



Powered by iThenticate Depositor



절간배양 방법을 이용한 감초의 기내 유식물체 재분화 및 순화

권영희^{1†} · 최원일² · 김희규³ · 김경옥⁴ · 김주형⁵ · 허윤선⁶ · 박우태⁷

Acclimatization and Plants Regeneration of Mongolian Licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) using Nodal *In vitro* Culture

Young Hee Kwon^{1†}, Won Il Choi², Hee Kyu Kim³, Kyung Ok Kim⁴, Ju hyung Kim⁵, Yoon Sun Huh⁶ and Woo Tae Park⁷

ABSTRACT

Received: 2021 November 8
1st Revised: 2021 December 1
2nd Revised: 2022 January 4
3rd Revised: 2022 February 7
Accepted: 2022 February 7

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background: Licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) multiplies vegetatively through cuttings, but for farming this process is considered too slow. Therefore, it is necessary to develop more efficient and sustainable methods for producing licorice and its medicinal constituents.

Methods and Results: Nodal segments (1.0 cm - 1.5 cm) were removed from healthy licorice plants to provide explants for micropropagation. The most successful shoot height and multiplication occurred using 2.0 mg/ℓ BAP + 0.1 mg/ℓ IAA in MS media. This media also provided the highest regeneration frequency (77.3%) and shoot formation (3.5 shoots/explants) after 16 weeks of culture. When *in vitro* plants were supplemented with activated charcoal (1.0 g/ℓ) to reduce hyperhydricity, the survival rate improved to 90.0%. A treatment of 2.0 mg/ℓ NAA in half strength MS medium proved to be superior for improving rooting capacity, with a maximum of 100% rooting. After acclimatizing to room temperature, the micropropagated plantlets were transferred to a greenhouse mist room, and grown in perlite / vermiculite (1 : 1, v/v). There was a 93.3% survival rate after eight weeks.

Conclusions: Our experiments confirm that *in vitro* growth and multiplication of plantlets with micropropagation can be optimized to mass produce healthy and vigorous Licorice plant.

Key Words: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., Acclimatization, Micropropagation, Nodal Segments

서 언

감초는 콩과에 속하는 감초속 (*Glycyrrhiza*)의 다년생 초본으로 중국, 시베리아, 몽골 등 전 세계에 약 30 여종 (Nomura *et al.*, 2002)이 분포하며, 지중해 유럽, 아시아 온대 지역 등에 강수량이 적고 모래가 많은 건조지역에서 자생한다 (Kiyotomo *et al.*, 2012; Marui *et al.*, 2012).

감초의 뿌리 및 뿌리줄기는 식용이 가능하여 위 건강에 도움을 주는 건강기능식품으로도 활용되고 있으며 (Yoon, 2009),

항바이러스 (Fiore *et al.*, 2008), 항균 (Gupta *et al.*, 2008), 항암 (Rathi *et al.*, 2009) 및 항알레르기 효과 (Kwak and Park, 2004) 등 다양한 효능이 규명되었다. 이처럼 감초는 많은 약효 성분의 작용으로 다양한 효능을 나타내는 주요 약용 작물이지만 필요량은 대부분 수입에 의존하여 안정적 수급을 위한 대책이 필요하다 (Lee *et al.*, 2019). 최근 감초 수입량은 939 톤으로 수입되고 있으며 (KTSPI, 2016), 국내 생산량은 37 톤으로 (MAFRA, 2019) 자급률은 낮아 이를 해결하기 위해 대량생산이 절실하다.

†Corresponding author: (Phone) +82-43-220-5652 (E-mail) tomato94@korea.kr

¹충청북도농업기술원 원예연구과 연구사 / Researcher, Chungcheongbuk-do Agricultural Research & Extension Services, Cheongju 28130, Korea.

²충청북도농업기술원 원예연구과 연구사 / Researcher, Chungcheongbuk-do Agricultural Research & Extension Services, Cheongju 28130, Korea.

³충청북도농업기술원 원예연구과 공무원 / Public official, Chungcheongbuk-do Agricultural Research & Extension Services, Cheongju 28130, Korea.

⁴충청북도농업기술원 원예연구과 공무원 / Public official, Chungcheongbuk-do Agricultural Research & Extension Services, Cheongju 28130, Korea.

⁵충청북도농업기술원 원예연구과 연구관 / Researcher, Chungcheongbuk-do Agricultural Research & Extension Services, Cheongju 28130, Korea.

⁶충청북도농업기술원 원예연구과 연구사 / Researcher, Chungcheongbuk-do Agricultural Research & Extension Services, Cheongju 28130, Korea.

⁷농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 연구사 / Researcher, Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea.

감초는 주로 종자번식을 하는데 종자 결실율이 매우 낮고 (Sawaengsak *et al.*, 2011) 타가수정작물이기 때문에 품종의 고유 특성을 유지하기 위해 포복경을 이용한 방법으로 번식을 해야 한다. 일반적으로 농가에서 종자보다 지하경을 분주로 하는 관행 방법으로 40% - 50%는 분주묘를 사용하고 있으나 (Sharma *et al.*, 2010) 증식율이 낮아 고유한 특성을 가진 품종의 빠른 증식을 위해서는 대량생산을 위한 조직배양 기술 개발이 필요하며 (Sudha and Seemi, 1994), 기내 미세번식 기술은 기존의 종자증식이나 영양체 번식방법 보다 증식 효율을 높일 수 있고, 유전자형의 균일성을 유지할 수 있는 것으로 알려져 있다 (Bajai *et al.*, 1988).

감초의 대량생산을 위한 방법으로 마디 줄기를 이용한 절간 배양 (Dimitrova *et al.*, 1994; Kukreja, 1998; Thengene *et al.*, 1998; Oyunbileg *et al.*, 2005; Patel and Shah, 2007) 등 많은 연구들이 보고되고 있다. Mehrotra 등 (2012)은 감초 액아를 기내 배양한 신초를 캡슐화하여 장기 보존 및 상업적으로 연중 신초를 사용할 수 있는 가능성을 보여주었다. 국내 지역에서는 생육 기후 조건에 따른 만주감초의 생육 및 수량을 연구하기 위해 22.6°C, 23.9°C, 25.4°C, 26.8°C로 온도구배 터널에서 재배한 결과는 10 a 당 수량에서 25.4°C, 2.078 kg 으로 높았으며, 26.8°C에서 1,875 kg 으로 수량이 낮아졌으며, 이는 강원도 지역보다 기온이 높은 남쪽 지역들이 감초의 생육의 생육기 연장 및 수량 증수에 유리한 조건이라고 밝혔다 (Kim *et al.*, 2019). 이와 더불어 Gong 등 (2004)은 만주감초 (*G. uralensis* Fisch.) 포복경의 효과적인 번식을 위해 포복경 길이를 10 cm 로 절단하여 발근촉진제인 IBA, NAA를 농도별로 처리해 삼복한 결과에서 무처리 발근율 80% 대비해 IBA 1,400 ppm 처리 시 발근율 90%로 나타났으며, NAA 200 ppm 처리 시 발근율 86%로 좋은 효과를 보인다고 밝혔다.

많은 연구에서 효과적인 감초 기내 번식에 적용할 수 있는 배지 조성에 대하여 연구했으나 (Kukreja, 1998; Sawaengsak *et al.*, 2011), 최적의 배지는 찾지 못했다고 보고하였다 (Mousa *et al.*, 2006). Badkhane 등 (2016)은 감초의 기내 증식을 위한 프로토콜을 개발하고자 정단, 어린 잎, 줄기 부분을 이용해 연구하였고, 정단 부위와 마디 줄기를 사용하여 다신초 증식 및 발근 유도를 하였다고 보고하였다. Oyunbileg 등 (2005)도 감초 기내 번식을 위해 마디 및 정단 부위를 이용해 Gamborg's B5 배지에 식물생장조절제인 BAP, IAA 5 조합으로 신초형성을 유도했다는 보고가 있다.

