재생에 미치는 영향

김재광·조혜경·유창연·안상득·임학태

Effect of Thidiazuron on the Formation of Micro-tubers and Plantlet Regeneration of *Pinellia ternata* T.

Jae-Kwang Kim, Hye-Kyoung Cho, Chang-Yeon Yu, Sang-Deuk Ahn and Hak-Tae Lim

ABSTRACT : This experiments were conducted to determine the effect of thidiazuron on forming tuberlets and plant regeneration of *Pinellia ternata* T. by tissue culture. The addition of 5 μ M TDZ to the medium had better regeneration than that of any other treatments of NAA and TDZ. At the combination treatments of NAA and TDZ, as the level of thidiazuron increased, the rate of shoot regeneration was increased while the increment of NAA concentration inhibited the rate of shoot regeneration. The supplement of 5 μ M thidiazuron produced the best number of micro-tubers per explant and the number of micro-tuber formed was 25 in MS medium and 29 in MG medium on 30 day culture, respectively. Microtuber formation was the best on MG medium with 1.0 mg/l NAA and 5 μ M thidiazuron. MG medium was superior to MS and B5 medium for the growth of tuberlets. Half strength of MS medium with NAA 2 mg/l was the most effective for root formation. Rooting ability on nursery soil of plantlets produced in *in vitro* was good as a 80% after 3 weeks.

緒 言

반하 (*Pinellia ternata* T. et B.)는 천남성과에 속하는 다년생 초본식물로 약재로 지하부의 괴경을 반하라고하며 이용한다. 반하는 다소 편압된 구형 또는 고르지 않은 모양을 하며 유효성분으로 ephedrine, coline, homogentisic acid 등을 함유하여 진구, 진토의 효과가 있어 임신구토, 신경성구토, 거담, 배멀미 등에 약효가 있고 수독의 구제에도 사용되며^{5,6,7)}, 한방약으로는 반하사심탕, 반하백술천마탕, 소시호탕 등에 이용된다.

반하의 번식은 엽병에서 형성되는 육아와 지하부에서 생기는 자구로 하기 때문에 하나의 식물체에서 형성되는 신자구수가 1~개로 비교적 적어 재배는 용이하나 재배단지조성까지 많은 시간을 소요하기 때문에 재배농가가 전무한 상태이다. 반하의 경우 다른 약용작물에 비해 고가를 유지하고있는 상태로 대량증식방법이 확립되면 농가의 소득 증진은 물론, 이와 유사한 다른 약용작물의 번식 및 대량증식에도 응용할 수 있다.

그러므로 본 연구는 반하의 조직배양을 통한 대량증식방법체계 확립의 한 방법으로 기내배양에서의 소괴경형성 및 식물체분화에 영향을 미치는 배

지, NAA와 Thidiazuron의 최적조건을 구명하고자 실시하였다.

材料 및 方法

1. 生長調節物質 및 培地組成에 따른 植物體分化 및 小塊莖形成

온실에서 재배한 1년생 반하의 상부엽을 재료로 사용하였으며 재료를 채취후 증류수로 2회 세척한 후에 70% 에탄올에 15초정도 담가두었다. 멸균수로 3회 세척하였으며 무균상에서 NaOCl 5%용액에 1분30초동안 소독하였다. 소독한 재료는 다시 멸균수에 3회 세척한 후 5mm×5mm 크기로 절단하여 각실험에 사용되는 배지에 5반복으로 치상한다.

배지는 Murshige & Skoog 배지를 기본으로 하여 3%의 sucrose를 첨가하여 완전히 용해시킨 후 Auxin류의 NAA(α -Naphthaleneacetic acid) 0.1, 1, 2 mg/l, Cytokinin류의 TDZ(Thidiazuron) 0.1, 1, 5 μ M의 농도로 단독처리하고 각각의 성장조절제를 0.1, 2(mg/l 또는 μ M)의 농도로 조합처리하였다. 성장조절물질 첨가후 pH를 5.7로 조절하였으며 고체배지형성을 위하여 agar를 0.8% 첨가하였다. 각 배지는 10ml씩 시험관에 분주하였으며 이를 120℃, 1.5기압에서 15분간 고압멸균하고 사면배지로 응고시켜 사용하였다. 준비된 식물체를 치상하여 25℃, 24시간 광조건하에서 배양하였다. 배양후 30일, 60일 간격으로 각기 생성된 줄기수와 길이, 뿌리수와 길이, 소과경수 등을 조사하였다. 배지는 MS, B5, MG(MS salt+Gamborg Vitamin) 배지를 기본으로 하고 auxin류의 NAA(α -Naphthaleneacetic acid) 0.1, 1, 2 mg/l, cytokinin류의 TDZ(Thidiazuron) 0.1, 1, 5 μ M의 농도로 단독 또는 조합처리하였다.

