

과 제 구 분	Code : LS0205	수행시기	전후반기	연구기간	1998 ~ 1999(완결)
연구과제명	민통선지역 삼지구엽초 소득화 기술개발 연구			과제책임자	강안석
세부과제명	삼지구엽초 번식방법 구명시험				
색 인 용 어	삼지구엽초, 출아율, 파종상토, 조직배양, 신초재분화, 발근배지				
연구원별임무					
구 분	소 속	성 명	전화번호	담 당 임 무	
세부과제책임자	북부농업시험연구팀	최강준	(0353)458-4783	시험총괄수행	
공동연구자	"	김영진	"	삼지구엽초 실생번식 개발	

ABSTRACT

The objective of this study was to develop techniques of seedling propagation and tissue culture of *Epimedium koreanum* Nakai. Seed germination was essentially needed after-ripening duration after harvesting for 250days and more by stratification. At 20°C seed emergencing days and length of root were 8 and 0.46cm respectively. But under low temperature, 5°C were stored, seeds did not emerge at any conditions. A suitable nursery media for seedling of *E. koreanum* was a commercial media that included high holding-humidity and porosity. In vitro, in case of leaf segment culture, the callus and shoot formation increased on $\frac{1}{2}$ MS medium. Treatment of 2,4-D alone was excellent for the formation and growth of callus. Treatment of 2,4-D and BA was good for the formation adventitious root. NAA 5mg/l and TDZ 0.005mg/l was the most effective treatment for the shoot regeneration ratio 88.9%.

연구배경

삼지구엽초는 매자나무과에 속하는 다년생 초본이며 높이 30cm 안팎으로 한 포기에서 여러 줄기가 나와 자라며 근경은 옆으로 뻗고 앞이 3개씩 2회 갈라져 9개가 되어 삼지구엽초라 부른다.(고, 1993; 김, 1996) 소엽의 모양은 난형이며 밑부분은 심장형이고 끝이 뾰족하여 가장자리에 잔톱니가 있다. 삼지구엽초의 꽃은 황백색으로 원줄기 끝에 총상화서로 밀을 향해 4~5월에 피는데 꽃잎은 4개로 긴 거(距)가 있어 닳모양의 형태로 독특한 관상가치를 가지고 있다.

예로부터 삼지구엽초는 전초를 말린 것을 음양곽(淫洋藿)이라 하여 한방에서 강장, 강정, 거풍, 이뇨, 음위 등의 약재로 이용하여 왔다(안과이, 1996 ; 김등, 1998). 삼지구엽

초의 주성분은 Icarin으로서(신 등, 1996) 최근 국민소득의 향상과 더불어 건강에 대한 관심도가 고조되어 각종 건강보조식품이 개발되면서 그 수요량이 증가하고 있으나 무분별한 채취로 인해 자생지가 남획되고 있는 실정으로 자원보존과 수요충족을 위해 작물화를 위한 번식 및 재배법 개발이 절실히 요구되고 있는 자원식물이다.

번식은 종자에 의한 실생번식과 근경을 통한 영양번식을 통해 이루어지고 있는데 번식 효율이 낮아, 보다 효율적인 번식법 개발이 요구되고 있다. 조직배양에 대한 연구는 같은 삼지구엽초속인 *Epimedium diphyllum*에 대한 callus 배양이 보고되어(Yamamoto 등, 1992) 있을뿐 *Epimedium koreanum*에 대한 체계적인 조직배양기술이 개발되어 있지 않다.

따라서 본 연구는 삼지구엽초의 효율적인 실생번식 방법과 조직배양 기술개발을 통한 대량번식 체계를 개발하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 삼지구엽초 실생번식 기술개발