본 연구에서, 만주감초의 마디 줄기를 이용한 절간 배양 방법으로 신초 유도 및 유식물체 분화 증식 및 발근을 위한 생장조절제 유기물질을 처리한 배지조건을 선별하고 기내 증식 배양시 나타나는 과수화 (過水化, hyperhydricity) 현상을 감소시키기 위하여 추가로 활성탄 (charcoal activated) 등을 넣어 배양하였으며, 기외 순화하여 대량 생산할 수 있는 연구 자료

로 활용하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 식물재료

본 시험에서는 만주감초 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)를 재료로 사용하였다.

신초의 마디 줄기가 포함된 부분을 4 cm - 5 cm의 길이로 4월에서 5월까지 채취하여 실험실에서 흐르는 물에 약 30 분간 깨끗하게 세척한 후, 크린벤치 (Vision scientific, Daejeon, Korea)에서 70% 에탄올 150 ml이 담긴 멸균 유리병 (외경 81 mm, 높이 132 mm)에 30 초간 침지하여 절간 부위의 표면을 소독하고 3% 차아염소산나트륨 (NaOCl, Yuhan corporation, Seoul, Korea) 용액 150 ml이 담긴 멸균 유리병에서 15 분 동안 침지하여 소독한 후 꺼내어서 멸균된 증류수 150 ml이 담긴 유리병에서 5 분씩 3 회 세척하였다.

세척 및 소독이 완료된 절간 부위를 1.0 cm - 1.5 cm 부분으로 절단하여 유리시험관 당 1 개의 절편을 치상하였다.

2. 신초 배양

감초 줄기로부터 신초를 유도하는 초대 배양 및 다신초를 유도하는 증식 배양의 적합한 배지 조건을 구명하기 위하여 배양하였으며, 신초를 유도하기 위한 초대 배양 배지는 MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지 4.40 g/l 와 Gamborg's B5 (Gamborg *et al.*, 1968) 배지 3.16 g/l 를 사용하였고, sucrose (Junsei Chemical, Tokyo, Japan) 30.00 g/l, gelrite (MBcell, Seoul, Korea) 3.80 g/l, AgNO₃ (MBcell, Seoul, Korea) 1.0 mg/l, L-glutamine (MBcell, Seoul, Korea) 0.10 g/l, ascorbic acid (MBcell, Seoul, Korea) 0.10 g/l 에 각각 처리하는 식물생장조절제는 NAA (MBcell, Seoul, Korea) 0.1 mg/l, kinetin (MBcell, Seoul, Korea) 0.5 mg/l, zeatin (MBcell, Seoul, Korea) 0.5 mg/l, BAP (MBcell, Seoul, Korea) 0.5 mg/l 혹은 1.0 mg/l 로 단독 혹은 조합 처리하였다 (Table 1).

다신초를 유도하기 위한 증식배양의 배지 조성은 MS 배지를 사용하였고, sucrose 30.00 g/l, gelrite 3.80 g/l, AgNO₃ 1.0 mg/l, adenine hemisulfate 0.05 g/l, thiamine hydrochloride (MBcell, Seoul, Korea) 1.0 mg/l, polyvinylpyrrolidone (PVP, MBcell, Seoul, Korea) 1.00 g/l, ascorbic acid 0.10 g/l 에 각각 처리하는 식물생장조절제는 NAA 0.1 mg/l, IAA 0.1 mg/l, kinetin 0.5 mg/l, zeatin 1.0 mg/l, BAP 1.5 mg/l 와 2.0 mg/l 를 단독 혹은 조합으로 첨가하여 배양한 후 신초수, 생존율 등을 조사하였다.

기내 증식배양 시 과수화 현상이 발생되어 다신초를 위한 증식배양 시 MS 배지를 사용하였고, charcoal activated

(MBcell, Seoul, Korea) 1.00 g/l 를 첨가한 배지에 agar (MBcell, Seoul, Korea) 9.00 g/l, sucrose 30.00 g/l, AgNO₃ 1.0 mg/l, adenine hemisulfate 0.05 g/l, thiamine hydrochloride 1.0 mg/l, polyvinylpyrrolidone 1.00 g/l, ascorbic acid 0.10 g/l 에 각각 처리하는 성장조절물질로는 NAA 0.1 mg/l, IAA 0.1 mg/l, kinetin 0.5 mg/l, zeatin 1.0 mg/l, BAP 1.5 mg/l 와 2.0 mg/l 등을 단독 혹은 조합으로 첨가하여 배양한 후 신초수, 과수화를 및 생존율 등을 조사하였다 (Table 1).

각 배지는 0.1 N NaOH를 사용해 pH 5.8로 조정하였고 교질물질로 gelrite 3.80 g/l 및 agar 9.00 g/l 를 첨가한 다음, 250 ml의 배양병에 80 ml씩 분주하고 고압멸균기 (AC-60, Daihan scientific, Wonju, Korea)를 이용해 121°C, 1.2 기압 하에서 20 분간 멸균 후 굳힌 다음 사용하였다.

배양 조건은 23 ± 1°C 온도가 유지되는 배양실에서 명배양 (광주기 16D), cool white 형광등, 30 μmol·m⁻²·s⁻¹) 하였다. 배양 과정 중 신초의 발생 양상을 관찰하였고 배양 6 주 후에 형성된 신초의 수를 조사하였다.

배양 기간은 초대 배양은 4 주 간격으로 2 회, 다신초 증식 배양은 4 주 간격으로 2 회 계대 배양하여 8 주간 배양하였다. 계대배양은 신초의 마디 줄기를 기부에서 1 cm - 1.5 cm로 절단한 다음 동일한 배지에서 이식하여 다신초를 유기하였다.

3. 발근 배양

유기된 다신초에서 뿌리를 유도하기 위한 발근배양 배지는 기내 식물체의 마디줄기를 절단하여 1/2 MS 배지 (2.20 g/l)에 sucrose 30.00 g/l, AgNO₃ 1.00 g/l, L-glutamine 0.10 g/l, ascorbic acid 0.10 g/l, charcoal activated 1.00 g/l 에 각각 첨가하는 식물생장조절제는 BAP 0.5 mg/l 에 NAA 2.0 mg/l 와 IAA 2.0 mg/l 를 단독 처리하여 첨가하였다.

배지 제조는 pH 5.8로 조정한 다음 agar (Junsei Chemical, Tokyo, Japan)를 9.00 g/l 첨가한 후, 250 ml 배양병에 80 ml 씩 분주하고 121°C, 1.2 기압 하에서 20 분간 고압 멸균하여 굳힌 다음 사용하였고 8 주간 배양하였다 (Table 1).

4. 기외 순화

뿌리가 완전히 형성되어 배양용 유리병에서 배양 중인 어린 식물체는 배양 용기에서 꺼내어 외부환경으로 적응하는 기외 순화 과정을 거쳐야만 완전한 식물체의 형태를 갖출 수 있다 (Paek et al., 2016).

기외 순화를 위하여 배양용 유리병에서 뿌리가 형성된 감초 기내 유식물체를 꺼낸 다음 유식물체의 뿌리에 배양 배지가 남아있지 않도록 부드럽게 깨끗이 물로 씻어낸 후, perlite와

Table 1. Media combination of nodal explants of licorice cultured on MS and B5 medium supplemented with auxin (NAA or IAA) and cytokinin (BAP, Kinetin and Zeatin) alone and combination in culture.