2. 分化된 植物體의 土壤純化

분화된 식물체의 뿌리유도를 위하여 IAA와 NAA가 각 0.1, 2 mg/l씩 첨가된 1/2MS, MS기 본배지에 치상하여 60일 후 뿌리수를 조사하였다. 토양순화정도를 조사하기 위하여 버미콜라이트를 채운 파종상에 뿌리가 유기된 식물체를 이식하여 25℃에서 충분한 습도가 유지되도록 polyethylene

vinyl로 덮개를 씌워 2주간 온실에서 재배한 후 생존율을 조사하였다.

結果 및 考察

1. 生長調節物質의 種類 및 濃도에 따른 植物體 分化

반하의 엽 조직을 NAA와 TDZ가 첨가된 Murashige & Skoog배지에 30일간 배양한 결과 15일정도 경과한 후부터 절편부위에서 켈러스가 형성되기 시작하였으며 30일 경과후에는 multiple shoot가 다량 형성되었고 줄기와 뿌리가 분화되었으며 활발한 생육을 보였다. NAA와 thidiazuron을 단독처리한 결과 thidiazuron 5.0 μ M 처리에서 shoot가 가장 많이 형성되었으며 고농도인 10.0 μ M처리에서는 다시 줄어들었으나 전반적으로 NAA보다 월등한 효과를 보였다. Shoot 길이 역시 thidiazuron처리에서 2배이상 성장하였으며 저농도 처리가 줄기신장에는 효과적이었다(Table 1).

Table 1. Effect of NAA and thidiazuron(TDZ) on the regeneration and growth of shoots and roots from leaf tissue of *Pinellia ternata*.

Growth regulator	cultured for 30day		cultured for 60day		
	No. of shoot	Shoot length (cm)	No. of shoot	Root length (cm)	
NAA (mg/l)	0.1	3.0	0.7	7.7	2.4
	1.0	6.3	0.4	13.8	2.5
	2.0	3.5	0.5	16.2	1.5
TDZ (μ M)	0.1	10.0	1.5	1.7	2.5
	1.0	26.0	0.7	1.5	1.5
	5.0	45.0	0.5	0.0	0.0
	10.0	26.0	0.5	0.0	0.0
LSD	5%	4.2	0.5	4.0	1.2

60일간 배양 후, 뿌리의 분화는 NAA 처리에서 더 높았으며 thidiazuron 고농도 처리시에는 뿌리 분화가 전혀 이루어지지 않았다. 이러한 결과는 많은 식물종의 조직배양에서도 Auxin류의 농도를 낮추면 배지에 첨가하지 않거나 cytokinin류의 생

장조절제를 첨가하여 농도를 높여줌으로서 줄기분화를 촉진하였다는 결과와 일치하였다^{15, 16)}.

Table 2. Effect of NAA and thidiazuron (TDZ) on the regeneration and growth of shoots from leaf tissue of *Pinellia ternata*.

Growth regulator		cultured for 30day		cultured for 60day	
NAA (mg/l)	TDZ (μM)	No. of shoot	Shoot length (cm)	No. of shoot	Root length (cm)
0.1	0.1	33.0	0.5	50.9	1.6
	2.0	39.3	0.9	89.0	0.9
2.0	0.1	24.8	0.7	40.6	1.1
	2.0	18.6	0.3	44.9	0.5
LSD	5%	5.0	0.2	4.3	0.3

