

물오리나무 (*Alnus hirsuta*)의 기내증식에 미치는 기본배지, 탄소원 및 식물호르몬의 영향

金 京 흠·安 正 善
(서울대학교 자연과학대학 생물학과)

Effects of Mineral Media, Carbon Sources and Phytohormones on Micropropagation of *Alnus hirsuta*

Kim, Kyung Hee and Chung Sun An
(Department of Biology, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

Shoot tip explants from germinated seeds of *Alnus hirsuta* were cultured on NT (Nagata and Takebe, 1971) mineral salts medium supplemented with 6% glucose, MS (Murashige and Skoog, 1962) vitamin mixture, polyvinylpyrrolidone (PVP) and 0-50 μM 6-benzylaminopurine (BAP). Five μM BAP was found to give the highest shoot multiplication rate. Accordingly about 200 shoots were obtained for further experiments by multiplying shoots on this medium for 4-5 months. Regardless of carbon sources, NT mineral medium produced 3-12 times of shoots than MS mineral medium did. On NT mineral medium, 3% sucrose, 3% glucose and 6% glucose yielded no significant differences. It was observed that media consisting of 1/4-1/2 strength NT mineral salts, 3% sucrose and 1-8 μM IBA produced about 100% rooting rate. Almost 100% of the resulting plantlets survived after transfer to the soil by decreasing humidity stepwise.

서 론

오리나무, 보리수나무, 소귀나무 등 200여종에 달하는 목본식물들은 방선균의 일종인 *Frankia*와 질소고정 공생 관계를 이루고 있다(Torrey, 1978). 특히 오리나무속의 경우는 빠른 성장과 높은 질소 함량으로 인하여 관심의 대상이 되어 왔지만 냉한에 견디지 못하고 목재가 단단하지 못하다는 단점을 가지고 있어서, 최근에는 이러한 결점을 조직배양 기술을 이용하여 보완하고 있다(Périnet and Lalonde, 1983).

오리나무속의 경우 재분화가 불가능하므로 적은 공간과 간단한 시설로 단시간에 다량의 클론을 생산할 수 있는 기내증식(micropropagation) 방법이 개발된 후 최근에는 *in vivo* transformation 방법에 의한 형질전환도 가능하게 되

었다(Séguin and Lalonde, 1990). 기내증식은 주로 액이나 부정아의 증식으로 식물체를 대량으로 생산하는 기법이며, I) 무균배양에 의한 shoot 정단의 확립, II) 시토키닌(cytokinin) 처리로 유도된 bud로부터 줄기의 대량증식 및 계대 배양, III) 대량 생산된 줄기의 발근 및 토양으로의 이식 과정을 거친다(Dodds and Roberts, 1985).

오리나무속에 대한 기내증식은 Garton 등(1981)에 의해 처음 시작되었으며 유식물의 bud나 온실에서 재배한 식물의 줄기정단(Périnet and Lalonde, 1983; Tremblay *et al.*, 1984) 또는 2-25년된 성숙한 나무로부터 식물 재료를 수확하여 기내증식에 성공하였다(Périnet *et al.*, 1988; Barghchi, 1988). 그러나 식물에 따라 실험방법과 실험조건이 다양하므로 특정 식물을 성공적으로 기내증식시키기 위해서는 가장 적합한 조건을 실험을 통해서 확립해야만 한다.

우리나라는 산악지대와 생산성이 낮은 해변가, 사구 등이 국토의 대부분을 차지하고 있으므로, 오리나무속 식물과 같은 질소고정 능력이 있는 숙주식물을 효과적으로 이용

본 연구는 1991년도 서울대학교 발전기금 학술연구비 지원에 의하여 수행된 것임.

하기 위한 연구가 절실하다. 그러나 오리나무속을 비롯한 대부분의 속주식물에 대한 연구가 부진하여, 물오리나무로부터 칼루스를 확립하고 이를 현탁배양하여 얻은 원형 질체로부터 microcallus를 얻었다는 보고(Kim and An, 1990) 등이 있을 뿐이며 기내 증식에 관한 연구는 전혀 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 지금까지 재분화가 이루어지지 않고 있는 물오리나무를 대상으로 하여 유용한 클론 또는 형질 전환될 클론을 대량증식시키기 위한 연구의 일환으로 기내증식의 각 단계에 미치는 기본배지, 탄소원, 식물호르몬 등의 영향을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

종자 발아. 관악산 서울대학교내에서 채집한 물오리나무(*Alnus hirsuta*)의 종자를 4°C 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다. 종자를 5.25% sodium hypochlorite로 15분간 교반시켜 표면 살균한 후 멸균 증류수로 5회 세척하고 0.5% glucose가 포함된 0.5% 환천배지에서 옮겨 28°C 암소에서 1주일간 배양하였다. 발아한 종자들은 동일한 조성의 배지에 옮겨서 16시간 광주기, 22°C/26°C의 배양기에서 배양하였으며 이후의 실험에서도 동일한 조건을 유지하였다.