Step of culture	Period of culture (weeks)	Medium Treatment (g/l)	Concentration of growth regulators (mg/l)					
			Auxins		Cytokinins			
			NAA	IAA	BAP	Kinetin	Zeatin	
Shoot formation	4, 8	B5	1	0.1	-	1	-	-
			2	-	-	1	-	-
			3	-	-	1	0.5	-
			4	0.1	-	0.5	0.5	-
			5	0.1	-	-	-	-
			6	0.1	-	-	-	0.5
	MS	1	0.1	-	1	-	-	
		2	-	-	1	-	-	
		3	-	-	1	0.5	-	
		4	0.1	-	0.5	0.5	-	
		5	0.1	-	-	-	-	
		6	0.1	-	-	-	0.5	
Shoot multi-plication	12, 16	MS	1	0.1	-	2.0	-	-
			2	-	0.1	2.0	-	-
			3	-	-	1.5	0.5	-
			4	0.1	-	1.5	0.5	-
			5	-	0.1	1.5	0.5	-
			6	0.1	-	-	-	1.0
Rooting	24	MS	1	-	-	-	-	-
			2	2	-	0.5	-	-
			3	-	2	0.5	-	-

vermiculite를 1 : 1 (v : v)로 혼합한 상토를 준비한 후 유식물체를 화분 (내부 직경 90 mm, 높이 113 mm)에 옮겨 심었다.

기외 순화묘의 환경조건은 23 ± 1°C 온도가 유지되고 명배양 (광주기 16D : 8H, cool white 형광등, 30 μmol·m⁻²·s⁻¹) 순화실에서 투명 플라스틱 뚜껑을 덮어주어 습도가 잘 유지되는 상태에서 경화처리를 하였다.

유식물체의 상태를 확인하면서 새로운 신초가 나온 후 플라스틱 뚜껑을 열어주어 외기의 환경에 서서히 적응시켜 완전히 경화시켰다. 기외 순화가 완료된 감초 어린 식물체는 화분에 정식하거나 순화 하우스에 정식하여 순화 4 주 후 수고, 뿌리수, 뿌리길이, 생존율 등 생육 특성을 조사하였고, 고사된 순화묘를 제외하고 순화 8 주 후 같은 조사항목으로 생육 특성을 조사하였다.

5. 통계처리

모든 처리는 완전임의배치 3 반복 측정 하였으며 시험 결과의 분석은 PC용 통계패키지인 COSTAT (CoHort software, Berkeley, CA, USA)를 이용하여 분산분석 (ANOVA)을 실시

한 후 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)로 유의성을 5% 수준에서 검정하였다 ($p < 0.05$).

결과 및 고찰

1. 절간 배양의 초기배양

감초 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 마디줄기에서 기내 배양하여 신초를 유도하는 배지조성을 선별하고자 배지 내 성장조절제 종류별 농도처리 후 신초 형성을 및 생육 특성을 조사하였다. 배양 4 주차 신초 형성 생육 특성으로 MS 배지에 NAA 0.1 mg/l 와 zeatin 0.5 mg/l 를 조합처리한 배지에서 신초 형성을 73.2%, 신초 길이 6.0 cm, 신초수 6.7 개, 유식물체 생존율 71.1% 등을 나타내어 전반적으로 가장 우수한 생육 특성을 나타내었다 (Table 2).

식물생장조절제 (plant growth regulators)는 식물 생장에 관여하는 식물호르몬을 총칭하는 것으로, 식물 조직배양 시에도 적절한 종류와 농도의 성장조절제가 배지에 첨가되어야만 배양의 목적에 맞게 배양체가 생육 및 분화할 수 있다 (De Klerk *et al.*, 1997; Fehér *et al.*, 2003).

목본류인 감 (*Diospyros kaki*)의 기내 배양에서 시토키닌 종류별 성장조절제에 대한 식물체 반응의 차이는 1/2 MS 배지 (2.2 g/l)에 BAP나 2iP를 각각 2 μM - 5 μM 또는 zeatin 인 경우는 3 μM - 10 μM 첨가한 배지를 사용하였을 때 BAP는 총생형의 왜소한 싹들이 많이 나오고, 2iP나 zeatin은 싹 하나만을 길게 신장시키는 특성을 보였고, 특히 번식률은 zeatin은 2 배 밖에 안 되지만 마디를 다시 번식체로 이용할

수 있어 실제로는 4 배까지 된다고 밝혔다 (Tao and Sugiura, 1992).

이와 더불어 Yang 등 (2021)은 수생식물 *Ranalisma rostratum*의 절간배양 시 신초유도에서 무처리인 경우 신초수 2.2 개, 생존율 60%에 대비해 성장조절제인 BA 2.0 mg/l, kinetin 2.0 mg/l, zeatin 0.2 mg/l 및 IBA 0.5 mg/l 를 처리하였을 때 신초수 4.4개로 두 배이상 증가하였으며, 시토키닌인 zeatin과 옥신을 함께 혼용으로 처리하였을 때 식물체의 싹이 유도되었다고 보고하였다.

Sharma 등 (2010)은 감초의 초기 배양에서 신초는 7 일 - 30 일에 형성되었으며, 신초는 1 개 - 9 개 정도 유도되었다고 보고된 바 본 연구의 결과와 유사하였다.

배양 8 주차 신초 유도 생육 특성으로 Table 2를 살펴보면 MS 배지에 NAA 0.1 mg/l 와 zeatin 0.5 mg/l 를 조합처리한 배지에서 신초 형성을 68.8%, 신초 길이 7.0 cm, 신초수 8.2 개, 유식물체 생존율 62.7%으로 전반적인 생육 특성이 가장 양호하였다. 감초 마디줄기를 이용한 배양에서 Badkhane와 Yadav (2016)는 감초 신초 형성을 유도하는 식물생장조절제, 광주기, 시료 수집 시기 및 계대배양에 의해 영향을 받아 마디 줄기 부위를 30 일 간격으로 채취해서 기내 배양하였을 때 생육 특성이 다르다고 밝혔으며, 마디 줄기를 이용했을 때 MS 배지에 BAP 2.0 mg/l 추가 시 앞, 정단배양보다 신초수 3.67 개로 신초형성을 66.7%로 높았다고 하였는데 본 연구에서도 성장조절제 처리에 따라 신초형성을 46.3% - 71.1%로 나타나 비슷한 결과를 보였다 (Table 2).

Table 2. Effect of various concentrations of auxins and cytokinins on *in vitro* shoot formation in MS and B5 medium of licorice after 4 weeks and 8 weeks in culture.

