

어젠다코드	3 - 12 - 35		수행시기	전반기 (완결)	
기술분야코드	V2	기술유형코드	S01	작목구분코드	VC-06-1401,1499
과제종류	기관고유		과제번호	LP001875	
과제명	산채 우량품종 육성 연구				
과제책임자	성명		직급	소속기관 및 부서	
	김세원		농업연구사	강원도원 산채연구소	
연구기간	2017 ~ 2020(4년)		참여연구기관	-	
세부과제명			부서	세부책임자	연구기간
4) 산채 신품종 대량증식 기술 개발			산채연구소	박기덕	'17~'20
색인용어	곰취, 조직배양, 대량증식, 순화				

ABSTRACT

This study was carried out to establish a method of mass propagation of Dumehyang (*L. fischeri* variety grown in WVRC in Pyeongchang, Korea) and *Kalopanax pictus* (a line collected from Cheorwon, Korea) without thorns through plant tissue culture technology. *Kalopanax pictus* is one of the most popular vegetables, but its conventional reproduction method such as rooting cutting has some limits including dissemination of root rot disease. In addition, *Ligularia fischeri* has very low propagation efficiency because it multiplies through division. So, the development of a tissue culture method through the generation of growth points and we tried to investigate the effect of explant type and medium composition on somatic embryogenesis and shoot generation from Japanese Angelica for establishment of in vitro mass propagation system. As a result of treatment with a growth regulator for selection of multiple shoot inducing medium of Gomchwi Dumehyang, 4.7 ± 1.0 multiple shoots were induced in MS1 + sucrose 2% + TDZ 0.5 ppm medium. MS medium to which 0.5ppm of 2,4-D was added generated the most roots. The contamination rate was the lowest when the growth point was immersed in a 1.5% NaOCl solution for 15 minutes. Plant differentiation was the most frequent. The composition of the medium for purifying tissue cultured seedlings of 'Dumehyang' has the highest survival rate of 73.3% with 80% perlite + 20% peat moss, and has excellent plant height, length, and root length development. When comparing the growth according to the type and concentration of the growth inhibitory agent in 'Dumehyang' tissue cultured seedlings, the survival rate was the highest at 83.3% with flurprimidol 0.1mg/L treatment. *Kalopanax pictus* had a low survival rate.

1 연구목표

강원도의 산나물은 2018년 기준 생산액 1,735억원으로 전국의 36.7%를 차지하고 있다. 이에 반해 강원도에서 재배되는 산나물의 대부분은 재래종으로 널리 보급되고 있는 품종은 찾기 어려운 실정이다.

이에 산채연구소에서는 '09년 내병 다수성 곱취 품종인 “진향”을 등록하였고, '17년 부드러운 맛과 다수성이 특징인 곱취 품종 “두메향”을 출원하였으나, 분주를 통한 증식이 이루어져 효율이 매우 낮아 종묘 보급체계 구성을 위한 기본 수량을 갖추는데 긴 시간이 소요되어 농가 보급 확산에 걸림돌이 되고 있다. 또한 곱취와 더불어 대표적인 강원도 대표 산나물 중 하나인 음나무는 강원도 농업기술원 자체 육성 품종이 없으며, 주로 재래종 또는 산림청 개발 품종인 무가시 음나무 ‘청송’이 농가에 보급되는 실정이다. 음나무 재배면적은 전국적으로 '15년 기준 500~600ha 이상으로 추정되고 있으며 이중 강원지역은 '15년 240ha에서 '18년 444ha로 재배면적이 증가하고 있어 강원도 기후에 맞는 자체 육성 품종의 보급에 대한 요구가 날로 높아지고 있다. 따라서 품종 개발 및 보급을 위해 효율적인 대량증식 기술이 필요한 실정이다. 이에 강원도 기후에 적합한 개발 품종 곱취 ‘두메향’과 우량계통 무가시 음나무를 대량으로 증식하는 방법을 최종 확립코자 하였다.

2 재료 및 방법

〈제1세부과제: 산채 신품종 대량증식 기술 개발〉

(시험 1) 자체 육성 품종 곱취 ‘진향’, ‘두메향’의 식물체 재분화 조건 구명

본 연구는 2017년도에 강원도농업기술원 산채연구소내 조직배양실에서 수행되었다. 본 연구에 사용된 공시 품종은 산채연구소 자체 육성 품종인 ‘진향’, ‘두메향’ 이었다. 두 품종의 신초 잎 및 엽병에서 5mm×5mm 크기의 절편을 분리하여 식물호르몬이 첨가된 MS 배지에 치상하여 6주간 배양하였다. 본 실험에 사용된 식물호르몬은 benzyladenine (BA), N-(2-Chloro-4 pyridyl)-N'-phenylurea (CPPU) 및 thidiazuron (TDZ), 6-furfurylaminopurine (kinetin)이며, 종류 별로 0.1 mg·L⁻¹의 농도로 처리하였으며, 각 처리 별로 indole acetic acid (IAA)를 0.5, 1, 2, 4 mg·L⁻¹의 농도로 혼합 처리하였다. 주요 조사 항목으로는 잎 과 엽병 절편 별 캘러스 형성도, 발근율, 신초 발생 여부 등을 조사하였다.

(시험 2) 자체 신품종 성장점 배양을 위한 유식물체 분화 배지 선발

본 연구는 2018년도에 강원도농업기술원 산채연구소내 조직배양실에서 수행되었다. 본 연구에 사용된 공시 품종은 산채연구소 자체 육성 품종인 ‘두메향’ 이었다. 성장점을 분리하여 식물호르몬이 첨가된 MS 배지와 N6 배지에 치상하여 6주간 배양하였다. 본 실험에 사용된 식물호르몬은 benzyladenine (BA), N-(2-Chloro-4 pyridyl)-N'-phenylurea (CPPU) 및 thidiazuron (TDZ), 6-furfurylaminopurine (kinetin)이며, 종류 별로 0.5, 1, 1.5 ppm 의 농도로 처리하였다. 이후 발생한 신초의 발근을 유도하기 위하여 식물호르몬이 첨가된 MS 배지에 치상하여 12주간 배양하였다. 발근 유도 배지에 첨가한 식물호르몬은 Naphthaleneacetic acid (NAA), indole acetic acid (IAA)이며 종류별로 0.5, 1, 1.5 ppm 의 농도로 처리하였다. 주요 조사 항목으로는 성장점의 고사율과 발근율, 발근 수 등을 조사하였다.

