



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

희귀 및 멸종위기 식물 만년콩(*Euchresta japonica* Benth.)의 종자 발아 및 기내증식에
관한 연구



제주대학교 대학원

생명과학과

송 순 영

2010년 8월

희귀 및 멸종위기 식물 만년콩(*Euchresta japonica* Benth.)의 종자발아 및 기내증식에
관한 연구

지도교수 고 석 찬

송 순 영

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

2010년 8월

송순영의 이학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____ 印

위 원 _____ 印

위 원 _____ 印

제주대학교 대학원

2010년 8월

Studies on Seed Germination and *in vitro*
Propagation of *Euchresta japonica* Benth., a Rare
and Endangered Species

Soon Young Song

(Supervised by Professor Seok Chan Koh)

A thesis submitted in partial fulfillment of the degree of Master
of Science



2010. 8.

Department of Life Science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

Abstract

In this study, effects of plant growth regulators on seed germination, callus induction and *in vitro* proliferation were surveyed, in order to find appropriate culture condition for mass propagation and to discuss habitat conservation or habitat restoration of *Euchresta japonica* Benth, a rare and endangered wild plant.

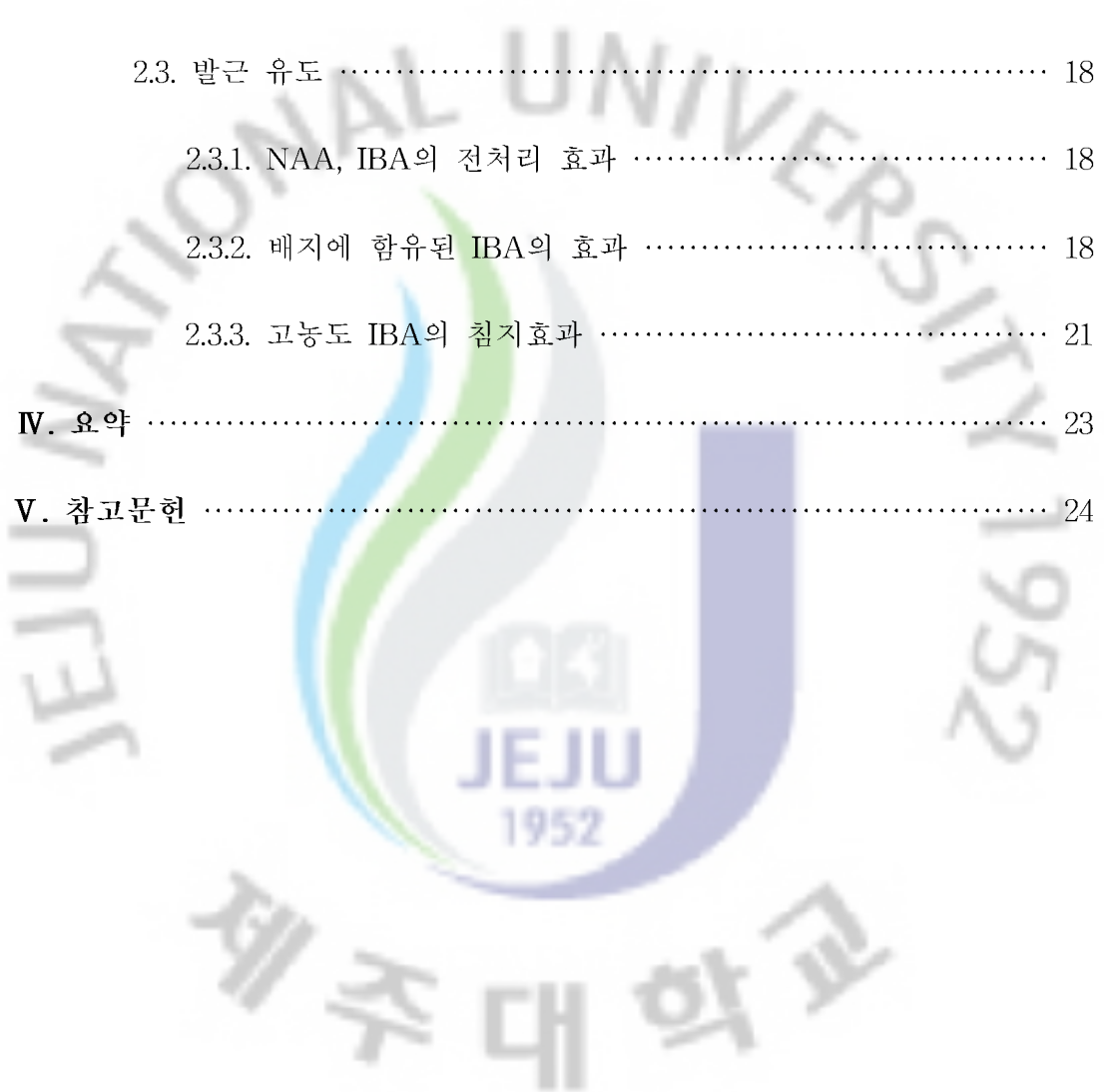
Germination rate was 86.4% when the seeds were stored in 4°C, while it was 76.1% when stored in room temperature. Callus induction from stems of seedlings was better on MS medium than on WP medium. Especially, calli were well induced on WP medium containing NAA 1mg/L and BA 0.5, 1, 2mg/L, NAA 2mg/L and BA 0.5, 1mg/L, NAA 5mg/L and BA 0.5mg/L. However, shoots or roots were not differentiated on any media from stems of seedlings. However, when nodes were cultured to produce many shoots, shoots were well formed on NAA 0.1mg/L and BA 1mg/L, GA₃ 0.1mg/L and BA 1mg/L, GA₃ 0.5mg/L and BA 2mg/L. Subsequently, root formation from the shoots derived from nodes was stimulated in the medium with 5mg/L IBA. Specially, roots were well formed when isolated shoots were soaked for 1 min into 500mg/L IBA solution and cultured in hormone-free WP medium.

These results indicate that the treatment with combination of GA₃ and BA would be more useful for shoot proliferation of *E. japonica* Benth. It would be effective, for the root induction from shoots, to soak isolated shoots into a high concentration of IBA and to transfer them on hormone-free WP medium without plant growth regulators. The appropriate conditions which plantlets produced through *in vitro* propagation could adopt to natural habitats should be established and further research on habitat conservation or restoration is to be performed in near future.