Concentration of growth regulators (mg/l)					After 4 weeks				After 8 weeks			
Medium	NAA	BAP	Kinetin	Zeatin	Shoot formation rate (%)	Shoot length (cm)	No. of shoots (ea/explant)	Survival rate (%)	Shoot formation rate (%)	Shoot length (cm)	No. of shoots (ea/explant)	Survival rate (%)
B5	0.1	1	-	-	50.2 ^d	4.6±0.2 ^{cd}	4.4±0.1 ^{de}	58.3 ^d	53.5 ^{de}	5.2±0.1 ^{cde}	5.0±0.2 ^{cd}	50.2 ^{def}
	-	1	-	-	44.8 ^e	5.0±0.2 ^c	4.0±0.1 ^e	52.7 ^e	42.2 ^g	5.6±0.2 ^{bcd}	4.5±0.1 ^d	44.6 ^{gh}
	-	1	0.5	-	49.1 ^d	3.9±0.1 ^d	4.9±0.1 ^d	63.4 ^c	45.0 ^{fg}	4.6±0.3 ^e	5.5±0.2 ^{bc}	52.5 ^{de}
	0.1	0.5	0.5	-	71.8 ^a	6.4±0.3 ^a	6.2±0.2 ^b	69.5 ^{ab}	66.2 ^a	7.3±0.2 ^a	7.8±0.3 ^a	64.0 ^a
	0.1	-	-	-	63.0 ^c	4.5±0.2 ^{cd}	5.6±0.3 ^{bc}	67.8 ^b	59.1 ^{bc}	5.2±0.1 ^{cde}	6.0±0.2 ^b	54.5 ^{cd}
	0.1	-	-	0.5	67.1 ^b	5.1±0.2 ^c	5.2±0.1 ^c	63.5 ^c	61.0 ^b	6.2±0.2 ^b	5.8±0.1 ^{bc}	60.6 ^{ab}
MS	0.1	1	-	-	51.2 ^d	4.5±0.3 ^{cd}	3.2±0.2 ^f	53.6 ^e	42.3 ^g	4.9±0.1 ^{de}	4.4±0.1 ^d	45.8 ^{fg}
	-	1	-	-	55.2 ^{cd}	4.1±0.2 ^d	3.4±0.2 ^f	46.3 ^f	48.4 ^{ef}	4.6±0.1 ^e	4.5±0.2 ^d	40.4 ^h
	-	1	0.5	-	62.6 ^c	4.4±0.2 ^{cd}	4.3±0.1 ^{de}	60.4 ^{cd}	55.2 ^{cd}	5.0±0.2 ^{cde}	5.2±0.2 ^{bcd}	50.2 ^{def}
	0.1	0.5	0.5	-	68.0 ^b	4.9±0.2 ^c	4.8±0.1 ^d	61.0 ^{cd}	60.4 ^b	5.8±0.1 ^{bc}	5.9±0.1 ^b	58.3 ^{bc}
	0.1	-	-	-	62.0 ^c	4.0±0.1 ^d	4.7±0.1 ^d	64.3 ^c	52.5 ^{de}	4.5±0.1 ^e	5.5±0.2 ^{bc}	48.4 ^{efg}
	0.1	-	-	0.5	73.2 ^a	6.0±0.2 ^b	6.7±0.2 ^a	71.1 ^a	68.8 ^a	7.0±0.2 ^a	8.2±0.3 ^a	62.7 ^{ab}

The results represent the means ± SD (n = 30). *Data with different letters on the columns represent significant difference according to the Duncan's Multiple Range Test (DMRT, $p < 0.05$).

2. 기내 유식물체 재분화를 위한 증식배양

다신초를 유도하기 위한 식물생장조절제를 시토키닌 농도별로 다르게 처리한 결과에서 증식배양 12 주차 기내 유식물체 생육 특성을 살펴보면 MS 기본배지에 식물생장조절제를 IAA 0.1 mg/l 와 BAP 2.0 mg/l 를 조합 처리한 경우, 신초수 4.6 개/주, 신초 길이 5.3 cm, 유식물체 생존율 100% 등으로 전반적인 생육 특성이 가장 우수하였으나, 증식배양 16 주차에는 신초수 3.5 개/주, 신초장 4.4 cm 및 유식물체 생존율이 77.3%로 생육특성이 배양 후반으로 갈수록 생존율이 떨어지고 배양 식물체의 과수화 (過水化, hyperhydricity)가 관찰되었다 (Table 3 and Fig 1). 배양 16 주차에서 배지 처리별로 과수화 발생률은 무처리 55.2 % 대비해 NAA 0.1 mg/l 와 BAP 2.0 mg/l 조합 처리한 경우 40.1% 보였으며, 생존율 74.0%로 가장 낮게 조사되었다 (Table 3).

Paek 등 (2016)은 과수화된 식물체의 줄기는 가늘고 연약하며, 목질화의 감소, 얇은 세포벽, 커다란 세포간극, 후벽조직의 발달 불량 등의 이상 현상이 관찰된다고 밝혔다. Kohjyouma 등 (1995)은 감초 액아 배양에서 MS배지에 BAP 0.5 mg/l 와 IAA 1.0 mg/l 를 처리한 조건에서 생육 특성이 좋았으나, BAP 2 mg/l - 3 mg/l, IAA 1.0 mg/l 를 첨가하였을 때는 다신초 증식을 유도하는 가장 우수한 배지조성이라고 하였다. 이는 cytokinine의 첨가 농도에 따라 감초 신초 증식에 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있었다.

이와 관련하여 Badkhane 등 (2016)은 cytokinine 농도에 따른 생육 특성을 조사하기 위해 감초 조직채취 부위별로 정단, 잎, 마디 줄기를 MS 기본배지에 BA를 0.0, 0.5, 2.0, 3.0 mg/l 로 처리할 경우 마디 줄기 부분에서 BA 2.0 mg/l 를 처리한 경우 신초수 3.67 ± 0.67, 신초형성을 66.67%로 생육 특성이 높게 나타났다고 보고하였다.

또한 Shah와 Dalal (1980)에 의하면 BAP 0.5 mg/l 와

IAA 1.0 mg/l 를 조합처리한 경우 한 개의 신초에서 4 주 후에는 4 개 이상 증식된 신초가 형성되었다고 밝혔다.

감초의 기내 배양 후반으로 갈수록 생존율이 떨어지고 일부 배양 기내 식물체의 해부학적, 형태적, 생리적 이상체인 과수화 (過水化, hyperhydricity) 발생이 관찰되었다. 이는 감초의 기내 배양 시 발생하는 문제점 중 하나는 조직배양 과정 중 배양체로부터 과다하게 누출되어 배지에 집적되는 페놀 화합물이다 (Paek et al., 2016). 이 페놀 물질 때문에 배양 후기에 급격히 배지가 산화되면서 배지 내 여러 영양 공급원의 이

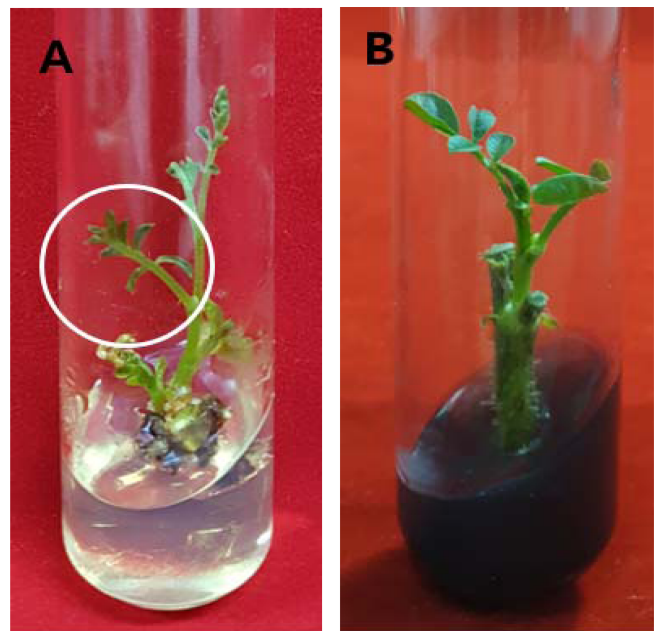


Fig. 1. Comparison of *in vitro* plants of hyperhydricity and normal in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (A); *in vitro* plants of hyperhydricity, (B); *in vitro* normal of plant.

Table 3. Effect of various concentrations of auxins and cytokinins on *in vitro* shoot multiplication in MS medium of licorice after 12 weeks and 16 weeks in culture.