본 실험은 강원도농업기술원 북부농업시험장(철원 소재)에서 1997년에서 1998년까지 강원도내 자생지에서 수집한 삼지구엽초 성묘에서 개화, 결실한 종자를 채종하여 실시하였다. 종자출아율 향상시험은 채종한 종자를 1997년 6월 21일 모래와 함께 섞어 노천매장하였는데 그 기간은 250일간이었으며 5℃ 생육챔버를 사용한 경우는 4월 17일까지 300일간 저장하였다. 저장간 50일 간격으로 종자를 꺼내어 Leica사의 입체현미경으로 종자의 절단면을 조사하여 배의 성숙단계를 관찰하였고 출아온도 처리로는 항온기를 이용 10, 15, 20, 25℃ 조건으로 조절하여 각각 100립씩 육묘상토에 파종하여 출아적온을 조사하였다. 실생묘생산을 위한 상토구멍시험은 채종한 종자를 모래와 섞어 1998년 6월 4일부터 1999년 3월 11일까지 280일간 노천매장 한 후 발효, 발효1+팽화왕겨1, 발효1+펄라이트1, 시판육묘상토에 각각 100립씩 파종하여 노지에서 출아 및 출아후 생육상황을 조사하였다. 출아기는 총파종립수의 40%가 지표면 위로 싹이 올라온 날을 기준하였고 초장, 엽장, 신근장 등은 파종 2개월후를 기준으로 조사하였다.

2. 삼지구엽초 조직배양 기술개발

가. 배지내 성장조정제 종류 및 농도가 재분화에 미치는 영향

공시재료는 강원도 철원지역에서 수집한 삼지구엽초(*Epimedium koreanum*)를 사용하였고, 치상재료로는 3월 중순에서 4월 중순까지 채취한 어린 줄기와 엽조직을 0.5cm 크기로 절단하여 사용했으며, 소독은 70% 에탄올에 10초간 침지한 다음 1% NaOCl에서 5분동안 표면살균 한 후 멸균수로 3회이상 수세하였다. 배지는 MS배지를 기본으로 하고 sucrose 30g/l를 첨가한 다음 pH 5.8로 하고 0.8%의 한천을 넣은 배지상에서 배양하였다. 성장조정제는 옥신류로는 IBA, NAA, 2,4-D를 사이토키닌류로는 kinetin, BA, TDZ를

사용하였고, 농도는 각각 0, 0.1, 1, 10mg/l로 혼용 및 단용처리하여 총 200처리를 하여 성장조정제의 종류 및 농도가 재분화에 미치는 영향을 조사하였다. 배양조건은 25℃의 온도에 14hr/day 일장조건에서 배양하였고, 조직분화는 실제현미경하에서 관찰하여 조사하였다.

나. 배양재료 및 배지조성이 신초재분화에 미치는 영향

배양재료인 줄기와 엽은 위와 동일한 처리를 하여 배양하였으며 배는 6월 중순에 채취한 종자에서 아직 미숙한 상태의 것만 적출하였고, 근경은 7월 하순에 새로 신장한 것을 사용하였다. 종자와 근경의 표면살균은 70% 에탄올에서 30초, 2% NaOCl에서 20분간 침지하여 살균하였고, 3회 이상 멸균수로 수세하여 사용하였다. 배양조건은 위 실험과 동일하게 하였고, 1/2MS 배지는 대량요소만 1/2농도로 낮추어 조제하였다. 성장조정제 종류로는 NAA, BA, TDZ를 사용하였고 농도는 각각 0.5~20mg/l, 0.1~10mg/l, 0.005~0.05mg/l 범위에서 혼용처리하였다.

다. 성장조정제 처리가 재분화 신초에 대한 미치는 영향

배양재료는 엽에서부터 신초로 재분화된 조직을 계대배양하여 대량 증식하여 사용하였고, 사용된 배지는 1/2MS를 기본으로 하고 성장조정제는 NAA, 2,4-D, TDZ를 각각 혼용하여 처리하였다. 배양조건은 위 실험과 동일한 조건에서 실험하였다.