목차

Abstract	i
목 차	ii
List of Figures	iv
List of Table	v
Abbreviations	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 식물재료	4
2. 종자발아	4
3. 기내배양	4
3.1 켈러스 유도	4
3.2 신초 유도	5
3.3 발근 유도	5
III. 결과 및 고찰	6
1. 종자의 발아	6
2. 기내 배양	8

2.1. 켈러스 유도	8
2.1.1. 배지 종류 및 NAA와 BA의 효과	8
2.1.2. 2,4-D와 BA의 효과	12
2.2. 신초 유도	14
2.3. 발근 유도	18
2.3.1. NAA, IBA의 전처리 효과	18
2.3.2. 배지에 함유된 IBA의 효과	18
2.3.3. 고농도 IBA의 침지효과	21
IV. 요약	23
V. 참고문헌	24



List of Figure

Figure 1. <i>Euchresta japonica</i> plant bearing the racemous inflorescences. ...	3
Figure 2. Young <i>E. japonica</i> plants observed at natural habitats in Jeju Island	3
Figure 3. The seedling of <i>E. japonica</i> grown <i>in vitro</i> for 10 weeks	7
Figure 4. <i>In vitro</i> growth of calli induced from stem explants of <i>E. japonica</i> on MS medium and WP medium	11
Figure 5. Callus induction from stem explants of <i>E. japonica</i> on WP media with various combinations of 2,4-D and BA.....	13
Figure 6. Multiple shoots developed for 6 weeks from explants of axillary shoots <i>in vitro</i> induced from nodes of <i>E. japonica</i>	17
Figure 7. Plantlets grown for 10 weeks from shoots of <i>E. japonica</i> soaked into 500mg/L IBA solution.....	22

List of Table

Table 1. Effects of temperature on germination of seeds of <i>E. japonica</i> ····	7
Table 2. Effects of different concentrations of growth regulators on callus induction from <i>E. japonica</i> stems on MS and WP media ··········	10
Table 3. Effects of NAA and BA on development of axillary shoots from node explants of <i>E. japonica</i> on WP medium ··········	15
Table 4. Effects of GA ₃ and BA on development of axillary shoots from node explants of <i>E. japonica</i> on WP medium ··········	16
Table 5. Effect of NAA and IBA pretreatment on rooting and shoot development from shoots <i>in vitro</i> induced from nodes of <i>E. japonica</i> ········	20
Table 6. Effect of IBA on rooting and shoot development from shoots <i>in vitro</i> induced from nodes of <i>E. japonica</i> ··········	20
Table 7. Effects of soaking treatments on rooting from shoots <i>in vitro</i> induced from nodes of <i>E. japonica</i> ··········	22

Abbreviations

2,4-D : 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

BA : 6-benzyladenine

GA₃ : gibberellic acid

IBA : indole butyric acid

MS medium : Murashige and Skoog medium

NAA : α -naphthalene acetic acid

WP medium : Woody plant medium



서론

만년콩(*Euchresta japonica* Benth.)은 콩과의 만년콩속(*Euchresta*)에 속하는 상록소관목으로 우리나라와 일본, 중국 등에도 분포하고 있으나 관상가치가 높아 남채되어온 식물이다. 우리나라에서는 제주도가 유일한 자생지로 서귀포 돈네코 계곡의 상록활엽수림에 드물게 서식하고 있다(현, 2001; 김, 2006).

만년콩은 높이 30~60cm로 자라며 잎은 호생하고 3개의 소엽으로 구성된다. 소엽은 가장자리가 밋밋하며 양끝이 둥글게 생겼으며, 표면은 털이 없고 뒷면은 연한 갈색털이 있으며 흰빛이 돌며, 뿌리는 약간 굽은 편이다. 봄철에 흰색 꽃이 총상화서로 원줄기 끝에 달린다. 콩과의 다른 식물들과는 달리 꼬투리가 아닌 핵과의 형태로 열매가 달리며, 타원형의 열매는 검은 남자색으로 익는다. 김이만씨가 처음 채집하여 그 이름에서 “만”을 따오고, 상록성이기 때문에 “만년콩”이라고 한다(이, 2003; Fig. 1).

제주도내 만년콩의 분포 및 분류에 관한 연구로는 이(1985), 이와 이(1996), 제주도(1999), 김(2006) 등이 있다. 김(2006)에 의하면, 서귀포시 상호동 돈네코 계곡의 자생지 5개소에서 어린 개체를 포함한 14개체가 확인되었고, 호근동 강정천 상류지역 1개소에서 3개체가 확인되었으나 개화 및 결실이 가능한 개체는 관찰되지 않았다고 한다. 실제 자생지에서는 만년콩이 Fig. 2처럼 어린 개체들만 관찰되고 있다. 현재 만년콩 자생지는 탐방객의 유출입이 잦은 계곡에 위치하여 인위적인 간섭이 많은 편이며, 관상가치와 희귀성으로 인한 남채 등이 위협요인이 되고 있다. 따라서, 우리나라에서는 1997년에 환경부에서 특정야생식물 2등급으로 지정이 되었고 그 이후, 2000년에 자연환경보전법에 따라 보호야생식물 36호로 지정되어 관리되었다. 현재는 야생동식물보호법이 제정되면서 멸종위기야생식물 I 등급으로 등급이 상향되어 보호, 관리되고 있다(환경부, 2005). 또한, 중국에서도 China Plant Red Data Book에 멸종위기식물로 선정하여 보호하고 있다(장 등, 2005). 따라서 만년콩은 증식 및 복원이 가장 시급한 종류 중 하나로 판단되며, 적극적인 보존 대책이 요구된다. 이에 자생지 복원을 위한 대책으로써 만년콩의 종자 발아 및 개체 증식을 위한 증식방법에 대한 연구가 요구되고 있

다.

만년콩의 증식을 위해서는 9~11월 사이에 성숙한 종자를 채취하여 정선한 후 직파하는 실생묘 증식이 가능하지만 현재 돈네코 계곡의 자생지에 생식 가능한 개체는 거의 없는 실정이다. 이 때문에 종자의 채집이 어렵고 받아들여 낮아 증식시키는데 어려움이 있다. 따라서 소량의 생체조직을 이용한 개체 증식방법으로써 조직배양기술을 확립할 필요가 있다. 희귀 및 멸종위기 수종에 대한 조직배양 연구는 꾸준히 보고되고 있으며, 국내에서는 산개나리(문 등, 1997), 미선나무(문 등, 1999), 왕자귀나무(박 등, 2003), 왕벚나무(김 등, 1993), 피뿌리풀(한 등, 2004), 섬시호(김 등, 2007) 등의 기내증식 연구가 수행되었다. 외국에서도 조직배양을 이용한 희귀 및 멸종위기 식물의 증식 연구가 최근까지 계속되고 있다 (Negash, 2002; Rai, 2002; Beena and Martin, 2003; Gomes *et al.*, 2003; Martin, 2003; Chen *et al.*, 2006; Faisal *et al.*, 2007).