Concentration of growth regulators (mg/l)							After 12 weeks			After 16 weeks				
Medium	NAA	IAA	BAP	Kinetin	Zeatin	Shoots length (cm)	No. of shoots (ea/explant)	No. of stem (ea/explant)	Survival rate (%)	Shoots length (cm)	No. of shoots (ea/explant)	No. of stem (ea/explant)	Survival rate (%)	Hyperhydricity rate (%)
Control	-	-	-	-	-	3.1±0.1 ^c	3.0±0.2 ^c	1.0±0.0 ^a	60.0 ^b	3.1±0.1 ^b	1.0±0.1 ^d	1.0±0.1 ^b	63.0 ^b	55.2 ^a
MS	0.1	-	2.0	-	-	4.7±0.3 ^{bc}	3.1±0.2 ^c	1.0±0.0 ^a	100.0 ^a	5.4±0.4 ^{ab}	2.6±0.3 ^{bc}	2.6±0.1 ^a	74.0 ^a	40.1 ^a
	-	0.1	2.0	-	-	5.3±0.5 ^b	4.6±0.7 ^a	1.0±0.0 ^a	100.0 ^a	4.4±0.3 ^b	3.5±0.3 ^a	2.7±0.2 ^a	77.3 ^a	21.2 ^{ab}
	-	-	1.5	0.5	-	6.4±0.6 ^a	4.4±0.4 ^b	1.1±0.1 ^a	100.0 ^a	4.2±0.2 ^b	3.3±0.2 ^{ab}	2.2±0.1 ^a	73.3 ^a	2.4 ^c
	0.1	-	1.5	0.5	-	5.7±0.5 ^b	3.9±0.4 ^{bc}	1.0±0.0 ^a	100.0 ^a	4.7±0.3 ^b	2.7±0.2 ^{bc}	2.7±0.2 ^a	75.3 ^a	14.0 ^b
	-	0.1	1.5	0.5	-	4.8±0.7 ^{bc}	3.0±0.1 ^c	1.1±0.1 ^a	100.0 ^a	4.2±0.4 ^b	2.2±0.2 ^c	2.5±0.4 ^a	76.0 ^a	3.7 ^c
	0.1	-	-	-	1.0	5.7±0.7 ^b	3.5±0.4 ^{bc}	1.0±0.1 ^a	100.0 ^a	6.4±0.5 ^a	3.5±0.4 ^a	2.3±0.1 ^a	79.0 ^a	16.9 ^{ab}

The results represent the means ± SD (n = 30). *Data with different letters on the columns represent significant difference according to the Duncan's Multiple Range Test (DMRT, p < 0.05).

동이 억제되어 배양체의 갈변 또는 흑변이 급격히 일어난다 (Arnaldos *et al.*, 2001).

폐놀 물질은 쉽게 산화되는 불안정한 물질로 조직배양 시 배지의 산화 및 배양체 고사 등의 유해 작용을 일으키므로 이러한 문제점을 해결하고자 항산화제나 흡착제 첨가하는데 활성탄, polyvinylpyrrolidone, ascorbic acid, silver nitrate 등이 있다 (Lainé and David, 1994). 폐놀 물질을 제거하는 연구로 Oyunbileg 등 (2005)은 시험관 내 기내 식물체의 생장을 억제하는 폐놀 유사 물질의 분비가 있었으며, 항산화제 역할을 하는 ascorbic acid를 사용하였을 때 조절될 수 있다고 하였다.

Table 4에서와 같이 다신초를 유도하기 위한 식물생장조절제를 시토키닌 농도별로 다르게 처리한 결과에서 폐놀 발생 및 과산화 발생을 감소시키기 위하여 증식배양 12 주차에 MS 기본배지에 활성탄 1.00 g/l 과 agar 9.00 g/l 를 첨가한 상태에서 식물생장조절제를 IAA 0.1 mg/l 와 BAP 2.0 mg/l 를 조합 처리한 경우, 신초수 4.2 개/주, 신초 길이 6.2 cm, 측지 1.2 개/주, 유식물체 생존율 100% 등으로 전반적인 생육 특성이 가장 우수하였다.

감초의 배양 16 주차 증식배양에서 과산화 현상이 발생되었던 Table 3과 같은 배지조건에 활성탄 1.00 g/l 과 agar 9.00 g/l 를 첨가한 배지에서 식물생장조절제를 IAA 0.1 mg/l 와 BAP 2.0 mg/l 를 조합 처리한 경우, 배양 초기에는 신초수 3.1 개/주, 신초 길이 6.6 cm 및 유식물체 생존율이 90.0%로 생육 특성이 양호하였고, 과산화 발생률 0.0%로 정상적인 식물체를 배양하였다 (Table 4).

Paek 등 (2016)은 과산화를 유발하는 주요 요인은 고습도, 과도한 무기물과 탄수화물, 고농도의 생장조절물질, 저광도, 낮은 수분 포텐셜에서 발생한다고 밝혔으며, 사과나무의 기내 배양에서 한천 대신 고농도의 칼륨 (K⁺)과 마그네슘 (Mg⁺)를 첨가한 겔라이트 (gelrite)를 사용하면 과산화 현상이 증가하였다

고 밝혔다. 또한 Chakrabarty 등 (2005)도 사과 왜성대목 (M9 EMLA)의 포장재배한 건전잎, 기내배양묘의 건전잎, 과수화묘의 잎에 있어서 pyridine nucleotide 생산이 과산화된 잎에서는 건전묘 잎에 비해 감소하는 경향을 나타내는데, 이는 과산화된 잎에서 NADPH 생산 감소는 엽록체 수가 줄어들고 광합성 능력이 낮아진다는 것을 의미한다고 보고하였다.

이와 더불어 소나무 기내 배양 시 gelrite 2.0 g/l 첨가하였을 때 과산화 발생정도(1; 매우 경미, 2; 경미, 3; 보통, 4; 강함)는 과산화를 4 (강함) 정도인 반면 활성탄 1%에 Difco Bacto Agar 8.0 g/l 를 넣었을 때 과산화를 1 (매우 경미) 정도로 4 배 정도 낮아졌다고 보고하여 본 연구결과와 비슷하였다 (Nairn *et al.*, 1995).

4. 기내 식물체의 발근 유도

감초 기내 식물체의 뿌리 유도를 위한 기본배지는 배양 24 주차 발근 배양에서 1/2 MS (2.2 g/l) 배지에 식물생장조절제로 NAA 2.0 mg/l 와 BAP 0.5 mg/l 를 조합처리하였을 때 뿌리수 5.9개, 뿌리 길이 8.3 cm로 발근 특성이 가장 양호하였으며, 유식물체 생존율은 100%로 생육 특성이 가장 우수하였다 (Table 5).

본 발근유도 배지조건에서 과산화 현상을 감소시키고 발근을 촉진시키기 위해 활성탄 1.0 g/l 와 agar 9.0 g/l 첨가하였는데 뿌리 수는 주당 4.0 개 - 5.9 개, 뿌리 길이는 7.9 cm - 9.3 cm로 전반적으로 뿌리 형성이 좋았다. Dumas와 Monteuuis (1995)의 보고에서도 뿌리를 유도할 때 활성탄의 효과는 뿌리 부분을 어둡게 하여 토양과 같은 효과를 제공함으로써 발근과 번식을 촉진시킬 수 있다고 하였는데 본 연구와 같은 결과를 보였다.

뿌리 배양에 있어 생장조절제 중 옥신 종류인 IAA와 IBA의 경우 다양한 식물체의 기내 뿌리 형성에 효과적이라고 알

Table 4. Effect of various concentrations of auxins and cytokinins on *in vitro* shoot multiplication in MS medium and supplemented with charcoal activated and agar of licorice after 12 weeks and 16 weeks in culture for reducing hyperhydricity.