결과 및 고찰

1. 삼지구엽초 실생번식 기술개발

삼지구엽초는 꽃이 낙화하면서 삭과가 달리는데 1삭과당 3~12개의 종자가 달린다. 삭과의 길이는 15~20mm, 지름 5~6mm이며 종자는 길이가 4~5mm, 지름 2~3mm으로 40일 이상 성숙되나 채종시에는 미숙배로서 후숙을 요한다. 박(1994)은 가시오갈피 종자에서 개갑을 위해 120일의 후숙이 필요하다고 하였으며, 정등(1993)은 작약종자의 후숙처리가 출현율이 높다고 보고하였다. 또한 김등(1996)은 고추냉이 종자에서 모래습윤 저장 후 파종할 때 출현율이 양호하다고 보고하였고 최와박(1998)은 시호 입모향상을 위해 파종전 노천매장 처리할 경우 발아율이 향상된다고 하였는데 이는 매장기간동안 강수 및 토양수분의 이동으로 발아억제물질이 제거되고 배가 후숙되기 때문으로 추정하였는데 삼지구엽초 종자도 채종 당시 미숙배이므로 노천매장으로써 후숙효과가 나타났다. 김등(1995 ; 1996)은 삼지구엽초 종자를 후숙처리하지 않아 모든 처리구에서 종자가 발아되지 않았다고 보고하였다. 삼지구엽초 종자는 노천매장 100일경에 배가 육안으로 형성된 것을 관찰할 수 있으며 250일 이상 노천매장시에 배가 완전 성숙된 것을 볼 수 있었고 (그림 1) 일부 종자는 유근이 나와 발아되었다. 노천매장 250일후 항온기에서 온도별로

출아조건을 살펴보았을 때 20℃ 조건에서 평균출아일수가 8일이었으며 신근장이 0.46cm로 생육이 양호하게 나타났다.(표 1) 이는 권등(1993)의 공취의 발아적온 보고와 일치하였으나 노천매장을 하지 않고 5℃로 항온저장 한 후 후기에 온도조건별로 처리한 것은 모두 출아하지 않아 서등(1998)이 자생 참나물을 5℃ 저온저장하여 발아율이 향상되었다는 보고와는 일치하지 않았다. 상토종류별로 출아 및 생육상황을 살펴봤을 때 시판육묘상토가 출아율이 높고 생육이 양호하여(표 2) 박등(1998)이 삼지구엽초 자생지환경이 우리나라 발토양의 평균치보다 공극율이 4.5~24.1% 높다는 보고와 일치하며 이는 종자발아 후 생육은 토양의 물리성과 많은 관계가 있는 것으로 나타났다.

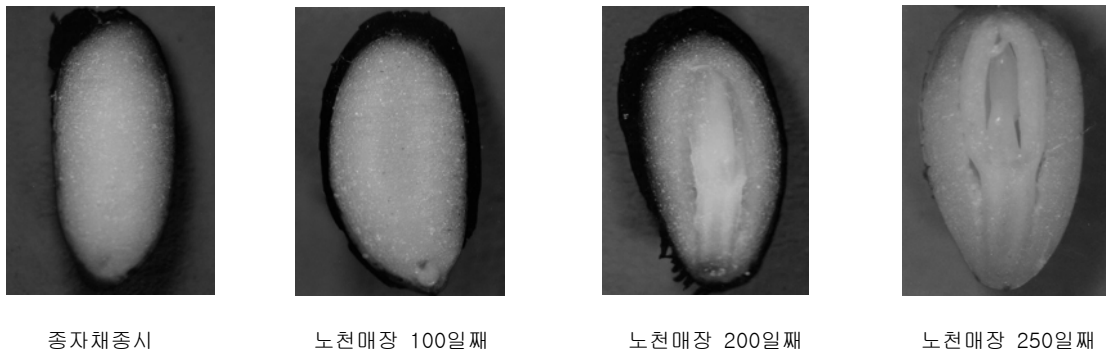


그림 1. 삼지구엽초 종자(노천매장)의 배성숙 단계도

표 1. 삼지구엽초 종자의 저장조건별 출아 및 생육상황 (파종 2개월후)

저장방법	출아온도 (℃)	출아기 (월,일)	출아율 (%)	평균출아 일수(일)	초장 (cm)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	신근장 (cm)
	10	3.30	84	33	3.3	0.7	0.6	0.36
노천매장 (250일)	15	3.25	90	30	4.0	1.1	1.1	0.37
	20	3.6	88	8	5.6	1.3	1.2	0.46
	25	3.7	74	10	5.8	1.2	1.1	0.40
5℃ 저온저장 (300일)	상동	4 처리조건 모두 출아되지 않음						

표 2. 상토종류별 삼지구엽초 종자의 출아 및 생육상황 (파종 2개월후)