NAA와 thidiazuron을 조합처리하여 30일간 배양한 결과 NAA 0.1 mg/l 와 TDZ 2.0μM이 처리된 배지에서 shoot 분화가 잘 되었으며 shoot신장 역시 가장 양호하였다. 전반적으로 저농도의 NAA와 고농도의 TDZ이 처리되었을 때 shoot 분화 및 신장이 양호하였으며 TDZ과 조합처리된 NAA의 농도가 증가할 수록 shoot 분화 및 생장이 저조하였다. 배양 60일 후에 조사한 결과, 30일 배양시와 같이 NAA 0.1 mg/l 와 TDZ 2.0μM이 처리된 배지에서 shoot분화가 가장 잘 되었으나 shoot신장은 NAA 0.1 mg/l 와 TDZ 0.1μM이 처리된 배지에서 가장 양호하였다. 형성된 shoot 수는 NAA 0.1 mg/l 에서 TDZ 농도처리에 따라 현저한 차이를 보여 저농도인 NAA 0.1 mg/l 와 TDZ 2.0μM이 조합처리되었을 때 explant당 89개의 줄기가 분화되어 가장 좋은 결과를 보였으며 반면에 고농도인 NAA 2.0 mg/l 와 TDZ 0.1, 2.0 μM의 조합처리시 줄기분화를 50%정도 억제하여 explant당 40개 정도의 줄기가 분화되었다(Table 2). 이러한 결과는 이 등⁸⁾, 최 등^{3, 4)}의 보고에서 2, 4-D 2.0 mg/l 와 kinetin 0.2 mg/l 농도에서 callus유기와 shoot 분화가 가장 양호하였던 것과는 차이가 있었으며, 박 등¹¹⁾의 보고에서 kinetin과 BA가 각각 4 mg/l 이상 처리된 배지에서 재분화능력이 저하되었다는 것과 일치하였다.

2. 生長調節物質 및 培地組成에 따른 小塊莖 形成

반하 잎조직을 채취, 소독 후 절단하여 MS배지에서 배양 후 30일, 60일후에 반하의 소괴경형성을 조사한 결과 각 생장조절물질을 단독처리한 경우 NAA처리보다 TDZ처리에서 10배이상의 소괴경을 형성하였다.

Table 3. Effect of growth regulators on micro-tuber formation from leaf segment culture of *Pinellia ternata* on MS medium.

Growth regulator	No. of micro-tubers		
	cultured for 30day	cultured for 60day	
NAA (mg/l)	0.1	2.0	9.7
	1.0	0.0	1.7
	2.0	0.0	0.0
TDZ (μM)	0.1	12.0	36.0
	1.0	22.0	79.0
	5.0	25.0	88.0
	10.0	20.0	54.0
LSD	5%	4.2	5.0

NAA처리에서는 거의 소괴경이 형성되지 않았으며 0.1 mg/l 처리에서 30일 배양후 explant당 2.0개, 60일 후 9.7개의 소괴경이 형성되었으며 TDZ처리시에는 모든 농도에서 많은 소괴경이 형성되었으며 5 μM 처리에서 가장 많은수의 소괴경을 형성되어 30일 조사에서 explant당 25개, 60일 조사에서 88개의 소괴경을 얻을 수 있었다. 기내 소괴경 형성실험에서도 식물체분화에서와 같이 TDZ의 농도가 10 μM로 고농도일때는 5 μM의 경우보다 형성된 소괴경수가 줄어드는 경향을 보였다(Table 3).

NAA와 TDZ의 조합처리(Table 4)에서도 식물체 분화결과와 비슷한 양상을 보여 NAA 0.1 mg/l 와 TDZ 2.0 μM이 처리된 배지에서 가장 많은 수의 소괴경 형성을 보였다. 식물체분화에서보다 각 농도간의 차이가 확실하여 소괴경형성 maximum과 minimum의 차이가 3배정도로 나타났으며 나머지

조합처리와도 2배이상의 형성차이를 보였고 60일째 조사한 결과는 최 등^{3,4)}이 2,4-D와 kinetin을 사용할 결과보다 더 많은 량의 자구를 얻을 수 있었으며 이는 같은 cytokinin계통인 kinetin보다도 TDZ가 반하의 자구형성에 더 효과적인 것으로 사료된다. TDZ가 기존의 cytokinin 및 Zip보다 더 효과적이었고 *P. lunatus*의 callus형성시 Zeatin보다 효과가 현저하였으며²⁾, 사과 기내배양시 shoot증식에 BA보다 더 효과적이었다¹⁰⁾.

Table 4. Effect of growth regulators on micro-tuber formation from leaf segment culture of *P. ternata* on MS medium.

Growth regulator		No. of micro-tubers	
NAA (mg/l)	TDZ (μM)	cultured for 30day	cultured for 60day
0.1	0.1	17.1	39.8
	2.0	22.5	90.1
2.0	0.1	12.1	30.5
	2.0	9.5	28.8
LSD	5%	4.2	5.0

MS배지 salt에 Gamborg vitamin을 첨가한 MG 배지에서의 소피경형성은 MS배지와 다른 양상을 보였다. TDZ 5.0μM의 단독처리에서 생체중 0.