따라서 본 연구는 멸종위기에 처한 만년콩의 대량증식을 위하여 무균발아, 캘러스 유도 및 신초유도, 발근에 효과적인 식물생장조절물질의 종류와 농도를 규명하고, 나아가서는 현지 내외 보전 및 자생지 복원을 위한 기초를 마련하고자 실시하였다.



Figure 1. *Euchresta japonica* plant bearing the racemous inflorescences.



Figure 2. Young *E. japonica* plants observed at natural habitats(A: Sanghyodong, B: Hogeundong) in Jeju Island

재료 및 방법

1. 식물재료

본 실험에 사용된 만년콩(*Euchresta japonica* Benth.) 종자는 제주시에 소재한 한라수목원 증식온실 내에서 채취한 것으로 상온에 보관한 것과 냉장실에 저온 보관한 것으로 구분하여 사용하였다.

2. 종자발아

만년콩 종자는 중성세제 2~3방울을 넣은 증류수에서 1시간 동안 표면을 세척하고, 70% ethanol에서 10분간, tween 20이 1~2 방울 첨가된 2% sodium hypochlorite 용액에 15분간 처리하여 살균하였다. 소독된 종자는 MS(Murashige and Skoog, 1962) 배지에 과중하여 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 16시간 광조건(3,500~4,000 lux)에서 무균배양 하여 발아시켰다.

3. 기내배양

기내에서 무균 발아된 만년콩 유묘를 이용하여 캘러스 유도, 신초증식 및 발근을 유도하였다. 이 때, 모든 배양과정은 종자발아와 같이 16hr light / 8hr dark의 일장 조건하에서 온도 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 광도 3,500~4,000 lux에서 실시하였다.

3.1 캘러스 유도

발아된 어린 식물체의 줄기를 0.5cm로 절취하여 캘러스 유도에 미치는 생장 조절제의 영향과 적정 기본배지의 종류를 조사하였다. 먼저 캘러스 유도에 적합한 배지를 선정하기 위해 옥신류인 NAA와 시토키닌류인 BA를 농도별(0.1, 0.5, 1, 2, 5mg/L)로 첨가된 MS 배지와 WP(Lloyd and McCown, 1981) 배지에서 캘러스 형성 정도를 비교하였다. 그리고 캘러스 유도에 효과적인 WP 배지를 기본배지로 선정하고 호르몬의 종류를 달리하여 옥신류의 일종인 2,4-D와 시토키닌류인 BA를 농도별(0.1, 0.5, 1, 2, 5mg/L)로 단독 및 혼합 처리하여 캘러스 유도 효과를 비교하였다.

3.2. 신초 유도

신초를 유도하기 위하여, 발아된 개체에서 액아가 포함된 줄기를 0.5cm 정도로 잘라서 사용하여, WP 기본배지에 NAA와 BA, GA₃와 BA를 농도별(0.1, 0.5, 1, 2, 5mg/L)로 조합 처리하여 배양하였다.

3.3. 발근 유도

유도된 신초 중에서 정단부가 건전하고 생장이 양호한 신초를 사용하여 발근 유도 실험을 실시하였다.

우선 1~2cm 정도의 길이로 자른 신초를 한 등(2004)의 방법을 이용하여 옥신류인 NAA와 IBA를 전처리하여 발근 정도를 비교하였다. 즉, NAA와 IBA가 농도별(0.1, 0.5, 1, 2, 5mg/L)로 첨가된 1/2 MS 배지에 신초를 4일 동안 전처리한 후, 1g/L Hyponex가 첨가된 1/2 MS 기본배지로 계대 배양하였다.

발근에 미치는 IBA의 최적 효과를 알아보기 위하여 Hyponex 1g/L를 포함한 WP 배지에 IBA를 농도별(0.1, 0.5, 1, 2, 5mg/L)로 첨가한 후 신초를 기내 삼목하여 배양하였다.

그리고 고농도 IBA의 침지처리 효과를 확인하기 위하여 신초를 무균대에서 IBA 100mg/L과 500mg/L에 1분간 침지한 후, 호르몬을 처리하지 않고 Hyponex 1g/L를 첨가한 WP 배지에 배양하였다.

결과 및 고찰

1. 종자의 발아

한라수목원 증식온실 내에서 채집된 만년콩 종자를 이용하여 발아 시험을 실시하였다. 상온 보관 또는 4℃ 냉장 보관 종자를 소독과정을 거친 후 성장조절물질이 첨가되지 않은 MS 기본배지에 기내 파종하여 5주 후에 발아율을 조사하였다. 그 결과, 상온 보관된 만년콩 종자는 71개 중 54개가 발아되어 발아율이 76.1%이고, 저온 처리한 종자는 22개 중 19개가 발아되어 86.4%의 발아율을 보였다(Table 1). 만년콩 종자의 발아에 있어서 상온 보관보다 4℃ 냉장 보관에서 종자의 발아율이 대략 10% 높아 보관 온도에 영향을 받는 것으로 생각된다. 따라서, 좀 더 나은 발아율을 위해서는 상온 보다는 4℃ 냉장에 보관하는 것이 더 좋을 것으로 생각된다.

무균상태에서 배양된 만년콩 종자는 4주부터 발아가 시작되어 8주 후에는 완전한 유묘의 형태를 이루었다(Fig. 3).

Table 1. Effects of temperature on germination of seeds of *E. japonica*

Temperature	No. of seeds incubated	No. of seeds germinated	Germination percentage (%)
Room temperature	71	54	76.1
4°C	22	19	86.4



Figure 3. The seedling of *E. japonica* grown *in vitro* for 10 weeks. The bar indicates 1cm.

2. 기내배양

식물의 재분화는 식물의 줄기 조직 또는 잎 절편으로부터 캘러스를 거치거나 또는 절편으로부터 직접 유도해 낼 수 있다. 이에 따라, 본 실험에서는 캘러스 유도의 최적조건을 찾고자 하였으며, 액아로부터 다량의 신초를 유도해내고 유도된 신초에서 발근을 유도하는 최적의 조건을 찾고자 하였다.