(시험 3) 자체 신품종 성장점 소독 조건 구명

본 연구는 2019년도에 강원도농업기술원 산채연구소내 조직배양실에서 수행되었다. 본 연구에 사용된

공시 품종은 산채연구소 자체 육성 품종인 ‘두메향’ 이었다. 식물체 기부에서 생장점을 분리하여 흐르는 수돗물에 15분간 수세한 후 70% EtOH에서 30초간 소독과 증류수 수세를 3회 반복한 뒤 식물소독제에 침지 소독하였다. 본 시험에 사용된 식물소독제는 NaOCl, Ca(ClO)₂, PPM(Plant Preservative Mixture, Plant Cell Technology, USA)이며, 처리농도는 1, 1.5, 2%, 침지시간은 15, 30, 60분으로 처리하였다. 전 처리가 완료된 시료는 클린벤치 내에서 멸균된 증류수로 3회 세척하고 후 thidiazuron (TDZ) 0.5ppm 이 첨가된 MS 배지에 치상하여 광주기 16/8시간(광/압), 광도 60±0.2μmol/m²/s, 온도 25±2℃로 유지되는 조건에서 6주간 배양하였다. 실험에 사용한 모든 배지는 121℃, 1.5기압으로 15분간 멸균하였고 배양용기(100×40 mm)에 분주하여 사용하였다. 주요 조사 항목으로는 생장점의 고사율과 신초분화율, 신초 수 등을 조사하였다.

(시험 4) 자체 신품종 조직배양묘 기외 순화 적정 배지 선발

본 연구는 2020년도에 강원도농업기술원 산채연구소내 유리온실에서 수행되었다. 뿌리와 신초가 정상적으로 발달한 ‘두메향’ 기내 식물체의 기외 순화에 적합한 배지의 물리조성을 구명하기 위하여 혼합 용토를 4수준으로 처리를 하였다. 식물체를 정식하기 전에 배지를 흐르는 물에 씻어내 제거한 뒤 혼합 용토에 정식하였다. 혼합 용토는 피트모스20%+펠라이트80%, 피트모스50%+펠라이트50%, 피트모스80%+펠라이트20%, 피트모스100%로 처리하였으며, 흑색 70% 차광막으로 차광하고 투명비닐로 60cm 높이의 터널을 만들고 내부에 수조를 설치하여 습도 및 적정 온도를 유지하였다. 관수는 4주차까지는 1일 100ml spray 관수, 4주 ~ 8주차는 2일 100ml spray 관수 하였다. 순화된 식물체는 포트에 심어 20주씩 3반복 조건에서 재배하였으며 정식 후 8주간 공극률, 생존률 등을 조사하였다.

(시험 5) 산채 조직배양묘 생장억제제 처리효과 구명

본 연구는 2020년도에 강원도농업기술원 산채연구소내 조직배양실에서 수행되었다. 본 연구에 사용된 공시 품종은 ‘두메향’, 무가시 음나무(철원수집종) 였다. 뿌리와 신초가 정상적으로 발달한 ‘두메향’, 철원수집종 무가시 음나무의 기내 식물체를 기외 순화 전 단계 배지에 생장억제제를 첨가한 뒤 4주간 기내 배양하였다. 본 실험에 사용된 생장억제제는 PEG, flur primi dol 이며 농도는 PEG 5, 10, 15, 20g/l flur primidol은 0.1, 0.5, 1, 1.5mg/l로 처리 하였다. 이후 유리 온실에 흑색 70% 차광막으로 차광하고 투명비닐로 60cm 높이의 터널을 만들고 내부에 수조를 설치하여 습도 및 적정 온도를 유지한 뒤 기외 순화 하였다. 관수는 4주차까지는 1일 100ml spray 관수, 4주~8주차는 2일 100ml spray 관수 하였다. 식물체는 포트에 심어 20주씩 3반복 조건에서 재배하였으며 정식 후 8주간 생체중, 생존률 등을 조사하였다.

(시험 6) 무가시 음나무 유식물체 분화 배지 선발

본 연구는 2017년도에 강원도농업기술원 산채연구소내 조직배양실에서 수행되었다. 본 연구에 사용된 공시 품종은 무가시 음나무(철원수집종) 이었다. 공시 품종의 신초 잎 및 엽병에서 5mm×5mm 크기의 절편을 분리하여 식물호르몬이 첨가된 MS 배지에 치상하여 기내 배양하였다. 본 실험에 사용된 식물호르몬은 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D), thidiazuron(TDZ) 이며, 종류 별로 0.1, 0.15,

0.2, 1 ppm 의 농도로 처리하였다. 이후 체세포배 발생을 유도하기 위하여 charcoal 0.04%가 첨가된 MS 1/2배지에 치상하여 배양하였다. 캘러스 형성 및 비대 등을 조사하였다.

(시험 7) 무가시 으나무 조직배양묘 순화 배지 선발

본 연구는 2019년도에 강원도농업기술원 산채연구소내 유리온실에서 수행되었다. 뿌리와 신초가 정상적으로 발달한 무가시 으나무(철원수집종) 기내 식물체의 기외 순화에 적합한 배지 조성을 구명하기 위하여 혼합 용토를 4수준으로 처리를 하였다. 식물체를 정식하기 전에 배지를 흐르는 물에 씻어내 제거한 뒤 혼합 용토에 정식하였다. 혼합 용토는 피트모스50%+상토50%, 펄라이트50%+상토50%, 버미큘라이트50%+상토50%, 상토(상토2호, 코코피트 67%, 피트모스 17%, 제오라이트 5%, 펄라이트 10%, 기타 1%, pH 5.5, 1.0 dS/m)100%로 처리하였으며, 흑색 70% 차광막으로 차광하고 투명비닐로 60cm 높이의 터널을 만들고 내부에 수조를 설치하여 습도 및 적정 온도를 유지하였다. 식물체는 포트에 심어 20주씩 3반복 조건에서 재배하였으며 정식 후 14주간 공극률, 생존률 등을 조사하였다.

3 결과 및 고찰

<제1세부과제: 산채 신제품 대량증식 기술 개발>

(시험 1) 자체 육성 품종 곱취 ‘진향’, ‘두메향’의 식물체 재분화 조건 구명

자체 육성 품종 곱취 ‘진향’, ‘두메향’ 절편의 식물체 재분화 조건을 구명하기 위하여 신초 잎 및 엽병에서 절편을 분리하여 benzyladenine (BA), N-(2-Chloro-4 pyridyl) -N’ -phenylurea (CPPU) 및 thidiazuron (TDZ), 6-furfurylaminopurine (kinetin)이 첨가된 MS 배지에 indole acetic acid (IAA)를 혼합하여 4주간 배양 하였다.