Concentration of growth regulators (mg/l)						After 12 weeks				16After 16 weeks				
Medium	NAA	IAA	BAP	Kinetin	Zeatin	Shoots length (cm)	No. of shoots (ea/explant)	No. of stem (ea/explant)	Survival rate (%)	Shoots length (cm)	No. of shoots (ea/explant)	No. of stem (ea/explant)	Survival rate (%)	Hyperhydricity rate (%)
Control	-	-	-	-	-	3.1±0.1 ^e	3.0±0.2 ^e	1.0±0.0 ^a	60.0 ^b	3.1±0.1 ^b	1.0±0.1 ^c	1.0±0.1 ^c	63.0 ^b	56.3 ^a
MS	0.1	-	2.0	-	-	4.6±0.4 ^d	3.5±0.2 ^d	1.0±0.0 ^a	100.0 ^a	5.7±0.4 ^a	2.7±0.2 ^{ab}	2.2±0.1 ^a	77.5 ^a	0.0 ^b
	-	0.1	2.0	-	-	6.2±0.4 ^b	4.2±0.5 ^c	1.2±0.1 ^a	100.0 ^a	6.6±0.4 ^a	3.1±0.2 ^a	2.0±0.0 ^{ab}	90.0 ^a	0.0 ^b
	-	-	1.5	0.5	-	7.8±0.6 ^a	4.7±0.4 ^b	1.0±0.0 ^a	100.0 ^a	6.8±0.4 ^a	3.0±0.2 ^a	2.0±0.1 ^{ab}	90.5 ^a	0.0 ^b
	0.1	-	1.5	0.5	-	5.4±0.6 ^c	4.1±0.4 ^c	1.1±0.1 ^a	100.0 ^a	5.2±0.3 ^a	1.9±0.2 ^b	2.2±0.1 ^a	75.8 ^a	0.0 ^b
	-	0.1	1.5	0.5	-	6.1±0.7 ^b	5.5±0.4 ^a	1.1±0.1 ^a	100.0 ^a	5.9±0.3 ^a	2.9±0.3 ^a	2.1±0.1 ^a	83.3 ^a	0.0 ^b
	0.1	-	-	-	1.0	6.3±0.8 ^b	3.2±0.3 ^e	1.0±0.0 ^a	100.0 ^a	5.4±0.3 ^a	1.4±0.2 ^b	1.7±0.3 ^b	85.7 ^a	0.0 ^b

The results represent the means ± SD (n = 30). ^aData with different letters on the columns represent significant difference according to the Duncan's Multiple Range Test (DMRT, p < 0.05).

Table 5. Root formation and shoot development in 1/2 MS medium supplemented with plant growth regulator of licorice after 24 weeks in culture.

Concentration of growth regulators (mg/l)			Rooting (%)	Shoots length (cm)	No. of shoots (ea/explant)	No. of stem (ea/explant)	No. of root (ea/explant)	Root length (cm)	Survival rate (%)
NAA	IAA	BAP							
-	-	-	86.7 ^b	3.5±0.2 ^b	1.0±0.1 ^b	0.2±0.0 ^b	2.0±0.2 ^b	3.8±0.2 ^b	66.7 ^c
2.0	-	0.5	100.0 ^a	9.7±0.9 ^a	3.7±0.8 ^a	1.9±0.4 ^a	5.9±0.8 ^a	8.3±0.4 ^a	100.0 ^a
-	2.0	0.5	100.0 ^a	9.5±0.4 ^a	3.1±0.9 ^a	1.4±0.3 ^a	4.0±0.9 ^a	7.9±1.8 ^a	83.2 ^b

The results represent the means ± SD (n = 30). *Data with different letters on the columns represent significant difference according to the Duncan's Multiple Range Test (DMRT, p < 0.05).

려진 바, Sharma 등 (2010)은 MS 배지에 IAA 1.0 mg/l 를 단독으로 첨가하면 뿌리 형성이 잘되어 기외 식물의 생존율을 높여준다고 하였지만, Shaheen 등 (2020)은 MS 배지에서 IAA와 NAA가 추가된 감초의 기내 식물체의 뿌리 형성을 유도했을 때 NAA를 6.0 mg/l 의 수준으로 처리하는 경우 발근율이 78%로 조사되었으며, 14 일 정도 뿌리 형성이 되기 시작하였고 한 주당 뿌리 수가 3.3 개로 생육 특성이 양호하였다고 보고하였다. 본 연구와 같이 Kukreja (1998)는 성장조절제인 NAA를 단독으로 사용하였을 때는 감초의 발근 형성은 억제하지만 시토키닌인 BAP와 조합으로 NAA 0.5 mg/l 와 BAP 1.0 mg/l 를 처리하는 경우 발근 형성이 가장 효과적이라고 하였다.

감초의 기내 배양묘의 생육 특성을 배양과정별로 비교한 사진으로 배양 8 주 동안에 마디 줄기로부터 어린 식물체가 정상적으로 분화 생육하였으며 배양 12 주차에 기내 식물체 재분화가 되었고, 배양 24 주차에 뿌리 형성이 된 것을 확인할 수 있었다 (Fig 2).

5. 기외 순화 기간별 생육 특성

기외 순화 기간별 유목의 생육특성을 조사한 결과로는 기외 순화 4 주 후 신초 길이 9.9 cm, 신초수 1.6 개/주, 뿌리길이 9.5 cm, 뿌리수 5.0 개/주였다. 감초 순화묘는 총 샘플수 30개 중 생존율은 77.9%로 성공적으로 기외 순화하여 외부환경에 적응한 것으로 판단되었다.

기외 순화 8 주 후 신초장 17.9 cm, 신초수 2.5 개/주, 뿌리길이 24.6 cm, 뿌리수 2.4 개/주였으며, 생존율은 93.3%로 정상적인 순화묘의 성장을 나타내었다 (Table 6 and Fig. 3). 기외 순화에서 생존율을 살펴보면 기외순화 4주차에서 생존율 77.9 %를 나타냈었는데 이는 배양병 (기내)에서 자란 식물들은 기내의 특별한 환경 때문에 발육이 정상적으로 이루어지지 않아 잎이 작고 얇으며, 기공의 수가 적고 개폐 운동이 정상적으로 이루어지지 않는 경우가 많아 생존율이 감소하는 원인이 되기도 한다 (Paek et al., 2005). 감초 배양묘의 기외 순화 8 주 후 생존율이 기외 순화 4 주차보다 올라간 이유는