2. 1. 캘러스의 유도

2. 1. 1. 배지 종류 및 NAA와 BA의 효과

기내배양을 통한 캘러스의 유기는 식물의 종에 따라, 식물체 내에서도 배양에 이용되는 조직 부위 및 배양조건과 방법에 따라 캘러스 유기 양상이 크게 다른 것으로 알려져 있다(최 등, 2006). 이에 따라, 본 실험은 배지 종류에 따른 캘러스 유도과정을 관찰하고 호르몬에 따른 캘러스 유도의 최적조건을 찾기 위하여 실시하였다. 배지의 종류에 따른 성장조절물질이 캘러스 유도에 미치는 영향을 보기 위하여 MS 배지와 WP 배지에 NAA와 BA를 각각 농도별(0.1, 0.5, 1, 2, 5mg/L)로 단독 및 혼합하여 처리된 배지에 0.5cm의 줄기절편을 배양하고 5주 후에 확인하였다(Table 2).

MS 배지에서 NAA(0.1, 0.5, 1, 2, 5mg/L)와 BA(0.1, 0.5, 1, 2, 5mg/L)를 다양하게 조합하여 배양한 결과, 캘러스의 유도는 전체적으로 양호하지 않았으며 Fig. 4 A에서 보는 바와 같이 시간이 지날수록 점차 갈변화 되었다. 이에 반해 WP 배지에서는 NAA가 단독처리 된 배지에서는 캘러스가 약하게 나타났지만, NAA와 BA의 혼용 처리에서는 단독 단독처리보다는 대체로 양호하게 캘러스가 형성되었다. 특히, NAA의 농도가 0.5~2mg/L이고 BA 농도가 0.5~2mg/L의 농도일 때 가장 많은 캘러스가 형성되었다. 즉, NAA와 BA를 혼용처리 한 경우, NAA 1mg/L에 BA 0.5, 1, 2mg/L 처리한 3종의 배지와 NAA 2mg/L 에 BA 0.5, 1 mg/L 처리한 2종의 배지, NAA 5mg/L에 BA 0.5mg/L 처리한 1종의 배지로, 총 6종의 배지에서 캘러스 형성이 가장 양호하였다(Fig. 4B).

캘러스의 형성 및 갈변 유무 등을 고려해 볼 때 MS 배지보다는 WP 배지에서가 양호한 것으로 보아 만년콩의 캘러스 유도를 위해서는 MS 배지보다 WP 배지가 적합한 것으로 사료된다. 하지만, 본 실험에서 대부분 처리구에서 그 조

건에 따라 켈러스는 유도되었으나 신초의 유도나 뿌리 분화는 나타나지 않았다.



Table 2. Effects of different concentrations of growth regulators on callus induction from *E. japonica* stems on MS and WP media

Growth regulator (mg/L)		MS medium	WP medium
NAA	BA		
0.1	0	- ¹	+
	0.1	+	++
	0.5	+	++
	1	+	+
	2	+	+
	5	-	-
0.5	0	-	+
	0.1	-	++
	0.5	-	++
	1	-	++
	2	-	+
	5	-	-
1	0	-	+
	0.1	+	++
	0.5	-	+++
	1	-	+++
	2	-	+++
	5	-	-
2	0	-	++
	0.1	+	++
	0.5	+	+++
	1	+	+++
	2	-	++
	5	-	-
5	0	-	+
	0.1	-	++
	0.5	+	+++
	1	-	++
	2	-	++
	5	-	-

1. -: not, + : slight, ++: moderate, +++: good

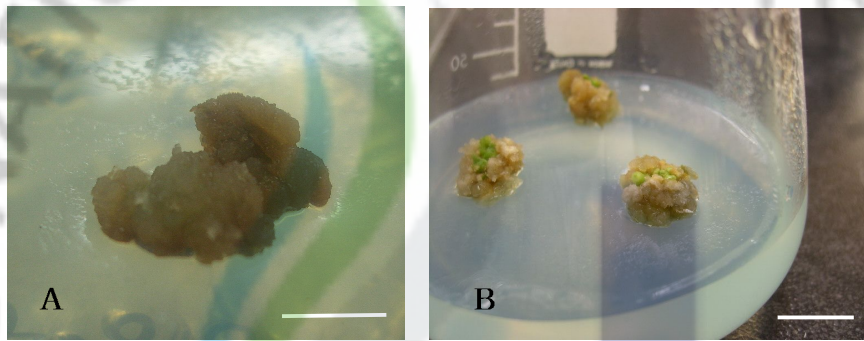


Figure 4. *In vitro* growth of calli induced from stem explants of *E. japonica* on MS medium(A) and WP medium(B). The bars indicate 5mm.

2. 1. 2. 2,4-D와 BA의 효과

Table 2에서 보는 바와 같이 WP 배지가 만년콩의 캘러스 유도에 적합한 것으로 보여, 여기에서는 WP 배지를 기본으로 NAA 대신 2,4-D를 첨가하여 캘러스 형성을 유도하고 5주 후 조사하였다(Fig. 5).

생장조절물질이 첨가되지 않은 배지에서나 BA가 단독 처리된 조건에서는 줄기의 절단면이 조금 부풀어 올랐으나 캘러스는 형성되지 않았다. 2,4-D의 농도를 달리하여 단독으로 처리하였을 때에 농도가 높아지는 것에 따라 절단면으로부터 연한 연두색의 캘러스가 형성되었다. 또한 저농도의 BA에서는 2,4-D 농도가 높아짐에 따라 캘러스가 형성되었으며, 그 중에서 2,4-D 1mg/L와 BA 0.1mg/L에서 캘러스의 형성이 가장 양호하였다. 그러나 만년콩 캘러스는 NAA와 BA를 혼용 처리하였을 때보다 2,4-D와 BA를 혼용처리 하였을 때가 캘러스가 느리게 형성되었다. 이와 같은 결과를 보면 만년콩의 캘러스 형성에는 2,4-D와 BA 혼용처리 보다는 NAA와 BA를 혼용처리 하는 것이 캘러스 형성에 적합한 것으로 보인다.

그리고, Table 2에서 NAA와 BA를 처리 했을 때와 같이 2,4-D와 BA를 처리하였을 때에도 호르몬 처리조건에 따라 캘러스만 형성되었으며, 신초나 뿌리 형성은 보이지 않았다. 따라서, 효율적인 개체 증식을 위해서는 캘러스에서 재분화를 유도하는 방법보다 줄기의 액아로부터 직접 신초를 유도하는 방법이 바람직한 것으로 생각된다.