표 1. 호르몬 복합처리에 따른 잎 및 엽병 발근률

호르몬처리 (mg/l)	진향				두메향				
	캘러스 형성도 ^y		발근율(%)		캘러스 형성도 ^y		발근율(%)		
	잎	엽병	잎	엽병	잎	엽병	잎	엽병	
IAA 0.5	BA 0.1	2	3	0	0	2	3	0	0
	4-CPPU 0.1	2	3	0	0	2	3	0	0
	TDZ 0.1	1	2	0	0	1	1	0	0
	kinetin 0.1	1	3	0	0	1	3	0	0
IAA 1	BA 0.1	2	3	0	0	2	3	0	0
	4-CPPU 0.1	2	3	0	0	2	2	0	12
	TDZ 0.1	2	2	0	0	2	2	0	0
	kinetin 0.1	2	3	0	0	1	3	0	0

호르몬처리 (mg/l)	진향				두메향				
	캘러스 형성도 ^y		발근율(%)		캘러스 형성도 ^y		발근율(%)		
	잎	엽병	잎	엽병	잎	엽병	잎	엽병	
IAA 2	BA 0.1	3	3	0	0	2	3	0	0
	4-CPPU 0.1	3	4	0	16	3	3	16	56
	TDZ 0.1	2	2	0	0	2	2	0	0
	kinetin 0.1	2	3	0	4	2	3	0	0
IAA 4	BA 0.1	2	3	0	0	2	3	0	0
	4-CPPU 0.1	3	4	20	0	3	4	0	0
	TDZ 0.1	2	2	0	0	1	1	0	0
	kinetin 0.1	2	3	28	0	2	3	0	0

y 캘러스 형성도: 1(0%) - 2(25%) - 3(50%) - 4(75%이하) - 5(100%)

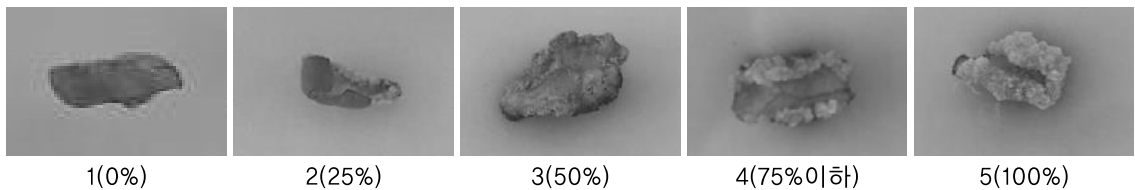


그림 1. 캘러스 형성도에 따른 절편의 모양

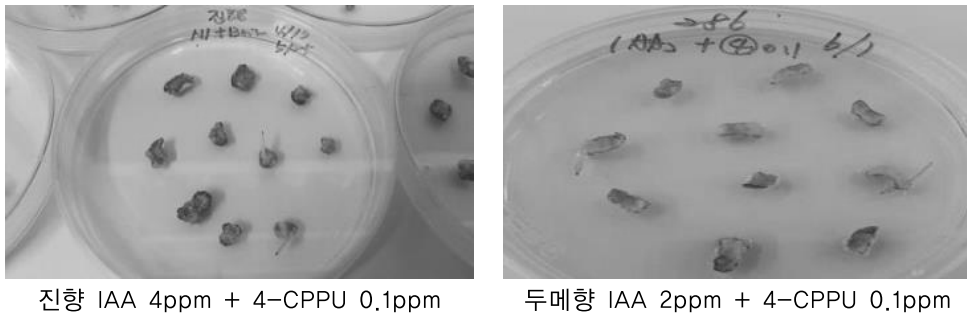


그림 2. 발근 캘러스

진향과 두메향은 잎, 엽병을 포함한 전 처리구에서 캘러스 형성이 확인 되었다. 진향은 IAA 4ppm + kinetin 0.1ppm과 IAA 4ppm + 4-CPPU 0.1ppm 조건의 잎에서, 두메향은 IAA 2ppm + 4-CPPU 0.1ppm 조건의 엽병에서 캘러스 형성도가 높았으며 발근도 확인되었다.(표 1, 그림 1) 그러나 발근이 이루어진 배지에서도 싹은 유도되지 않았다.(그림 2) 일반적으로 식물 기관의 절편을 이용한 조직 배양은 싹이 유도된 이후에 발근이 이루어지므로 발근이 먼저 될 경우 식물체의 재분화가 어렵다. 따라서 식물체 재분화를 위한 성장점 조직배양이 필요할 것으로 판단되었다.

(시험 2) 자체 신품종 성장점 배양을 위한 유식물체 분화 배지 선발

산채연구소 자체 육성 품종 중 농가 선호도가 높은 품종인 ‘두메향’의 성장점을 분리하여 식물호르몬이 첨가된 MS 배지와 N6 배지에 치상하여 기내 배양하였다. 신탄를 유도하기 위하여 각 배지에 식물호르몬 benzyladenine (BA), N-(2-Chloro-4 pyridyl)-N'-phenylurea(CPPU) 및 thidiazuron(TDZ), 6-furfurylaminopurine (kinetin)을 첨가하였다. 이후 유도된 신탄를 대상으로 발근을 유도하기 위하여 식물호르몬이 첨가된 MS 배지에서 배양하였다. 발근 유도 배지에는 식물호르몬은 Naphthaleneacetic acid (NAA), indole acetic acid (IAA) 첨가하였다.

표 2. 품취 두메향 다신탄 유도배지 선발

배지	호르몬	농도 (ppm)	고사 (%)	신탄분화율 (%)	신탄수 (개/주)	
N6	TDZ	0.5	0	93.3	1.2±0.7	
		1.0	26.7	53.3	0.9±0.7	
		1.5	0	73.3	1.8±1.3	
	CPPU	0.5	6.7	86.7	2.1±1.0	
		1.0	0	66.7	0.9±0.8	
		1.5	40	26.7	0.4±0.5	
	BA	0.5	60	13.3	0.3±0.5	
		1.0	20	53.3	1.4±1.3	
		1.5	46.7	20.0	0.4±0.5	
	kinetin	0.5	0	60.0	0.7±0.6	
		1.0	46.7	33.3	0.6±0.5	
		1.5	13.3	80.0	1.2±0.7	
	MS	TDZ	0.5	0	93.3	1.9±0.9
			1.0	6.7	86.7	2.3±1.0
			1.5	6.7	93.3	4.7±1.0
CPPU		0.5	6.7	86.7	1.7±1.1	
		1.0	26.7	66.7	0.9±0.5	
		1.5	0	86.7	1.3±0.8	
BA		0.5	66.7	20.0	0.6±0.5	
		1.0	53.3	20.0	0.6±0.8	
		1.5	0	53.3	0.9±1.0	
kinetin		0.5	40.0	40.0	0.7±0.5	
		1.0	26.7	46.7	0.9±0.8	
		1.5	6.7	73.3	1.0±0.7	