상 토 종 류	출아기 (월,일)	출아율 (%)	초장 (cm)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	신근장 (cm)
밭 흙	4.27	29	2.2	1.5	1.5	4.3
밭흙1 + 팽화왕겨1	4.23	53	3.3	1.9	1.7	5.5
밭흙1 + 펄라이트1	4.22	55	2.8	1.9	1.9	3.9
시 판 육 묘 상 토	4.21	73	3.8	2.2	2.2	5.8

2. 삼지구엽초 조직배양 기술개발

가. 배지내 성장조정제 종류 및 농도가 재분화에 미치는 영향

성장조정제를 단용으로 처리하였을 때에 표3과 같이 대부분의 처리에서 일정기간 생존후 갈변하였으나 2,4-D에서는 캘러스가 유도된 후 계속 성장하는 비율이 치상조직의 55%였다.

표 3. 성장조정제 단용처리에서의 캘러스 형성

성장조정제		치상수	4주후생존율 (%)	캘러스유기율 (%)
종류	농도(mg/l)			
IBA	10	10	0	0
	1.0	8	0	0
	0.1	23	0	0
NAA	10	10	0	0
	1.0	7	0	0
	0.1	6	0	0
2,4-D	10	20	100	55
	1.0	13	77	0
	0.1	7	0	0
kinetin	10	19	63	0
	1.0	20	65	0
	0.1	17	71	0
BA	10	16	6	0
	1.0	17	0	0
	0.1	19	0	0
TDZ	2.0	14	36	0
	0.2	12	8	0
	0.02	7	0	0
무처리	0	13	15	0

옥신류와 사이토키닌류의 혼용처리에서는 표4와 표5에서와 같이 NAA와 BA, NAA와 TDZ 처리의 특정농도 조합에서 신초만 유도되어 분화가 일어났고, 특히 NAA 1.0mg/l + TDZ 0.02mg/l에서 가장 높은 재분화율을 보였다. 또한 2,4-D와 BA 처리에서는 캘러스 유기와 함께 부정근만 분화되어 다른 기관분화없이 뿌리만 계속 성장하여 뿌리조직만 특이하게 유도되었다(표 6).

표 4. NAA와 BA 혼용처리에서의 신허 분화

생장조정제		치상수	4주후 생존율 (%)	캘러스 유기율 (%)	신허 형성		비 고
NAA (mg/l)	BA (mg/l)				형성율 (%)	소요기간	
10	10	18	39	28	6	70일	엽(11.1%)
	1.0	20	90	45	0		
	0.1	17	88	41	6	67일	엽(11.1%)
1.0	10	17	0	0	0		
	1.0	20	0	0	0		
	0.1	10	70	20	0		
0.1	10	14	0	0	0		
	1.0	31	0	0	0		
	0.1	13	8	0	0		

표 5. NAA와 TDZ 혼용처리에서의 신허 분화

생장조정제		치상수	4주후 생존율 (%)	캘러스 유기율 (%)	신허 형성	
NAA(mg/l)	TDZ(mg/l)				형성율 (%)	소요기간
10	2.0	12	42	0	0	-
	0.2	11	91	27	18	52일
	0.02	14	72	50	7	45일
1.0	2.0	19	53	0	0	
	0.2	16	56	0	0	
	0.02	14	57	43	21	40일
0.1	2.0	15	27	0	0	
	0.2	13	31	0	0	
	0.02	7	0	0	0	

표 6. NAA와 BA 혼용처리에서의 신허 분화

생장조정제		치상수	4주후 생존율 (%)	캘러스 유기율 (%)	신허 형성	
2,4-D(mg/l)	BA(mg/l)				형성율 (%)	소요기간
10	10	20	0	0	0	-
	1.0	20	5	0	0	-
	0.1	20	10	10	0	-
1.0	10	20	70	35	0	-
	1.0	20	50	60	0	-
	0.1	20	90	45	15	90일
0.1	10	21	5	0	0	-
	1.0	23	0	0	0	-
	0.1	20	10	0	0	-

나. 배양재료 및 배지조성이 신초재분화에 미치는 영향

배지내 염농도에 따른 신초재분화율은 표 7에서와 같이 1/2 염농도에서 평균 2배 이상이었다. 배양재료에 있어서도 표 8에서와같이 캘러스 형성은 줄기에서 보다 높게 나타났고, 신초분화율은 엽에서 높았다. 이러한 결과는 줄기와 엽에 내재하는 호르몬의 조성비가 다르기 때문에 나온 것으로 생각된다. 배배양 및 근경배양의 결과는 표 9에 나타난 바와 같다.