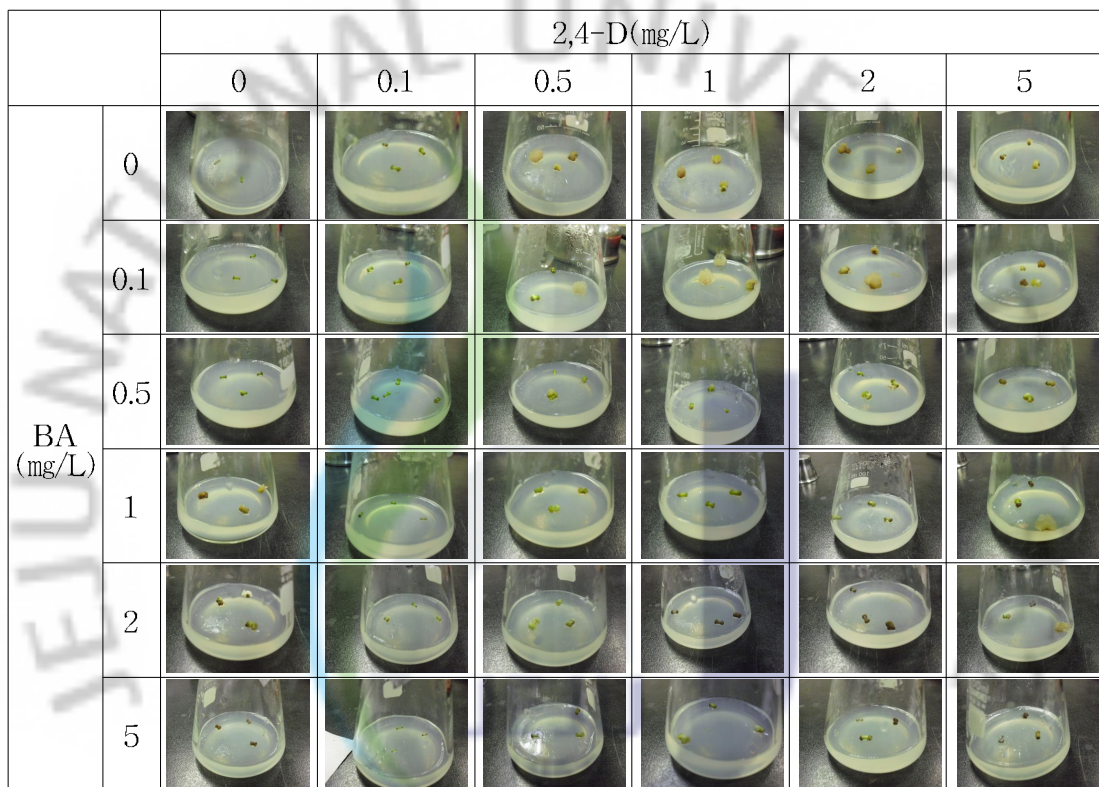


Figure 5. Callus induction from stem explants of *E. japonica* on WP media with various combinations of 2,4-D and BA.

2. 2. 신초 유도

Table 2와 Fig. 4의 켈러스 유도 실험에서는 신초나 뿌리가 형성되지 않았기 때문에 액아로부터 직접적으로 신초를 증식하고자 하였다. 여기에서 사용된 액아 배양법은 목본류 조직배양시 사용되는 기법중의 하나이며, 활엽수종 기내번식의 가장 보편적인 방법(Bonga, 1987; Thorpe *et al.*, 1991)으로 활용되고 있다. 실제로 포플러류(Lubrano, 1992), 자작나무류(Meier-Dinkel, 1992), 유칼리류(Gupata and Mascarenhas, 1987), 왕벚나무(Cheong and Kim, 2001) 등에서 대량증식을 통해 실용화되고 있는 배양법이다.

만년콩 줄기를 0.5cm의 크기로 잘라 NAA와 BA, GA₃와 BA를 농도별(0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5mg/L)로 단독 또는 혼용 처리한 WP 배지에서 배양하여 신초를 유도하여 5주 후 확인하였다(Table 3, 4). WP 배지에 NAA와 BA를 단독 및 혼용처리 하였을 때, NAA가 단독처리된 조건에서는 어느 경우에도 신초는 형성되지 않았다. 그리고 NAA를 처리하지 않았거나 NAA의 농도가 0.1~0.5mg/L로 낮은 농도일 때에는 BA의 농도가 높아짐에 따라 신초가 형성되는 경향을 보였다(Table 3). 특히, NAA 0.1mg/L와 BA 1mg/L의 조건에서가 신초가 가장 잘 형성되었다. 그리고 NAA의 농도가 1~2mg/L로 고농도일 때에는 BA의 첨가에 관계없이 신초는 형성되지 않았다.

반면에 GA₃와 BA를 혼용처리한 배지에서는 NAA와 BA가 혼용처리된 배지에서보다 좋은 결과를 보였다. GA₃농도가 낮은 0.1~0.5mg/L에서는 BA의 농도가 높아짐에 따라 신초가 많이 형성되었다(Table 4). 특히, GA₃ 0.1mg/L와 BA 1mg/L, GA₃ 0.5mg/L와 BA 2mg/L의 배지에서 신초가 잘 형성되었다. 또한, 이들 신초를 동일 조건의 배지에 계대배양을 하였을 때에도 많은 수의 신초를 얻을 수 있었다(Fig. 6).

Dodd(1994)는 시토키닌과 옥신의 조합처리가 신초 증식을 위한 중요한 요인이라고 보고하였으며, Letham(1963)은 시토키닌 단독처리보다는 다른 식물생장 조절물질과 함께 처리할 경우 이들의 상호작용으로 상승효과를 초래하여 식물체 형성에 활성을 촉진시킨다는 것과 유사한 결과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 액아배양을 통한 신초 증식을 위해서는 NAA와 BA보다는 GA₃와 BA를 혼용처리하는 것이 더 유용할 것으로 생각된다.

Table 3. Effects of NAA and BA on development of axillary shoots from node explants of *E. japonica* on WP medium

Growth regulator(mg/L)		Shoot development
NAA	BA	
0	0	- ¹
	0.1	-
	0.5	++
	1	++
	2	++
0.1	0	-
	0.1	-
	0.5	-
	1	+++
	2	-
0.5	0	-
	0.1	-
	0.5	++
	1	++
	2	++
1	0	-
	0.1	-
	0.5	-
	1	-
	2	-
2	0	-
	0.1	-
	0.5	-
	1	-
	2	-

1. -: not, + : slight, ++: moderate, +++: good

Table 4. Effects of GA₃ and BA on development of axillary shoots from node explants of *E. japonica* on WP medium

Growth regulators(mg/L)		Shoot development
GA ₃	BA	
0	0	- ¹
	0.1	-
	0.5	+
	1	++
	2	-
	5	-
0.1	0	-
	0.1	-
	0.5	++
	1	+++
	2	++
	5	+
0.5	0	-
	0.1	-
	0.5	+
	1	++
	2	+++
	5	+
1	0	-
	0.1	-
	0.5	-
	1	-
	2	+
	5	+

1. -: not, + : slight, ++: moderate, +++: good



Figure 6. Multiple shoots developed for 6 weeks from explants of axillary shoots *in vitro* induced from nodes of *E. japonica*. The bar indicates 1cm.