표 3. 곰취 두메향 발근배지 선발

배지	호르몬	농도(ppm)	발근율(%)	발근수(개/주)	고사(%)
	2,4-D	0.5	47.6	5.7±2.3	4.8
		1.0	14.2	4.7±0.6	4.8
		1.5	19.0	4.5±1.3	0
MS	NAA	0.5	14.3	4.7±1.5	4.8
		1.0	23.8	6.6±3.9	0
		1.5	19.0	5.0±2.6	4.8
	IAA	0.5	19.0	4.0±0.8	9.5
		1.0	23.8	2.4±0.5	4.8
		1.5	33.3	3.6±1.7	0

표 4. 두메향 최종 발근배지 선발

소독제	기간	발근수(개)	발근율(%)	고사율(%)
2,4-D 0.5ppm	12주차	5.1	74.0	26.0
NAA 1.0ppm	12주차	4.9	71.0	29.0

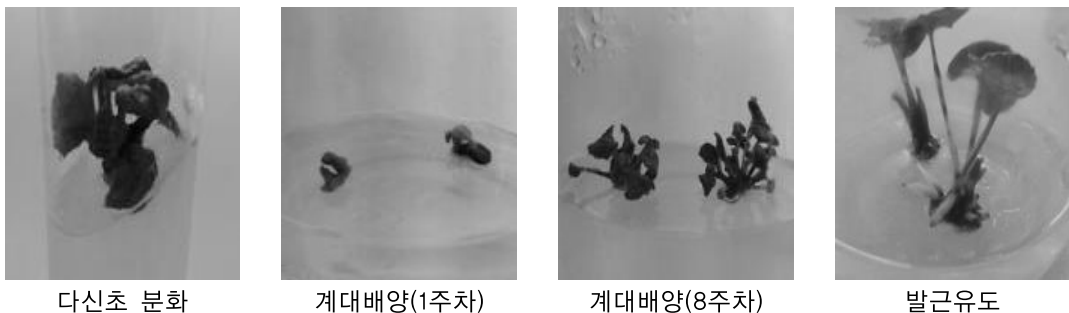


그림 3. 곰취 두메향 성장점 배양

곰취 두메향의 다신초 유도배지 선발을 위한 성장조절제 처리결과 MS1 + sucrose 2% + TDZ 0.5 ppm 배지에서 4.7±1.0 개의 다신초가 유도되어 가장 많은 신초 분화를 나타내었다.(표 2) 발근 배지 선발을 위한 Auxin 류 성장조절제 처리 결과 MS1 + 2,4-D 0.5ppm 처리 배지의 발근률이 47.6%로 가장 높게 나타났으며, 발근갯수는 MS1 + NAA 1.0 ppm 처리에서 6.6±3.9 로 가장 많이 발근되었다.(표 3) 이러한 결과로 볼 때 곰취 두메향의 다신초 유도 및 기내분주용 배지는 MS1 + sucrose 2% + TDZ 0.05 ppm 배지가 적합하며, 발근 배지는 발근률이 가장 높은 MS1배지 + 2,4-D 0.5ppm 배지와 주당 발근개수가 가장 높은 MS1 + NAA 1.0ppm 배지 중에서 선발하기로 하였다. 이후 12주차까지 발근율을 조사한 결과 두메향의 배지별 발근율은 2,4-D 0.5ppm 첨가 MS 배지에서 6주차에 47.6%로 높게 나타났으나 12주차에는 비슷한 수준이었다.(표 3,4) 따라서 증식 기간을 감안하여 초기 발근이 빠른 2,4-D 0.5ppm 첨가한 MS 배지를 발근배지로 최종 선발하였다.

(시험 3) 자체 신품종 성장점 소독 조건 구명

곰취의 성장점은 기부 부근에 측아에 위치해 있으므로 토양에 닿아있어 시료가 오염되기 쉽다. 성장점 배양을 위해 측아를 일반적인 조직배양 시료의 소독조건인 흐르는 수돗물에 15분간 수세한 후 70% EtOH에서 30초간 소독과 증류수 수세를 3회 반복한 뒤 NaOCl 1% 용액에 5~10분간 침지한 뒤 성장점을 채취할 경우 오염이 발생 되는 경우가 많았다. 따라서 오염을 저감을 위한 곰취 측아의 소독 조건을 구명하기 위하여 식물소독제 및 농도, 침지시간을 각기 달리하여 소독 후 고사율과 신초분화율, 신초 수 등을 조사하였다. 식물소독제는 3종류로 NaOCl, Ca(ClO)₂, PPM(Plant Preservative Mixture, Plant Cell Technology, USA)를 사용하였다.

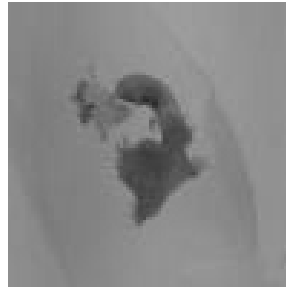
표 5. 식물소독제 종류 및 농도별 오염율 변화

소독제	농도(%)	침지시간 (분)	신초 출현일	신초분화율 (%)	최초 오염일	오염율 (%)	엽수 (개)
NaOCl	1	15	10.4	63.3	3.8	36.7	4.8
		30	13.3	56.7	3.8	26.7	4.8
		60	12.5	6.7	0	0	2.5
	1.5	15	12.3	66.7	4.1	23.3	4.6
		30	13.1	46.7	5.0	13.3	4.4
		60	12.5	6.7	0.0	0	2.0
	2	15	12.9	26.7	5.0	10.0	3.9
		30	0	0	0	0	0
		60	0	0	0	0	0
Ca(ClO) ₂	1	15	10.6	56.7	3.8	43.3	4.7
		30	12.9	50.0	3.8	30.0	4.8
		60	12.0	20.0	0	0	3.5
	1.5	15	10.7	60.0	3.9	26.7	4.1
		30	12.5	40.0	4.7	23.3	4.5
		60	12.5	13.3	2.0	6.7	2.5
	2	15	13.6	33.3	4.3	10.0	4.4
		30	0	0	0	0	0
		60	0	0	0	0	0
PPM	1	15	0	0	3.0	100	0
		30	0	0	3.0	100	0
		60	0	0	3.0	100	0
	1.5	15	0	0	3.0	100	0
		30	0	0	3.0	100	0
		60	0	0	3.0	100	0

소독제	농도(%)	침치시간 (분)	신초 출현일	신초분화율 (%)	최초 오염일	오염율 (%)	엽수 (개)
		15	6.0	6.7	3.0	93.3	1.3
	2	30	0	0	3.0	100	0
		60	0	0	3.0	100	0