Table 5. Effect of growth regulators on the formation of micro-tubers from leaf segments cultures of *P. ternata* on different medium after 30 days.

Growth regulator		Fresh weight (g)		No. of micro tubers	
		MG	B5	MG	B5
NAA (mg/l)	0.1	0.39	0.17	0.0	7.0
	1.0	0.45	0.11	15.5	0.0
	2.0	0.25	0.13	0.0	0.0
TDZ (μM)	0.1	0.40	0.25	10.0	15.5
	1.0	0.58	0.26	2.0	22.4
	5.0	0.93	0.10	29.5	7.0
LSD	5%	11.8	0.06	10.7	8.8

93g, 소피경수 29.5로 최대치를 보여 비교적 고농도의 TDZ에서 소피경 형성이 양호하게 나타났다. NAA 1.0 mg/l 에서 소피경형성을 관찰할 수 있었으나 최대치의 1/2수준이었다.

B5배지에서의 소피경율은 전반적으로 저조한 편이었다. NAA가 처리된 구간에서는 거의 소피경이 형성되지 않았으며 TDZ 1.0 μM 처리배지에서 가장 양호한 소피경 형성을 보였다. 그러나 각 처리간의 생체중에는 큰 차이가 보이지 않았으며 형성된 소피경수에서도 확연한 차이를 보이지 않았다(Table 5).

Table 6. Effect of growth regulators on the formation of micro-tubers from leaf segments cultures of *P. ternata* on different medium after 30 days.

Growth regulator		Fresh weight (g)		No. of micro tubers	
NAA (mg/l)	TDZ (μM)	MG	B5	MG	B5
0.1	0.1	0.13	0.32	0.0	23.0
	1.0	0.38	0.43	0.0	22.0
	5.0	1.49	0.70	57.8	41.0
1.0	0.1	0.68	0.47	28.8	20.0
	1.0	1.34	0.32	55.0	16.5
	5.0	1.87	0.58	81.4	25.6
2.0	0.1	0.30	0.27	5.8	5.8
	1.0	0.45	0.27	22.2	5.0
	5.0	0.63	0.58	17.2	8.8
LSD	5%	0.40	0.14	18.6	8.8

MG배지에서의 NAA와 TDZ 조합처리 (Table 6)에서는 단독처리에서 관찰되었던 것과 같이 TDZ의 경우 5 μM이 첨가된 배지에서의 소피경형성이 양호하였는데 NAA 1.0 mg/l 와 조합된 처리에서 가장 높은 소피경형성을 보였다. NAA 0.1 mg/l 와 TDZ 0.1 μM 이 조합처리된 경우 전혀 소피경이 형성되지 않았으며 생체중도 가장 낮았다. 또한 NAA가 2 mg/l 로 고농도 처리된 배지에서는 전반적으로 소피경의 형성률이 낮은것이 관찰되었다.

B5배지에서의 NAA와 TDZ의 조합처리시에는 생체중에서 NAA 0.1 mg/l 와 TDZ 5.0 μM이 처리된 배지에서 생체중이 현저히 높았으며 형성된

소과경수도 가장 많았다. 이외 다른 농도로 조합된 처리에서는 전반적으로 저조한 결과를 보였으며 NAA 2.0 mg/l 와 TDZ이 조합처리된 배지에서는 이보다 낮은 농도의 NAA와 조합처리된 배지보다 현저하게 소과경형성이 저조하였다.

배지조성에 따른 기내소과경 형성에 대하여 박 등¹⁴⁾은 기내에서 60일동안 배양하였을 때 MS배지가 B5, LS배지에 비하여 소과경형성에 효과적이라고 보고하였는데 본 연구에서는 기내에서 30일 동안 배양하였을 때 MG배지가 MS나 B5 배지보다 소과경 형성이 전반적으로 양호하게 나타났다. Yu et al.¹⁶⁾은 장기간 캘러스 상태로 계대배양된 *Solanum*과 *Lycopersicon*종의 분화시 MG배지가 MS배지보다 thiamine 함량이 100배 더 높았으며, 높은 thiamine을 MS배지에 첨가시 식물체 분화를 촉진한다고 보고하였다. MG나 B5 배지에서는 MS배지보다 식물생장조절제에 대해 반응이 민감하여 최고치와 최저치간의 차이가 컸으며 생체중에 있어서도 B5보다 MG배지에서 더 양호하였다.