2. 3. 발근 유도

Table 3과 4에서 유도된 신초 중에서 정단부가 건진하고 생장이 양호한 신초로부터 발근을 유도하기 위하여 NAA와 IBA의 효과를 살펴보았다.

2. 3. 1. NAA, IBA의 전처리 효과

건진하고 생장이 양호한 신초를 1~2cm로 절단하여 한 등(2004)의 방법을 이용하여 NAA와 IBA를 농도별(0.1, 0.5, 1, 2, 5mg/L)로 첨가된 1/2 MS 배지에 4일간 전처리한 후, Hyponex 1g/L 를 첨가한 1/2 MS배지에 기내삼목을 하여 배양하였다 (Table 5). 8주 후, NAA를 전처리한 조건에서는 뿌리는 형성되지 않았으며, 줄기 생장 및 개엽상태도 좋은 편은 아니었다. IBA를 전처리한 경우에도 뿌리는 형성되지 않았으나, 전체적으로 줄기 생장 및 잎의 개엽 상태는 좋았다. IBA의 농도가 높아질 때 줄기 생장이 좋았으나 잎의 개엽 상태는 비슷하였다.

그러나, 본 실험의 결과와는 달리 전처리를 통한 발근 유도는 최근의 몇몇 연구결과에서 찾아볼 수 있는데, Silril과 Dhar(1997)는 조구나무의 기내발근 유도 시 IBA를 48시간 전처리배양 후 1/2 MS 배지로 계대배양하여 83%까지 발근율을 향상 시켰고, Agarwal 등(1992)은 IBA를 30분간 전처리 배양하여 차나무 줄기의 발근을 촉진시킬 수 있었다고 한다. Barghchi(1988)는 *Alnus cordata*의 발근유도에서 IBA를 24시간 전처리하는 것이 뿌리형성에 효과적이라고 하였으며, Ramírez-Malagón 등(1997)은 일반적으로 발근이 어려운 *Photinia × fraseri*의 기내 발근유도에서 IBA 농도 및 전처리 기간을 달리한 조건에서 6일간 전처리하는 것이 발근에 가장 효과적임을 밝힌 바 있다. 본 실험에서는 NAA나 IBA의 전처리에 의해 발근은 나타나지 않아 위의 연구 결과들과는 다른 결과를 보였다.

2. 3. 2. 배지에 함유된 IBA의 효과

Table 5에서 NAA나 IBA를 전처리하였을 경우 발근이 유도되지 않았으나, 조구나무, 차나무 등 여러 가지 목본 식물에서 IBA 전처리에 의해 뿌리가 유도되는 것으로 보고되어 있는 연구결과를 보면(Silril and Dhar, 1997; Agarwal *et al*, 1992), 목본식물에서는 뿌리를 유도하기 위하여 IBA가 효과적인 것으로 생각

된다. 따라서 만년콩에도 IBA가 뿌리 형성에 영향을 미칠 것으로 생각되므로, 배지에 IBA를 첨가하여 장기간 배양하였을 경우, 발근에 미치는 효과를 확인하고자 실시하였다.

Hyponex 1g/L를 첨가한 WP 배지에 IBA를 농도별(0.1, 0.5, 1, 2, 5mg/L)로 첨가한 후 만년콩의 신훈을 1~2cm의 크기로 선별, 기내 삼목하여 배양하여 7주 후에 조사하였다 (Table 6). 그 결과, 가장 높은 농도인 5mg/L의 IBA가 함유된 배지에서는 뿌리가 형성되었으나, 그 이외의 조건에서는 뿌리가 형성되지 않았다. 따라서 발근 유도를 위해서는 5mg/L 이상의 농도에서 IBA가 발근에 미치는 영향을 조사할 필요가 있을 것으로 생각된다.



Table 5. Effect of NAA and IBA pretreatment on rooting and shoot development from shoots *in vitro* induced from nodes of *E. japonica*

Growth regulator(mg/L)	Rooting	Shoot development	Leaf development	
NAA	0.1	- ¹	+ ¹	-
	0.5	-	-	+
	1	-	-	-
	2	-	+	-
	5	-	+	-
IBA	0.1	-	++	++
	0.5	-	++	+++
	1	-	++	++
	2	-	+++	++
	5	-	+++	+++

1. -: not, + : slight, ++: moderate, +++: good

Table 6. Effect of IBA on rooting and shoot development from shoots *in vitro* induced from nodes of *E. japonica*

Growth regulator(mg/L)	Rooting	Shoot development	Leaf development	
IBA	0.1	- ¹	+	+
	0.5	-	++	+++
	1	-	++	++
	2	-	+	+
	5	++	++	++

1. -: not, + : slight, ++: moderate, +++: good

2. 3. 3. 고농도 IBA 침지효과

Table 6의 결과를 토대로 만년콩 발근에는 5mg/L보다 높은 농도의 IBA가 효과가 있는 것으로 판단되어, 고농도의 IBA 용액의 침지처리가 발근에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다. 즉, 기내증식 된 신초를 무균대 안에서 1~2cm 크기로 절단하여 IBA 100mg/L와 500mg/L로 고농도에 1분간 침지한 후 Hyponex 1g/L를 첨가한 WP 배지에 배양하여 8주 후 그 결과를 조사하였다 (Table 7). 그 결과, IBA 100mg/L에 1분간 침지 한 신초를 WP 배지에 무균배양하였더니 발근이 더디게 진행되었으나, IBA 500mg/L에 1분간 침지 한 경우는 발근이 빠르게 진행되었으며 발근 된 개체도 많았다. 발근은 주로 절편 기부가 부풀어 캘러스가 형성된 다음 이루어졌으며 캘러스 형성 없이 줄기에서 직접 뿌리가 형성되기도 하였다. 발근이 된 개체들에서는 대부분 2개 이상의 뿌리가 발생되었다 (Fig. 7). 따라서 고농도의 IBA인 500mg/L에 신초를 1분간 침지하고 기내 배양하는 것이 발근 유도를 위해서는 더 효과적일 것으로 생각된다. 이와 같이 IBA의 침지 처리 한 후 호르몬이 없는 배지에 계대하여 배양하는 과정을 통해 발근율이 향상되는 것은 IBA가 뿌리 원기의 유도를 촉진하고 다음 IBA가 없는 기본배지에서 발근이 이루어진 것으로 생각된다.