적정 소독 식물체



장시간 침지에 의한 기형엽



고농도 소독에 의한 엽백화

그림 4. 두메향 생장점 소독제 농도 및 침지시간별 영향

식물소독제 종류 및 농도별 오염을 발생을 비교한 결과, NaOCl 과 Ca(ClO)₂은 농도가 높을수록, 침지시간이 길수록 생장점의 오염율은 낮아졌으나 신초분화율도 함께 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 장시간 침지나 식물소독제의 농도가 높아질 경우 기형엽이나 엽백화 현상이 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 이는 생장점이 침지시간이 길어지거나 고농도 소독시 장애를 입어 식물체 분화에도 영향을 미치는 것으로 보여졌다.(그림 4) 신초분화율은 1.5% 농도 15분 침지에서 NaOCl 66.7%, Ca(ClO)₂60.0%로 가장 높았으며, PPM은 농도 및 침지시간에 상관없이 신초분화가 거의 이루어지지 않았다.(표 5) 따라서 NaOCl 1.5% 용액에 15분간 침지하는 것이 가장 적합할 것으로 판단되었다.

(시험 4) 자체 신품종 조직배양묘 기의 순화 적정 배지 선별

‘두메향’ 기내 식물체의 기의 순화에 적합한 배지의 물리조성을 구명하기 위하여 혼합 용토를 피트모스를 바탕으로 펄라이트의 비율을 달리하여 혼합한 뒤 순화배지를 만들었다. 이후 유리온실에서 신초와 뿌리가 발달된 식물체를 배지별로 포트에 심어 20주씩 3반복 조건에서 재배하였다.

표 6. 순화배지별 생육 및 생존율

배지	초장 (cm)	엽장 (cm)	엽수 (개)	경경 (mm)	근장 (cm)	근경 (mm)	공극률 (%)	pH	EC	생존률 (%)
펄라이트80%+피트모스20%	6.5	2.3	2.9	1.0	11.4	5.1	68.5	5.8	0.5	73.3
펄라이트50%+피트모스50%	4.1	1.7	2.6	0.9	10.2	5.6	48.6	5.5	0.5	63.3
펄라이트20%+피트모스80%	2.7	0.9	3.4	0.6	7.1	4.8	40.7	5.3	0.5	60
피트모스100%	-	-	-	-	5.6	5.9	38.6	5.4	0.5	46.7

※ 관수조건 ~4주: 1일 100ml spray 관수, 4주 ~ 8주차: 2일 100ml spray관수

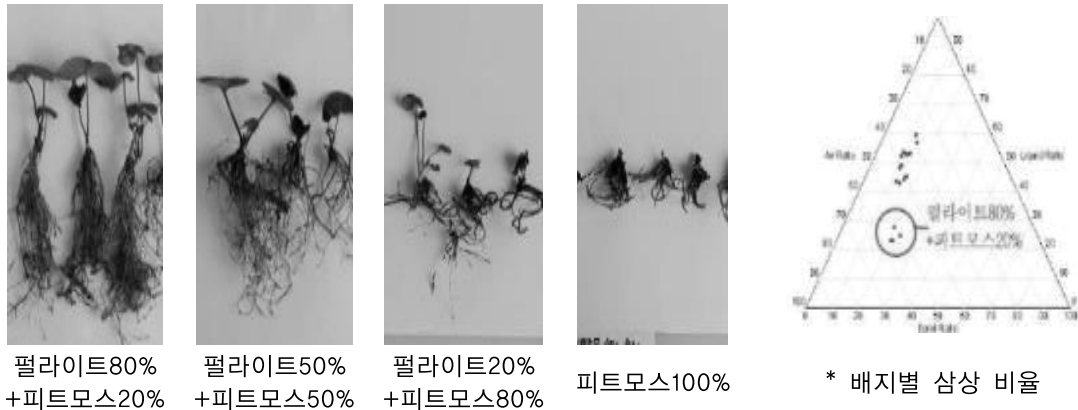


그림 5. 순화배지별 생육 및 공극률 비교

‘두메향’ 조직배양묘 순화용 배지조성은 펄라이트80%+피트모스20% 처리구의 생존률이 73.3%로 가장 높고 초장, 경경, 근장 발달도 우수한 것으로 나타났다.(표 6) 순화배지별 삼상 비율을 그래프로 나타내면 펄라이트80%+피트모스20% 처리구의 공극률이 68.5%로 다른 처리구에 비하여 가장 높게 나타났다(그림 5). 일반적인 밭 흙의 공극률이 50~60%이고 생육이 우수한 유기재배 농가의 공극률이 64%이므로(won et al., 2004) 곰취 생육에 적합한 공극률을 가진 배지에서 지상부 및 지하부 발달이 촉진되고 이것이 생존율로 이어진 것으로 판단되었다.

(시험 5) 산채 조직배양묘 성장억제제 처리효과 구명

‘두메향’, 무가시 음나무(철원수집종) 의 순화 생존율을 높이기 위한 성장억제제 처리 효과를 구명하기 위하여 기내 식물체를 기외 순화 전 단계 배지에 성장억제제를 첨가한 뒤 4주간 기내 배양하였다. 성장억제제 PEG(polyethylene glycol)과 flurprimidol 을 각각 PEG 5, 10, 15, 20g/l로 flurprimidol은 0.1, 0.5, 1, 1.5mg/l로 농도를 달리하여 처리 하였다.

표 7. PEG 농도별 ‘두메향’ 조직배양묘 생육 및 순화 생존율

성장억제제	농도(g/L)	초장(cm)	엽장(cm)	엽폭(cm)	근장(cm)	생체중(g)	생존율(%)
PEG	5	6.5	3.1	2.1	6.5	3.2	76.7
	10	6.4	2.2	1.1	5.9	3.1	40
	15	4.4	1.3	1.2	5.8	2.3	36.7
	20	3	1.2	1.1	4.8	2.2	33.3
무처리	-	6.7	3.9	2.8	6.8	3.4	73.3

표 8. flurprimidol 농도별 ‘두메향’ 조직배양묘 생육 및 순화 생존율

성장억제제	농도(mg/L)	초장(cm)	엽장(cm)	엽폭(cm)	근장(cm)	생체중(g)	생존율(%)
flurprimidol	0.1	3.7	2.7	2.0	7.4	3.5	83.3

생장억제제	농도(mg/L)	초장(cm)	엽장(cm)	엽폭(cm)	근장(cm)	생체중(g)	생존율(%)
flurprimidol	0.5	3.5	2.5	1.3	6.4	2.9	73.3
	1.0	3.2	1.2	1.4	4.9	1.8	26.7
	2.0	3	1.2	1.1	4.7	2.1	6.7
무처리	-	6.7	3.9	2.8	6.8	3.4	73.3