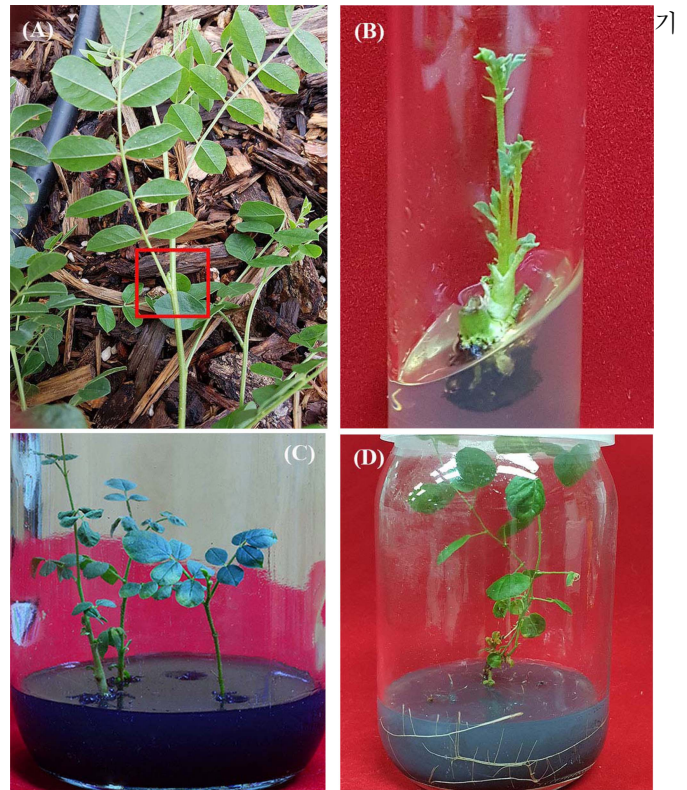


Fig. 2. *In vitro* stolon organogenesis and plant regeneration from cultured nodal in Plants were regenerated *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (A); nodal segments, (B); shoot induction from nodal stolon with NAA 0.1 mg/l and Zeatin 0.5 mg/l on MS medium after 4 weeks of culture, (C); shoot multiplication with IAA 0.1 mg/l and BAP 2.0 mg/l in MS medium after 12 weeks of culture, (D); elongation of roots culture with NAA 2.0 mg/l and BAP 0.5 mg/l on half strength MS media after 24 weeks of culture.

외 순화 4 주차에 고사된 순화묘를 제외하고 생존율을 조사하여 93.3%로 높아졌으며, 이는 소식물체의 광합성 능력이 기공의 정상적인 기능 회복이 되었고 발근 수는 기외 순화 4 주차에 있었던 잔뿌리는 사라지고 뿌리 직경이 1.1 mm 로 굵어지면서 정상적인 생육 특성이 보였다 (Table 6).

Table 6. The growth characteristics of acclimatized in perlite and vermiculite (1 : 1 = v : v) of licorice after 4 weeks and 8 weeks in acclimatization.

Acclimatization period (weeks)	Shoot length (cm)	No. of shoots (ea/explant)	Root length (cm)	No. of root (ea/explant)	Root width (mm)	Survival (%)
4	9.9±0.3	1.6±0.1	9.5±0.5	5.0±0.8	-	77.9±9.0
8	17.9±0.6	2.5±0.6	24.6±0.1	2.4±0.2	1.1±0.1	93.3±11.5

The results represent the means ± SD (n = 30).

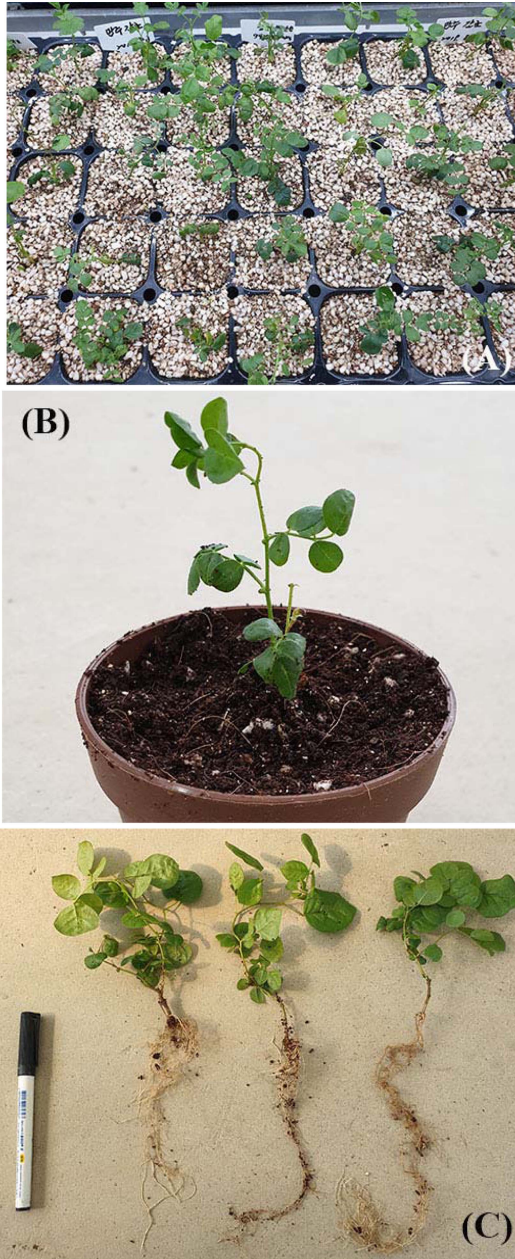


Fig. 3. Regenerated plantlets acclimatization after 2 months. (A); micropropagated plantlet grown in perlite and vermiculite (1 : 1 = v/v) after 4 weeks of acclimatization, (B); *Ex vitro* plants transfer in soil, (C) *Ex vitro* plants grown elongation of root after 8 weeks of acclimatization.

감초의 기외 순화를 위해 모래와 흙 (2 : 1 = v/v)의 혼합된 분에 재배할 때 생육이 우수하다고 했으며 (Mehrotra *et al.*, 2012), Yadav 등 (2013)은 3 cm - 4 cm 길이의 싹과 10 개 - 15 개의 뿌리가 있는 배양묘를 1 : 1 : 1의 비율로 모래, 토양 및 지렁이 퇴비를 포함하는 비닐봉지에 옮기고 15 일 동안 통제된 온실 조건에서 재배했을 때 순화묘의 87% 이상 생존율을 보였다고 하였다.

4 개 - 5 개의 잎을 가진 배양묘를 peatmoss와 토양 (1 : 1 = v/v)으로 혼합된 화분에 20 일 동안 재배한 후 Peatmoss와 점토흙의 혼합물 (1 : 1 = v/v)로 분갈이를 한 다음 재배하였을 때 가장 높은 생존율 (77.7%)이 관찰되었으며, 토양, 미사, 모래 (1 : 1 : 1 = v/v/v) 혼합물에서는 가장 낮은 생존율 (11.1%)을 보였다고 하였다 (Shaheen *et al.*, 2020).

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ01261001)의 지원으로 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Arnaldos TL, Muñoz R, Ferrer MA and Calderón AA. (2001). Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananasa*, cv. Chandler) callus culture. *Physiologia Plantarum*. 113:315-322
- Badkhane Y, Yadav AS and Bajaj A. (2016). Effect of explant source and different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* micropropagation of *Glycyrrhiza glabra* L. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. 6:5830-5840.
- Bajaj YPS, Furmanowa M, Olszowska O. (1988). Medicinal and aromatic plants I. In Bajaj YPS. (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol 4. Springer. Berlin, Germany. p.60-103.
- Chakrabarty D, Park SY, Ali MB, Shin KS and Paek KY. (2005). Hyperhydricity in apple: Ultrastructural and physiological aspects. *Tree Physiology*, 26:377-388.
- De Klerk GJ, Arnholdt-Schmitt B, Lieberei R and Neumann KH. (1997). Regeneration of roots, shoots and embryos: Physiological, biochemical and molecular aspects. *Biologia Plantarum*. 39:53-66.
- Dimitrova D, Varbanova K, Peeva I, Angelova S and Guteva