Oliveira와 Pais(1991)도 키위의 원형질체 배양으로부터 식물체를 분화시킬 때 IBA 용액의 침지처리가 효과적이었다고 하였으며, Zhang 등(1995)은 키위의 원형질체 배양 시 분화된 신초를 성장조절제가 없는 배지에 옮기기 전 IBA 용액에 침지하여 발근을 유도하였다. 이러한 결과는 옥신에 장기간 노출될 경우 오히려 발근을 억제하는 요인으로 작용할 수 있음을 보여주는 것이다. 따라서 만년콩의 경우 신초의 발근에는 고농도의 IBA 용액에 침지처리한 후 성장조절제가 없는 WP 배지에 계대배양하는 것이 더 효과적일 것으로 생각되었다.

Table 7. Effects of soaking treatments on rooting from shoots *in vitro* induced from nodes of *E. japonica*

Growth regulator(mg/L)		Rooting
IBA	100	+ ¹
	500	+++

1. + : slight, ++: moderate, +++: good



Figure 7. Plantlets grown for 10 weeks from shoots of *E. japonica* soaked into 500mg/L IBA solution. The bar indicates 3cm.

요약

본 연구는 멸종위기야생식물 1급에 해당하는 만년콩(*Euchresta japonica* Benth)의 대량증식을 위하여 무균발아, 캘러스 유도 및 신초유도, 발근 등에 효과적인 식물생장조절물질의 종류와 농도를 규명하고, 현지내외 보전 및 자생지 복원의 기초를 마련하고자 하였다.

만년콩의 종자는 상온 보관에서는 76.1%, 4℃ 냉장 보관에서는 86.4%의 발아율로 10% 차이를 보였다. 캘러스 형성은 MS 배지보다 WP 배지에서 양호하였다. 특히, WP 배지에 NAA 1mg/L와 BA 0.5, 1, 2mg/L, NAA 2mg/L 와 BA 0.5, 1mg/L, NAA 5mg/L와 BA 0.5mg/L의 호르몬을 처리한 경우에 캘러스가 양호하게 형성되었다. 반면에 WP 배지에 2,4-D와 BA를 혼용처리하였을 경우에는 캘러스가 느리게 형성되었다. 캘러스는 호르몬을 처리한 대부분 배지에서 형성되었으나 신초 형성이나 뿌리 분화는 나타나지 않았다. 줄기의 액아로부터 신초를 유도한 결과, NAA 0.1mg/L와 BA 1mg/L, GA 0.1mg/L와 BA 1mg/L, GA 0.5mg/L와 BA 2mg/L의 배지에서 신초가 잘 형성되었다. 유도된 신초로부터 뿌리의 형성은 IBA 5mg/L에서 이루어졌으며, 고농도의 IBA인 500mg/L에 1분간 침지시킨 후 생장조절제가 없는 WP 배지에 계대 배양을 한 경우에 뿌리가 잘 형성되었다.

만년콩의 경우 다량의 신초 증식을 위해서는 GA₃와 BA를 처리하여 줄기의 액아에서 신초를 유도하는 것이 유용할 것으로 생각된다. 그리고 신초의 발근에는 고농도의 IBA 용액에 침지 처리한 후 생장조절제가 없는 WP 배지에 계대 배양하는 것이 효과적인 것으로 보인다. 앞으로 기내증식을 통해 다량의 신초를 증식, 발근 유도하여 얻은 개체의 적정한 순화 조건을 확립하고, 나아가 자생지 복원에 대한 연구를 수행하고자 한다.

참고문헌

- Agarwal B, U Singh and M Banerjee. 1992. *In vitro* clonal propagation of tea(*Camellia sinensis* L.O. Kuntze). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 30 : 1-5
- Barghchi M. 1988. Micropropagation of *Alnus cordata* Loisel. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 15: 233-244.
- Beena MR and KP Martin. 2003. *In vitro* propagation of the rare medicinal plant *Ceropegia candelabrum* L. through somatic embryogenesis. In Vitro Cell Dev. Biol-Plant. 39: 510-513
- Bonga JM. 1987. Clonal propagation of mature tree : problems and possible solutions. In : JM Bonga and Don J Durzan (eds.), Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol 1. Martinus Nijhoff Pub, Leiden. pp. 249-271
- Chen UC, CN Hsia, MS Yeh, DC Agrawal and HS Rsay. 2006. *In vitro* micropropagation and *ex vitro* acclimation of *Bulpleurum kaoian* endangered medicinal plant native to Taiwan, In Vitro Cell Dev. Biol-Plant. 42: 128-133
- Cheong EJ and CS Kim. 2001. Study on the various Condition of *in vitro* culture for mass-propagation of *Prunus yedoensis* Matsumura. Jour. Korean For. Soc. 90(2): 184-189.
- Dodd. A. W. 1994. Tissue culture of tea(*Camellia sinensis* (L.) O. kuntze). A review. Int. J. Trop. Agric. 12 : 212-247.
- Faisal M, N Ahmad and M Anis. 2007. An efficient micropropagation system for *Tylophora indica*: an endangered, medicinally important plant. Plant Biotechnol. Rep. 1: 155-161
- Gomes GAC, R Paiva, PDO Paiva and EJAD Santiago. 2003. Plant regeneration from callus culture of *Maclura tinctoria*, an endangered woody species. In Vitro Cell Dev. Biol-Plant. 39: 293-295
- Gupta PK and AF Mascarenhas. 1987. *Eucalyptus*. In : JM Bonga and Don J