표 9. PEG 농도별 음나무 조직배양묘 생육 및 순화 생존율

생장억제제	농도(mg/L)	초장(cm)	엽장(cm)	엽폭(cm)	근장(cm)	생체중(g)	생존율(%)
PEG	5	6.7	3.8	4.1	7.5	3.4	36.7
	10	5.4	3.2	3.1	6.9	2.8	26.7
	15	4.4	2.8	3.4	4.2	2.5	13.3
	20	3.2	2.9	3.6	3.7	2.4	10
무처리	-	7.8	4.1	4.5	7.6	3.3	40.0

표 10. flurprimidol 농도별 음나무 조직배양묘 생육 및 순화 생존율

생장억제제	농도(mg/L)	초장(cm)	엽장(cm)	엽폭(cm)	근장(cm)	생체중(g)	생존율(%)
flurprimidol	0.1	6.4	3.8	3.7	4.2	2.8	20
	0.5	6.7	3.9	3.3	4.9	2.7	23.3
	1.0	3.2	3.1	2.9	4.1	2.6	6.7
	2.0	4.1	2.9	3.2	3.8	2.7	3.3
무처리	-	7.8	4.1	4.5	7.6	3.3	40.0



그림 6. 조직배양묘 성장억제제 처리에 따른 효과

‘두메향’ 조직배양묘의 성장억제제 종류 및 농도별 처리에 따른 생육 비교시 flurprimidol 0.1mg/L 처리에서 생존율이 83.3%로 가장 높게 나타났다. 초장, 엽장 등 무처리구에 비해 지상부의 발달이 작아진데 반해 근장이 증가하며 순화 생존율을 높인 것으로 판단되었다.(표 8, 그림 6) 음나무 조직배양묘의 성장억제제 종류 및 농도별 처리에 따른 생육 비교시 PEG(polyethylene glycol)과 flurprimidol 모든

처리구에서 무처리구에 비하여 순화 생존율이 낮았다. 순화 시 스트레스를 크게 받는 목본 배양묘의 특성상 저농도 생장억제제 처리에도 생존율이 감소한 것으로 판단되었다.(표 9, 10)

(시험 6) 무가시 음나무 유식물체 분화 배지 선발

무가시 음나무(철원수집종)의 조직배양을 통한 대량증식을 위하여 신초의 잎 및 엽병에서 5mm×5mm 크기의 절편을 분리하여 다양한 농도의 식물호르몬이 첨가된 MS 배지에 치상하여 기내 배양하였다.

표 11. 조직배양 단계 별 배지조성

단계	배지	호르몬 및 당 함량	비고
초대배양 P1	MS 1	2,4-D 1ppm + TDZ 0.1ppm + sucrose 3%	캘러스 형성
1차 계대배양 J2	MS 1	2,4-D 0.2ppm + sucrose 5%	캘러스 비대
2차 계대배양 H	MS 1/2	2,4-D 0.15ppm + sucrose 1.5%	체세포배 형성
3차 계대배양 M8	MS 1/2	charcoal 0.04% + sucrose 2%	신초 유도

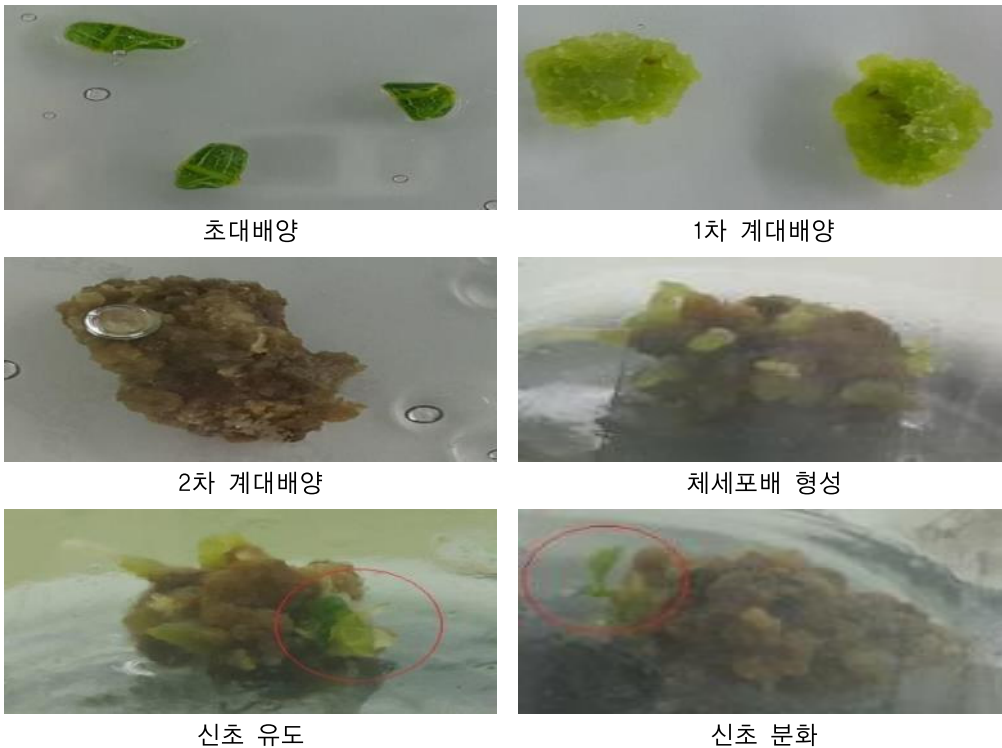


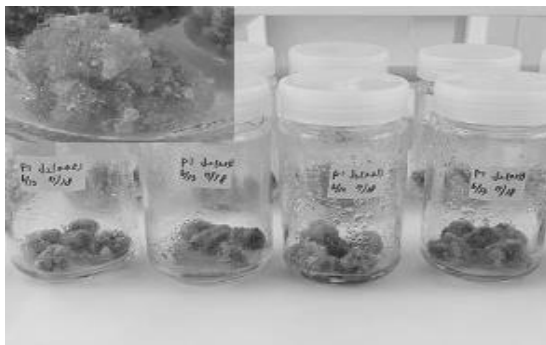
그림 7. 배양 단계 별 캘러스 변화

초대배양 후 캘러스 형성은 잎과 엽병에 따른 차이 없었으며 경엽유도까지 약 28주 가량 소요되었다. 2차 계대배양시 배양용기를 패트리디시에서 유리병으로 변경한 결과 캘러스 갈변 고사가 다소 줄어

들고 캘러스 크기도 증가하였으며 체세포배가 형성 되었다.(표 11) 이후 신초 유도 배지에 계대배양 하여 최종적으로 신초가 분화하는 것을 확인하였다.(그림 7)