- Y. (1994). A study on *in vitro* cultivation of *Glycyrrhiza glabra*. Plant Genetic Resources newsletter. 100:12-13
- Dumas E and Monteuis O. (1995). *In vitro* rooting of micro-propagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: Influence of activated charcoal. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 40:231-235
- Fehér A, Pasternak TP and Dudits D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 74:201-228.
- Fiore C, Eisenhut M, Krausse R, Ragazzi E, Pellati D, Armanini D and Bielenberg J. (2008). Antiviral effects of *Glycyrrhiza* species. Phytotherapy Research. 22:141-148.
- Gamborg OL, Miller RA and Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research. 50:151-158.
- Gong MJ, Park CK, Ahn MH and Jo SH. (2004). Research on the development of medicinal crop cultivation technology. Bulletin of the Gangwon ARES. Chuncheon, Korea. p.766-771.
- Gupta S, Pandotra P, Gupta AP, Verma MK, Ahuja A and Vishwakarma RA. (2013). Direct rhizogenesis, *in vitro* stolon proliferation and high-throughput regeneration of plantlets in *Glycyrrhiza glabra*. Acta physiologia plantarum. 35:2699-2705.
- Gupta VK, Fatima A, Faridi U, Negi AS, Shanker K, Kumar JK, Rahuja N, Luqman S, Sisodia BS, Saikia D, Darokar MP and Khanuja SPS. (2008). Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots. Journal of Ethnopharmacology. 116: 377-380.
- Kim YI, Lee JH, An TJ, Lee ES, Park WT, Kim YG and Chang JK. (2019). Study on the Characteristics of Growth, Yield, and Pharmacological Composition of Licorice(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) in a Temperature Gradient Tunnel. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 27:322-329.
- Kiyotomo H, Omine K, Yasufuku N, Kobayashi T, Furukawa Z and Shinkai A. (2012). Comparison of quality of *Glycyrrhiza (Glycyrrhiza uralensis)* under different ground water levels and soil conditions. Journal of Arid Land Studies. 22:275-278.
- Kohjyouma M, Kohda H, Tani N, Ashida K, Sugino M, Yamamoto A and Horikoshi T. (1995). *In vitro* propagation from axillary buds of *Glycyrrhiza glabra* L. Plant Tissue Culture Letters. 12:145-149.
- Korea Trade Statistics Promotion Institute(KTSPi). (2016). Trade Statistics Service: 2016 Income data of industrial crops. Korea Trade Statistics Promotion Institute. Seoul, Korea. http://www.ktspi.or.kr/sub.do?pageName=trend_idx
- Kozhuharova A and Stanilova M. (2017). *In vitro* cultures initiation from seeds of Bulgarian localities of *Glycyrrhiza glabra* L.(Fabaceae). Journal of Bioscience and Biotechnology. 2017: 25-30.
- Kukreja AK. (1998). *In vitro* propagation of liquorice(*Glycyrrhiza glabra* L.) through multiple shoot formation. Journal of Spices and Aromatic Crops. 7:13-17.
- Kwak SK and Park YC. (2004). Effects of Gamcho on cytokine production in asthma model mouse. Korean Journal Oriental Physiology and Pathology. 18:463-467.
- Lainé E and David A. (1994). Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. Plant Cell Reports. 13:473-476.
- Lee SE, Lee JH, Park CG, Kim HD, Lee YJ, Seo KH, Jeong SH, Chang JK and Kim DH. (2019). Evaluation of the *in vitro* activity of *Glycyrrhiza* cultivar roots. Korea Journal Medicinal Crop Science. 27:115-125.
- Marui A, Nagafuchi T, Shinogi Y, Yasufuku N, Omine K, Kobayashi T, Shinkai A, Tuvshintogtokh I, Mandakh B and Munkhjargal B. (2012). Soil physical properties to grow the wild licorice at semi-arid area in Mongolia. Journal of Arid Land Studies. 22:33-36.
- Mehrotra S, Khwaja O, Kukreja AK, Rahman L. (2012). ISSR and RAPD based evaluation of genetic stability of encapsulated micro shoots of *Glycyrrhiza glabra* following 6 months of storage. Molecular Biotechnology. 52:262-268.
- Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs(MAFRA). (2019). Industrial crop production statistics. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. Sejong, Korea. p.86.
- Mousa NA, Siaguru P, Wiryowidagdo S and Wagih ME. (2006). Rapid clonal propagation of licorice(*Glycyrrhiza glabra*) by *in vitro* shoot culture. Sugar Tech. 8:292-298.
- Murashige T and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15:473-497.
- Nairn BJ, Furneaux RH and Stevenson TT. (1995). Identification of an agar constituent responsible for hydric control in micropropagation of radiata pine. Plant cell, tissue and organ culture. 43:1-11.
- Nomura T, Fukai T and Akiyama T. (2002). Chemistry of phenolic compounds of licorice(*Glycyrrhiza* species) and their estrogenic and cyto toxic activities. Pure and Applied Chemistry. 74:1199-1206.
- Oyunbileg Y, Altanzul K, Oyunsuren T and Bayarlkhagva D. (2005). Tissue culture and micropropagation of Mongolian licorice(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.). Mongolian Journal of Biological Sciences. 3:21-24.
- Paek KY, Gao JA, Kwak SS, Kim JY, Kim CK, Kim HH, Park GI, Park SY, Park KC, Yu JR, Yu CY, Yoon JK, Lee KJ, Jeon SI, Jeong M, Jeong BR, Han BH, Han JH and Hyeong NI. (2016). Plant Biotechnology. Hyangmunsa. Seoul, Korea. p.51-130.
- Patel RM and Shah RR. (2007). *In vitro* clonal propagation of liquorice(*Glycyrrhiza glabra* L.). Journal of Herbal Medicine and Toxicology. 1:27-29.
- Rathi SG, Suthar M, Patel P, Bhaskar VH and Rajgor NB. (2009). *In-vitro* cytotoxic screening of *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae): A Natural anticancer drug. Journal of Young Pharmacology. 1:239-243.
- Sawaengsak W, Saisavoey T, Chuntarat P, Karnchanat A. (2011). Micropropagation of the medicinal herb *Glycyrrhiza glabra* L., through shoot tip explant culture and glycyrrhizin detection. International Research Journal Plant Science. 2:129-136
- Shaheen A, Ali M, Ahmad N, Hassan Y, Dewir S, El-Hendawy AE, Gawad and Ahmed M. (2020). Micropropagation of licorice(*Glycyrrhiza glabra* L.) by using intermediate nodal explants. Chilean Journal of Agricultural Research. 80:326-333.
- Sharma P, Tripathi MK, Tiwari G, Tiwari S and Baghel BS. (2010). Regeneration of liquorice(*Glycyrrhiza glabra* L.) from

- cultured nodal segments. Indian Journal of Plant Physiology. 15:1-10.
- Sudha CG and Seeni S.** (1994). *In vitro* multiplication and field establishment of *Adhatoda beddomei* C. B. Clarke, a rare medicinal plant. Plant Cell Reports. 13:203-207.
- Tao R and Sugiura A.** (1992). Micropropagation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.). In Bajaj YPS. (ed.). High-Tech and Micropropagation. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 18. IV. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Heidelberg, Germany. p.424-440.
- Thengene SR, Kulkarni DK and Krishnamurthy KV.** (1998). Micropropagation of liquorice(*Glycyrrhiza glabra* L.) through shoot tip and nodal cultures. *In Vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant. 34: 331-334
- Yadav K, Aggarwal A and Singh N.** (2013). Arbuscular mycorrhizal fungi induced acclimatization and growth enhancement of *Glycyrrhiza glabra* L.: A potential medicinal plant. Agricultural Research. 2:43-47.
- Yang J, Shi C, Xiang Q, Wang D, Zhao H and Guo W.** (2021). Efficient *in vitro* micropropagation of an endangered marsh species ranalisma rostratum through organogenesis of buds and stolons. Pakistan Journal Botany. 53:1037-1043.
- Yoon YP.** (2009). Coloured illustration for discrimination of herbal medicine. Ministry of Food and Drug Safety. Homibooks. Daejeon, Korea. p.16.