표 7. 배지내 염농도가 신초 재분화 미치는 효과

염농도	치상수	캘러스유기율 (%)	신초재분화율 (%)
1/2 MS	1,063	71.0	10.1
MS	1,009	62.9	4.7

표 8. 배양재료에 따른 캘러스 형성 및 신초재분화율

치상부위	치상수	캘러스유기율 (%)	신초재분화율 (%)
줄기	1143	79.8	3.8
엽	929	54.0	11.0

표 9. NAA와 TDZ의 혼용처리시 배배양 및 근경배양에 미치는 영향

생장조정제 종류 및 농도		배배양	근경배양
NAA(mg/l)	TDZ(mg/l)		
5	0.02	-*	C++
	0.005	rosette+	R++
1	0.02	-	C+
	0.005	rosette++	C+

* -: 반응 없음, +: 저조, ++: 양호, C: 캘러스, R: 부정근

신초재분화에 있어서 배지내 성장조정제의 종류 및 농도가 매우 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있는데 표 10과 표 11를 보면 NAA와 BA 혼용보다는 NAA와 TDZ 혼용에서 신초분화율이 높았고 특히 NAA 5mg/l + TDZ 0.005mg/l에서 88.9%의 신초분화율을 보였다.

표 10. NAA와 BA의 혼용처리가 신초재분화에 미치는 영향

생장조정제(mg/l)		치상수	캘러스 형성율(%)	신초재분화율(%)
NAA	BA			
20	10	20	35	25.0
	1	14	100	0
	0.1	19	11	0
10	10	18	100	0
	1	13	69	69.2
	0.1	18	89	0
5	10	14	50	21.4
	1	8	13	37.5
	0.1	15	20	0

표 11. NAA와 TDZ의 혼용처리가 신초재분화에 미치는 영향

생장조정제(mg/l)		치상수	캘러스형성율(%)	신초재분화율(%)
NAA	TDZ			
10	0.5	18	78	0
	0.1	19	79	0
	0.02	16	69	0
	0.005	20	90	10.0
5	0.5	15	60	0
	0.1	14	93	0
	0.02	14	43	28.6
	0.005	18	22	88.9
1	0.5	13	39	23.1
	0.1	17	100	23.5
	0.02	18	83	0
	0.005	14	64	42.9
0.5	0.5	18	6	0
	0.1	16	56	0
	0.02	20	95	35.0
	0.005	20	80	80.0

다. 생장조정제 처리가 재분화신초에 미치는 영향

재분화신초를 배양재료로 생장조정제에 대한 영향을 평가하였는데 캘러스 형성에는 NAA의 농도가 높을 때 2,4-D가 가장 효과적이었으나 완전한 식물체 분화는 되지 않았다 (표 12).

표 12. 재분화신훈초에 대한 생장조정제 종류 및 농도가 미치는 영향

생장조정제 종류 및 농도(mg/l)			캘러스	캘러스 및	캘러스 및	신훈분화	
NAA	TDZ	2,4-D	형성율(%)	부정근 형성율(%)	신훈분화율(%)	유지율(%)	
5	0.02	1	8	42	33	17	
		0.2	0	0	14	86	
		0.05	0	0	0	100	
		0.025	0	18	0	82	
		0.05	1	18	18	6	59
			0.2	13	13	27	47
			0.05	0	0	0	100
			0.025	0	10	20	70
1	0.02	1	0	14	0	86	
		0.2	0	0	0	100	
		0.05	0	0	18	82	
		0.05	0	0	8	92	
		0.005	1	0	0	0	100
			0.2	0	0	0	100
			0.05	0	0	0	100
			0.025	0	0	0	100

적 요

삼지구엽초 종자는 250일 이상 노천매장하여 후숙시켜 파종하여야 하며 출아의 적정 온도는 20℃로서 평균출아일수가 8일이었으며 신훈장이 0.46cm로 생육이 양호하게 나타났 으며 5℃ 저온저장 처리한 종자는 각 온도조건 상태에서 출아하지 않았다. 신훈묘 생산을 위한 상토종류로는 보습력과 공극율이 높은 시판 육묘상토가 출아율이 73%로 높고 신훈장이 5.8cm로 출아후 생육이 양호하였다.