표 12. 갈변방지제 처리에 따른 캘러스 크기 및 분광수치

	처리농도 (mg/l)	체세포배 형성율(%)	캘러스 크기 (cm)	색도색차		
				L 명도	a 녹색값	b 청색값
Ascorbic acid	0.05	16.4	2.26	40.3	0.06	5
	0.1	0	1.81	34.6	1.11	3.09
	0.15	3.2	1.51	35.44	1.02	3.48
	0.2	2.4	1.62	33.31	0.31	2.79
citric acid	0.05	3.2	1.82	36.07	0.66	1.85
	0.1	2.8	1.85	35.05	0.76	1.67
	0.15	10	1.68	35.21	0.39	0.44
	0.2	6.8	2.01	37.6	0.3	2.69
charcoal	0.05	2	1.64	33.45	0.29	-0.12
	0.1	4	1.83	31.09	0.28	-0.17
	0.15	0	1.78	33.72	0.17	0.16
	0.2	0	1.44	31.15	0	-0.88
무처리		5.6	1.82±0.4	36.68±2.75	0.58±0.48	2.03±1.34



Ascorbic acid 0.05 mg/l 첨가



무처리

그림 8. 갈변방지제 처리 후 캘러스 갈변정도

계대배양 과정에서 발생하는 캘러스 갈변을 방지하기 위해 갈변방지제를 첨가한 결과 1차 계대배양용 배지 MS 1 + 2,4-D 0.2ppm + sucrose 5% 에 Ascorbic acid 0.05mg/L 첨가한 배지에서 체세포배 형성율, 캘러스 크기, L값, b값 모두 증가하여 캘러스 비대 및 갈변방지에 효과를 보였다.(표 12) Ascorbic acid 0.05mg/L 첨가한 배지의 캘러스 계대배양시 부정아 형성율은 높으나 경엽유도는 확인되지 않았다.(그림 8)

(시험 7) 무가시 음나무 조직배양묘 순화 배지 선발

무가시 음나무(철원수집종) 기내 식물체의 기외 순화에 적합한 배지 조성을 구명하기 위하여 유리 온실에서 서로 다른 혼합 용토에 식물체를 심어 생육 및 생존율을 관찰하였다.

표 13. 음나무 순화배지별 생존율

배지	기간	초장 (cm)	엽수 (개)	경경 (mm)	공극률 (%)	생존율 (%)
펄라이트50%+상토50%	14주차	11.5	4.0	1.2	37.3	28.9
질석50%+상토50%	14주차	13.5	6.8	1.4	41.9	40
피트모스50%+상토50%	14주차	15.0	4.3	1.7	52.8	35.6
상토100%	14주차	14.4	3.7	1.8	48	31.1

※ 상토: 상토2호, 코코피트 67%, 피트모스 17%, 제오라이트 5%, 펄라이트 10%, 기타 1%, pH 5.5, 1.0 dS/m

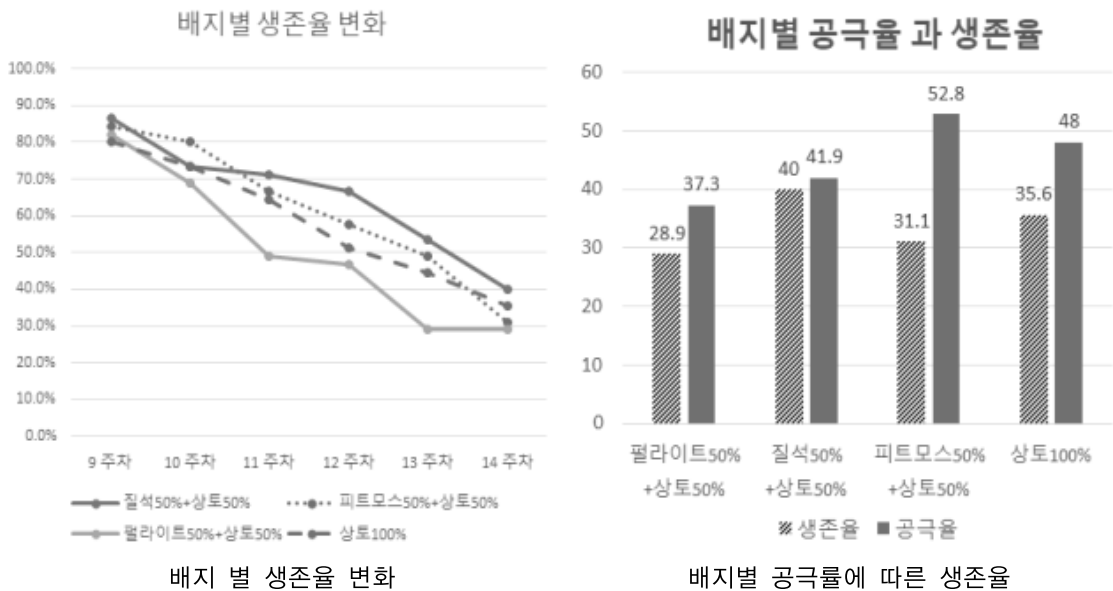


그림 9. 배지별 삼상 특성에 따른 생존율 비교

음나무 조직배양묘 순화배지별 생육 간에는 유의한 차이가 없었으며, 순화배지별 생존율을 비교한 결과 4주차 생존율은 모든 배지에서 100%인데 반하여 8주차부터 생존율이 떨어지기 시작하였으며 14주차 생존율은 질석 혼합배지가 40.0%로 가장 높았다.(표 13, 그림 9) 지금까지의 결과를 종합해보면 ‘두메향’, 무가시 음나무(철원수집종)은 각각 생장점 배양과 체세포배 배양을 통한 대량증식이 가능한 것으로 판단되며 조직배양묘의 순화 생존율을 높이기 위해서는 작목별로 적정 순화배지를 이용하는 것이 중요하다고 판단된다.

4 적 요

〈제1세부과제: 산채 신품종 대량증식 기술 개발〉

(시험 1) 자체 육성 품종 곱취 ‘진향’, ‘두메향’ 의 식물체 재분화 조건 구명

가. 진향과 두메향은 잎, 엽병을 포함한 전 처리구에서 캘러스 형성이 확인됨. 진향은 IAA 4ppm + kinetin 0.1ppm과 IAA 4ppm + 4-CPPU 0.1ppm 조건의 앞에서, 두메향은 IAA 2ppm + 4-CPPU 0.1ppm 조건의 엽병에서 캘러스 형성도가 높았으며 발근이 확인되었으나 신초는 유도되지 않음. 나. 식물체 재분화를 위한 성장점 조직배양이 필요할 것으로 판단됨.