3. 분화된 식물체의 토양 활착

분화된 식물체의 뿌리분화에는 IAA보다는 NAA가 더 효과적이었으며 MS배지보다는 Salt strength를 1/2로 줄인 1/2MS배지가 효과적이었다. MS배지에서는 IAA 2 mg/l 가 첨가되었을 때

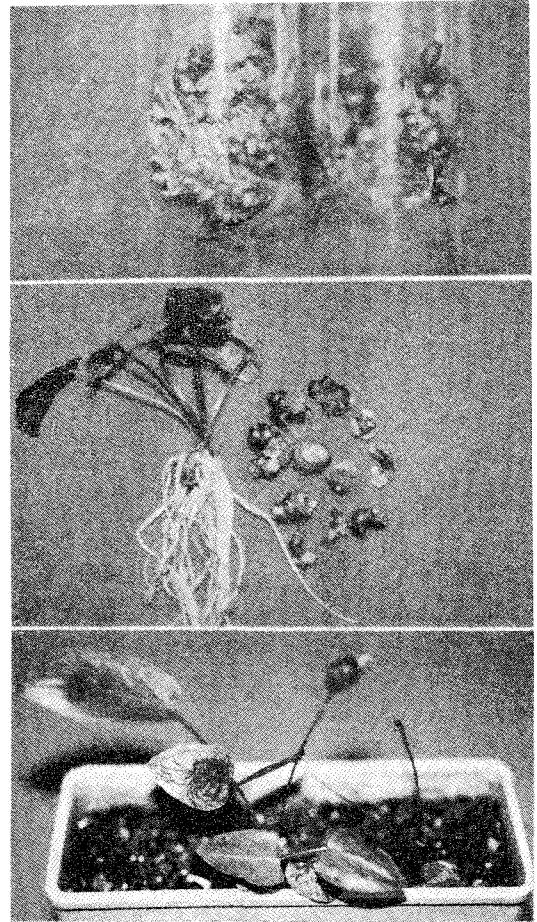


Fig. 1. A and B. Microtuber formation and plantlet regeneration from leaf culture. C. Plants acclimated and transferred into soil.

Table 7. Effect of growth regulators on the induction of shoots from leaf tissue culture in *P. ternata*

Growth regulators (mg/l)		No. of Roots
MS	IAA 0.1	3.0
	2.0	8.5
	NAA 0.1	7.9
	2.0	16.2
1/2 MS	IAA 0.1	5.0
	2.0	10.2
	NAA 0.1	12.4
	2.0	23.3

8.5개의 뿌리가 유도되었으며 NAA 2 mg/l 가 첨가되었을 때에는 16.2개의 뿌리가 유도되었다. 이러한 결과는 Yu et al.이 스테비아¹⁷⁾, 알로에¹⁸⁾ 신초 뿌리유도 시 낮은농도의 Salt strength가 더 효과적이라는 결과와 일치하였다. 따라서 뿌리유도에는 Salt strength를 줄이고 NAA를 사용하는 것이 효과적이었다. 완전히 분화된 식물체를 vermiculite가 담긴 포트에 이식하여 3주간의 polyethylene vinyl을 덮어서 순화시키면서 점차적으로 덮개를 벗긴 후 온실에서 재배한 결과 80%정도의 생존율을 보였으며 성공적으로 기내배양한 식물체를 온실에서 재배할 수 있었다.

摘 要

반하의 조직배양을 통한 대량증식방법 확립의 일환으로 실시한 기내배양에서의 소과경형성 및 식물체분화에 영향을 미치는 배지 NAA와 Thidiazuron의 최적조건을 구명하고자 실시한 실험의 결과는 다음과 같다.

1. 식물생장조절물질로 NAA와 TDZ를 단독처리할 때 TDZ 0.5 μM 에서 shoot수가 45개로 가장 양호하였으며 root분화는 NAA 2.0 mg/l에서 가장 양호하였다.

2. NAA 0.1 mg/l + TDZ 2.0 μM 조합처리에서 shoot분화가 가장 양호하였으며 NAA 2.0 mg/l + TDZ 2.0 μM 처리시에 가장 저조하였다.

3. 반하의 소과경 형성은 MS배지에서는 TDZ 5.0 μM 단독처리와 NAA 0.1 mg/l + TDZ 2.0 μM 처리에서 소과경 형성이 가장 양호하였다. B5배지에서는 TDZ 1.0 μM 단독처리와 NAA 1.0 mg/l + TDZ 5.0 μM 처리에서 소과경 형성이 가장 양호하였으나 생체중은 NAA 0.1 mg/l와 TDZ 5.0 μM 의 단독처리에서 생체중이 가장 무거웠다.