조직배양에서 치상재료는 줄기보다는 어린 잎에서 반응이 우수하였고, 배지 염농도는 MS 표준농도보다는 1/2농도에서 우수하였다. 생장조정제의 영향을 보면 캘러스를 유기하고 생장시키는데에는 2,4-D의 단용처리가 유력하였고, 부정근 형성에는 2,4-D와 BA의 혼용처리에서 유리 하였다. 신훈을 분화시키는데에는 NAA와 BA, TDZ의 혼용처리가 필요하였는데 특히 NAA 5mg/l+TDZ 0.005mg/l에서 88.9%가 신훈분화를 일으켜 가장 효과적이었다. 재분화신훈초의 유지를 위해서도 NAA와 TDZ의 혼용처리가 유력하였는데 NAA 1mg/l와 낮은 농도의 TDZ 혼용에서는 2,4-D 1mg/l의 첨가에도 신훈초가 유지, 생장하였다. 그러나 체세포 조직에서 완전한 식물체로 분화되지는 못했다.

인 용 문 헌

- 안상득, 이종용. 1996. 재미있는 약초의 유래. 도서출판 진솔 pp55 ~ 57.
- 최병렬, 박경열. 1998. 시호 입모향상을 위한 파종전 노천매장 효과. 한국약용작물학회지 6(3) : 216 ~ 220.
- 정성환, 서동환, 김기재, 이광성, 최부술, 김용한. 1993. 작약종자의 채종시기와 후숙이 출아에 미치는 영향. 한국약용작물학회지 1(1) : 10 ~ 15.
- 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 외. 1998. 중약대사전. 도서출판 정담 pp.4400 ~ 4406.
- 김순곤, 김동원, 황창주, 남상식. 1996. 고추냉이 종자의 휴면타파 저장중 유아출현억제 및 파종기에 관한 연구. 한국약용작물학회지 4(1) : 64 ~ 67.
- 김승경, 김세원, 노준현, 김영진. 1996. 삼지구엽초 소득화 개발연구. '96 강원도 농촌진흥원 시험연구보고서 pp 582 ~ 585.
- 김승경, 노준현, 김상수, 정봉하, 윤희정, 김세원. 1995. 삼지구엽초 소득화 개발연구. '95 강원도 농촌진흥원 시험연구보고서 pp 546 ~ 551.
- 김태정. 1996. 한국의 자원식물. 서울대학교출판부. (1) p282.
- 고경식. 1993. 야생식물 생태도감. 우성문화사 p.94.
- 권대룡, 조지형, 권영석, 이승필, 최부술. 1993. 유망 산채류 종자의 휴면타파 및 발아 촉진 방법에 관한 연구. 농업과학논문집 35(2) : 416 ~ 421.
- 박경열, 최병렬, 이은섭, 김순재, 박철호. 1998. 삼지구엽초 자생지 환경특성. 한국약용작물학회지 6(1) : 61 ~ 67.
- 박문수. 1994. 약용식물 '가시오갈피' 실생번식 기술개발. 연구와지도 35(3) : 88 ~ 91.
- 서종택, 조광수, 양미희, 김원배, 엄영현, 최관순, 김이훈. 1998. 자생 참나물의 종자 발아특성. 원예논문집 40(1) : 125 ~ 133.
- 신국현, 임순성, 안상득, 김승경, 박경열. 1996. 삼지구엽초의 채취시기 및 산지별 성분차이. 한국약용작물학회지 4(4) : 16 ~ 21.
- Yamamoto, H., Ieda, K., Tsuchiya, S. I., Yan, K., Tanaka, T., Iinuma, M., Mizuno, M. 1992. Flavonol glycoside production in callus cultures of *Epimedium diphyllum*. Phytochemistry 31(3) : 837 ~ 840.

연구결과 활용

- 실생번식 기술은 종묘를 대량생산하여 특산단지 조기 조성 및 우수품종 육종의 기초자료 및 영농활용에 반영하고, 조직배양기술은 기내 대량생산을 위한 기초자료로 활용함.