- Durzan (eds.), Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol 1. Martinus Nijhoff Pub, Leiden. pp. 385-399
- Letham, D.S. 1963. Zeatin a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. Life Sci. 8: 569-578.
- Lloyd G.B. and H. McCown. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. Comb. Proc Intl. Plant Prop. Soc. 30 : 421-427
- Lubrano L. 1992. Micropropagation of poplars (*Populus* spp.). In : YPS Bajaz (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry 18. Springer-Verlag Press. New York. 151-178
- Martin KP. 2003. Rapid *in vitro* multiplication and *ex vitro* rooting of *Rotula aquatica* Lour., a rare rheophytic woody medicinal plant. Plant Cell Rep. 21: 415-420
- Meier-Dinkel A. 1992. Micropropagation of birches (*Betula* spp.). In : YPS Bajaz (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry 18. Springer-Verlag Press. New York. 40-81
- Murashige T and F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-497
- Negash L. 2002. Successful vegetative propagation techniques for the threatened african pencil cedar (*Juniperus procera* Hochst. ex Endl.). Forest Ecol. Manag. 161: 53-64
- Oliveira MM and MS Pais. 1991. Plant regeneration from protoplasts of long-term callus culture of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayward (Kiwifruit). Plant Cell Reports 9: 643-646
- Rai VR. 2002. Rapid clonal propagation of *Nothapodytes foetida* (Wight) Sleumer - a threatened medicinal tree. In Vitro Cell Dev. Biol-Plant. 38: 347-351
- Ramírez-Malagón R, A Borodanenko, JL Barrera-Guerra and N Ochoa Alejo. 1997. Micropropagation for Fraser photinia (*Photinia ×fraseri*). Plant cell

- tiss. Org. Cult. 48 : 219-222
- Siril EA and U Dhar. 1997. Micropropagation of mature Chinese tallow tree(*Sapium sebiferum* Roxb.). Plant Cell Rep. 16 : 637-640
- Thorpe TA, JS Harry and PP Kumar. 1991. Application of micropropagation to forestry. In : PC Debergh and RH Zimmerman (eds.), Micropropagation, Kluwer Academic Pub, Norwell, MA. pp. 311-336
- Zhang Yj, XJ Mu, QG Cai, YL Ahou and YQ Zhou. 1995. Plantlet regeneration from leaf protoplasts in seedling of *Actinidia eriantha* Benth. Acta Botanica Sinica 37: 48-52
- 김찬수, 고정군, 조리명. 1993. 왕벚나무(*Prunus yedoensis* Matsumura)의 영양아를 이용한 식물체 대량증식에 미치는 배지, 식물생장조절물질 및 암처리의 효과. 식물조직배양학회 20(4): 213-219
- 김철수. 2006. 제주도내 멸종위기야생식물의 분포와 식생. 제주대학교 박사학위논문. pp.139
- 김효진, 조한직, 김이엽, 김무열, 박학봉. 2007. 섬시호(*Bupleurum latissimum* Nakai.)의 조직배양을 통한 대량생산. 한국자원식물학회 20(4): 367-374
- 문홍규, 석진영, 권영진, 손성호. 1999. 액아배양에 의한 희귀수종 미선나무의 기내번식. 식물조직배양학회 26(2): 133-136
- 문홍규, 석진영, 김선창. 1997. 희귀 수종 산개나리의 기내 번식. 한국임학회 86. 4: 430-434
- 박소영, 안진권, 이위영. 2003. 왕자귀나무의 뿌리체편에서 교빈도의 식물체 재분화. 한국임학회 92(6): 626-631
- 이유미, 이원렬. 1996. 희귀 및 멸종 위기 식물도감. 산림청 임업연구원 중부임업시험장. 서울. pp140
- 이창복, 2003. 원색대한식물도감. 향문사. 서울. pp. 588
- 이창복. 1985. 한라산의 특산 및 희귀식물. 서울대학교 농학연구 10: 1-16
- 장진성, 이홍수, 박태운, 김휘. 2005. IUCN 적색목록 기준에 의한 환경부 멸종위기 야생식물에 대한 평가. 한국생태학회지 28(5): 305-320
- 제주도 · 제주발전연구원 1999. 제주도에 자생하는 멸종위기 · 보호야생식물. 나우

- 인쇄출판사. 제주도. pp. 145
- 최성진, 윤병성, 김준철, 강원희. 누룩치(*Pleurospermum camtschaticum* Hoffm.)의 조직배양에 의한 식물체 재분화. 강원대학교 농업과학연구소 논문집. 17 : 9-15
- 한무석, 문홍규, 강영제, 김원우, 강병세, 변광옥. 2004. 멸종위기식물 피뿌리풀의 기내증식. 식물생명공학회 31(1): 31-35
- 현진오. 2001. 한반도 보호식물의 선정과 사례연구. 순천향대학교 박사학위논문. pp. 288
- 환경부. 2005. 야생동식물보호법. 환경부. 과천. pp. 284



감사의 글

오랜만에 경험한 대학생활은 새롭게 다가오더군요. 학부와는 다른 대학원 생활을 거치면서 부족하나마 이 논문을 완성하게 되었습니다. 일일이 찾아가 감사의 마음을 전해야 하지만 지면으로나마 인사를 드리고자 합니다.

먼저 부족한 저를 지도해주시느라 고생하신 고석찬 교수님께 진심으로 감사드립니다. 바쁘신 와중에도 논문을 완성 할 수 있게 도와주신 김문홍 교수님과 한라생태환경연구부(한라수목원) 김철수 부장님께 감사드립니다. 또한 오덕철교수님, 이화자교수님, 김세재교수님, 이선령교수님, 김명숙교수님께 감사드립니다. 또한 같이 수업을 받았던 대학원생들과 일일이 이름을 나열하지는 못하지만 각 실험실의 여러 선배님, 동기들, 그리고 후배님들에게도 감사드립니다. 그리고 생화학 실험실의 오순자 선생님께 감사드리고 많은 시간을 함께 하진 못한 종우, 정문, 슬아, 미래, 종현, 선우, 그리고 세영이에게 감사의 마음을 전합니다.

또한 공부할 수 있도록 도와주신 한라수목원의 정세호 과장님을 비롯한 한재택 주사님, 박정훈 주사님, 신창훈 연구사님, 김경중 주사님, 김양훈 주사님께도 감사드립니다. 또한, 이창흠 과장님, 고정균 연구사님, 박성욱 주사님, 고윤정주사님, 변희수주사님, 오장근 연구원님을 비롯한 한라산 연구과 식구들에게도 감사드립니다. 그리고 조언을 아끼지 않았던 김대신 연구사님과 김현철 연구원님, 김수경님, 김영림님, 한윤희님, 조직배양실의 신재범님, 김봉진님에게 감사드리며, 응원해주신 한라수목원 식구들에게도 감사드립니다. 또한, 저를 아껴주고 항상 걱정해주는 제 친구들과 저를 아는 지인들께도 감사드립니다.

마지막으로 공부한다고 걱정하셨던 부모님과 신경 못 썼지만 잘 지내준 동생들 영기, 연의와 서울에서 잘 지내는 동생 연주와 제부에게도 진심으로 감사의 인사를 드립니다.

이외에도 보이지 않게 저에게 많은 도움을 주신 모든 분들께 감사드립니다.