4. MS, MG, B5배지조성에 따른 소과경형성은 MG배지에서 30일배양후 가장 양호하였으며 생체중도 좋았다.

5. 분화된 식물체 뿌리분화에는 IAA보다 NAA가, MS보다 1/2MS가 더 효과적인 결과를 보여 1/2MS배지에 NAA 2 mg/l를 처리하였을 때 23.3개의 뿌리가 유도되어 가장 높은 결과를 보였다. 완전분화된 식물체를 vermiculite가 담긴 포트에 이식하여 온실에서 순화시킨 결과 80%정도의 생존율을 보였다.

引用文獻

1. Burkhardt, L., and J. M. Meyer. 1990. Shoot proliferation of *Cercis canadensis* L. *in vitro* using thidiazuron and benzyladenine. HortScience Abst. 25 : 88.
2. Capelle, S. C., D. W. S. Mork, S. C. Kirchner, and M. C. Mok. 1983. Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the

metabolism of N⁻⁶-C²-isophenyl [8-¹⁴C] adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L.. Plant Physiol. 73 : 796 - 802.

3. 최정식, 나의식. 1986. 조직배양에 의한 반하의 대량번식에 관한 연구. 한국작물학회지 31 : 30 - 42.
4. 최정식, 나의식. 1986. 반하의 조직배양에 관한 연구. 전북대학교 농대논문집 17 : 13 - 18.
5. 한용득. 1980. 약초재배와 이용법. 영운사. 87 - 89 p.
6. 일월서각편집부편저. 1991. 약초의 성분과 이용. 일월서각. 660 - 661 p.
7. 김석원. 1984. 약초재배기술. 내외사. 194 - 195 p.
8. 이승엽, 김태수, 김현순, 임무상, 이만상. 1988. 반하 (*Pinellia ternata*의 자연 및 기내증식에 관한 발생학적 및 조직학적 연구. 농사논문집 (생명공학편) 30(1) : 80 - 88.
9. Mok, M. C., D. W. S. Mok, J. E. Turner, and C. V. Mujer. 1987. Biological and biochemical effects of cytokinin-activated phenylurea derivatives in tissue culture systems. Hortscience 22 : 1194 - 1197.
10. Niewwkerk, J. P., R. H. Zimmerman, and I. Fordham. 1986. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. Hortscience. 21 : 516 - 518.
11. 박문수, 장영선, 김태수, 박호기, 김선, 김영진. 1995. 반하의 기내과경 직접대량생산과 식물공장화 재배연구. 국가선도기술개발과제 "약용식물공장시스템확립" 연구논문집. 1 - 24 p.
12. 성낙선, 조필형, 박경희, 소용영, 조덕이. 1988. 반하의 조직배양에 의한 속성증식. 한국식물조직배양학회지. 15 : 75 - 80.
13. Wang, S. Y., H. J. Jiao, and M. Faust. 1991. Changes in the activities of catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase in apple buds during bud break by thidiazuron. J. Plant Growth Regul. 10 : 33 - 39.
14. Yip, W. K., and S. F. Yang. 1986. Effect of

- thidiazuron, a cytokinin-active urea derivative, in cytokinin depend ethylene production system. *Plant Physiol.* 80 : 515 - 519.
15. Yu, C. Y., Y. A. Chae, S. D. Ahn, and D. H. Cho. 1994. Effect of thidiazuron on regeneration from long-term cultured callus of *Solanum* spp., *K. J. Med. Crop science* 2(1) : 38 - 43.
 16. Yu, C. Y., B. H. Chang, and D. H. Cho. 1994. Effect of inorganic salts, growth regulators, and thiamine on the callus growth and plant regeneration from long-term cultured *Solanum* and *Lycopersicon* genotypes. *K. J. Plant Tissue Culture* 21(2) : 69 - 76.
 17. Yu, C. Y. and Y. A. Chae. 184. In vitro propagation of *Stevia rebaudiana* B., *K. J. Crop Science* 29(1) : 101 - 107.
 18. 유창연, 전인수, 안상득, 조동하, 정일민. 1994. 조직배양에 의한 알로에 식물체의 대량 번식. *동양자원식물학회지* 7(1) : 17 - 22.