(시험 2) 자체 신품종 성장점 배양을 위한 유식물체 분화 배지 선발

가. 곱취 두메향의 다신초 유도배지 선발을 위한 성장조절제 처리결과 MS1 + sucrose 2% + TDZ 0.5 ppm 배지에서 4.7 ± 1.0 개의 다신초가 유도됨. 나. 발근 배지는 발근률이 가장 높은 MS1배지 + 2,4-D 0.5ppm 배지와 주당 발근개수가 가장 높은 MS1 + NAA 1.0ppm 배지 중 초기 발근이 빠른 2,4-D 0.5ppm 첨가한 MS 배지를 발근배지로 최종 선발함.

(시험 3) 자체 신품종 성장점 소독 조건 구명

가. NaOCl 과 $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 은 농도가 높을수록, 침지시간이 길수록 성장점의 오염율은 낮아졌으나 신초분화율도 함께 낮아짐. 나. 장시간 침지나 식물소독제의 농도가 높아질 경우 기형엽이나 엽백화 현상 발생. 다. 신초분화율은 1.5% 농도 15분 침지에서 NaOCl 66.7%, $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 60.0%로 가장 높았으며, PPM은 농도 및 침지시간에 상관없이 신초분화 이루어지지 않음. 라. NaOCl 1.5% 용액에 15분간 침지하는 것이 가장 적합할 것으로 판단됨.

(시험 4) 자체 신품종 조직배양묘 기외 순화 적정 배지 선발

가. ‘두메향’ 조직배양묘 순화용 배지조성은 펄라이트80%+피트모스20% 처리구의 생존률이 73.3%로 가장 높고 초장, 경경, 근장 발달도 우수함. 나. 순화배지별 공극률은 펄라이트80%+피트모스20% 처리구가 68.5%로 다른 처리구에 비하여 가장 높음.

(시험 5) 산채 조직배양묘 생장억제제 처리효과 구명

가. ‘두메향’ 조직배양묘의 생장억제제 종류 및 농도별 처리에 따른 생육 비교시 flurprimidol 0.1mg/L 처리에서 생존율이 83.3%로 가장 높음.

나. 음나무 조직배양묘의 생장억제제 종류 및 농도별 처리에 따른 생육 비교시 PEG (polyethylene glycol)과 flurprimidol 모든 처리구에서 무처리구에 비하여 순화 생존율을 낮음.

(시험 6) 무가시 음나무 유식물체 분화 배지 선발

- 가. 초대배양 후 캘러스 형성은 잎과 엽병에 따른 차이 없었으며 경엽유도까지 약 28주 가량 소요됨.
- 나. 2차 계대배양시 배양용기를 패트리디시에서 유리병으로 변경한 결과 캘러스 갈변 고사가 다소 줄어들고 캘러스 크기도 증가하였으며 체세포배가 형성됨.
- 다. 신초 유도 배지에 계대배양 하여 최종적으로 신초가 분화함.
- 라. Ascorbic acid 0.05mg/L 첨가한 배지의 캘러스 계대배양시 신초 분화되지 않음.

(시험 7) 무가시 음나무 조직배양묘 순화 배지 선발

- 가. 음나무 조직배양묘 순화배지별 생육 간에는 유의한 차이가 없음
- 나. 4주차 생존율은 모든 배지에서 100%인데 반하여 8주차부터 생존율이 떨어지기 시작하였으며 14주차 생존율은 질석 혼합배지 40.0%로 가장 높음.

5 인용문헌

- 원태진. 2013. 유기농산물 재배 토양 특성과 개선대책. 경기도농업기술원 보고서. pp 2~3.
- 김원배, 김정기, 이은애, 김병현, 김정간, 임학태. 1996. 산마늘 인경조직으로부터 식물체 재분화. 식물 조직배양학회지, 23권 2호. pp.123~127.
- 식물 생장에 미치는 유기질소원의 효과와 잎 절편에서의 부정근 형성. 식물조직배양학회지, 23권 6호. pp.323-328.
- 장한호, 장익환, 이용선, 박철호, 신영범. 1993. 두릅의 조직 및 배양조직편에 따른 Callus 의 유기 및 식물체 재분화. 한국육종학회 학술발표회 발표요지, 25권 2호. pp.40-41.
- 이원석, 최은경, 김재훈. 2004. 생물반응기 배양을 통한 두릅나무(*Aralia elata*)의 체세포배 및 유식물체 대량증식. 식물생명공학학회지. 31(3):219-223
- Amemiya K. and T. Mochizuki. 2002. Somatic embryo formation and plant regeneration in "Zaoh" line No.2 of Japanese Angelica tree(*Aralia elata* seem.). Plant Biotechnology. 19(5):383-387
- Dai J.L., X. Tan, Y.G. Zhan, Y.Q. Zhang, S. Xiao, Y. Gao, D.W. Xu, T. Wang, X.C. Wang, X.L. You. 2011. Rapid and repetitive plant regeneration of *Aralia elata* Seem. via somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss Organ Cult. 104:125-130
- Karim M.Z., Y. Yokota, M.M. Rahman, J. Eizawa, Y. Saito, M.A.K. Azad, F. Ishiguri, K. Iizuka and N. Yoshizawa. 2007. Efficient adventitious shoot regeneration from root explants of *Aralia elata* Seem. Intl J Bot. 3(4):390-393

6 연구결과 활용

연도(연차)	활용방안	제 목
2018(2년)	학술발표	무가시 음나무 캘러스 갈변방지 처리 효과
2019(3년)	학술발표	성장조절제가 곰취 두메향의 다신초 분화에 미치는 영향
2020(4년)	기술이전	곰취×곤달비 종간교잡종 조직배양 기술
	기타	곰취 조직배양묘 농가 공급 예정('23년 3만주)

성과지표명	연 도	1년차(2017)		2년차(2018)		3년차(2019)		4년차(2020)		계	
		목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적
학술 발표	국제										
	국내			1	1	1	1	1		3	3
기술이전									1		
계		-	-	1	1	1	1	1	1	3	3

7 연구원 편성

구 분	소 속	직 급	성 명	수행업무	참여년도	
					'19	'20
과제책임자	산채연구소	농업연구사	김세원	과제 총괄	○	○
세부책임자	산채연구소	농업연구사	박기덕	세부주관 수행	○	○
공동연구자	산채연구소	농업연구사	문윤기	품질조사 지원	○	○
	산채연구소	농업연구사	서현택	품질조사 지원	○	○
	산채연구소	농업연구사	이효영	품질조사 지원	○	○
	산채연구소	공업주사보	신동근	평가분석 지원	○	○
	산채연구소	운전서기	김대진	현장조사 지원	○	○
	산채연구소	농업연구관	박기진	평가분석 지원	○	○