클론의 확립. 제 1엽이 나오기 전에 하배축 부위를 절단하여 떡잎을 포함한 상부(0.5-1 cm)를 NT(Nagata and Takebe, 1971) 무기염류 조성에 MS 배지(Murashige and Skoog, 1962)의 비타민 혼합체를 넣은 기본 배지에 심어 shoot 증식을 유도하였다. 이때 0.65%의 Bacto agar(Difco)와 250 mg/l의 PVP(polyvinylpyrrolidone)를 첨가하였고 생장조절 물질로는 0-50 µM의 BAP, 탄소원으로는 3%의 sucrose 또는 6%의 glucose를 사용하였다. 4주간격으로 2번 계대배양한 후 shoot 증식에 가장 적합한 BAP의 농도를 결정하였다. 이 배지에서 shoot 증식이 양호한 절편체를 선별하여 3 mm 이상의 shoot가 3개 정도 포함되도록 분리한 후 동일한 배지에 옮겨 4주 간격으로 계대배양하면서 한 클론에서 약 200개의 shoot를 4-5달 동안 확립하여 이후의 실험 재료로 사용하였다.

Shoot 증식에 미치는 무기염류 조성과 탄소원의 영향. MS 무기염 또는 NT 무기염에 각각 3%(w/v)의 sucrose 또는 3%의 glucose, 6%의 glucose를 첨가하여 총 6종류의 조합을 만들고 5 µM의 BAP, MS 배지의 비타민 혼합체 및 250 mg/l의 PVP를 첨가하였다. pH를 5.6으로 맞춘 후 agar를 0.65%로 첨가하고 100 ml 삼각 flask에 50 ml씩 넣어 습윤 멸균하였다. 각 실험구당 30개의 shoot를 준비하여 flask에 3개씩 심었다. 배양기에서 3주 간격으로 5번 계대배양하면서 각 배지에서 길이가 3 mm 이상되는

shoot의 갯수를 조사하였다.

발근 및 뿌리 발달에 미치는 무기염류의 농도, 탄소원 및 IBA의 영향. 위의 실험으로부터 shoot 증식에 가장 적합하다고 판단된 배지에서 shoot 증식을 계속한 후, 길이가 1.5 cm 이상되는 shoot를 선별하여 실험 재료로 사용하였다. 1/2 농도(half-strength)의 NT 무기염에 MS 배지의 비타민 혼합체, 3% sucrose, 1 µM의 IBA를 첨가한 후 pH 5.6으로 맞추고, 0.65% agar를 첨가한 배지를 발근의 기본배지로 하고, 무기염류의 농도(0, 1/4, 1/2, 1 and 2 strength)에 따른 영향, sucrose의 농도(0, 5, 10, 15, 20, 30 and 50 g/l)에 따른 영향 및 IBA(0, 1, 2, 4, 8, 16 and 32 µM)의 영향을 조사하였다. 각 실험구당 10개의 shoot를 준비했고 이를 10 ml의 습윤멸균한 배지가 들어있는 지름 20 mm되는 배양 튜브에 1개씩 심은 후 배양기에서 약 1 개월 동안 배양하였으며 같은 실험을 3회 반복하였다.

토양으로의 이식. 발근한 개체의 뿌리에 붙어 있는 agar를 수도물로 제거하고 30분간 습윤멸균한 vermiculite가 든 화분에 3개씩 옮겨 27°C의 광배양실에서 배양하면서 1/4로 희석한 Hoagland 용액을 3일에 한번씩 공급하였다. 배양 초기에는 부영한 비닐주머니를 씌워 습도를 유지하였으며 광배양실에서 한달간 배양한 후 큰 화분에 옮겨 온실에서 배양하였다.

결과 및 고찰

클론의 확립. 목본식물의 기내배양에는 절편체의 느린 생장, 오염 및 폐놀화합물의 독성 등 여러 문제점이 있다. 본 실험에서는 표면 살균한 종자를 발아시키고 배양하여 실험 재료로 사용함으로써 오염을 방지하였고, shoot 증식배지에 PVP를 첨가함으로써 폐놀화합물의 독성을 감소시킬 수 있었다(Bhojwani and Razdan, 1983).

BAP의 농도에 따른(0, 1, 5, 10, 25 and 50 µM) shoot 증식율을 조사한 결과 5 µM의 BAP가 첨가된 배지에서 가장 많은 shoot가 생성되었다(Fig. 1). BAP의 농도가 높은 경우는 shoot의 길이생장 및 생성된 bud의 발달이 이루어지지 않았고 조직이 딱딱하였다. 1 µM의 BAP가 첨가된 경우 bud의 생성을 면에서는 5 µM의 BAP가 첨가된 배지에 비해 떨어졌으나 shoot의 생장 상태면에서는 양호한 것으로 나타났으며, BAP가 전혀 첨가되지 않은 배지에서는 뿌리의 생성을 볼 수 있었다. 이러한 결과는 오유신이 오리나무 종의 shoot 증식을 촉진하지 못하고(Périnet and Lalonde, 1983; Barghchi, 1988) BAP만을 1.0-5 µM 농도 사용하였을 때 최대의 증식율을 나타내었다(Séguin and Lalonde, 1990)는 보고와 일치한다.

5 µM의 BAP가 첨가된 배지에서 shoot 증식이 양호한 클론을 선별하여 동일한 배지에서 계대배양을 하였을 때,

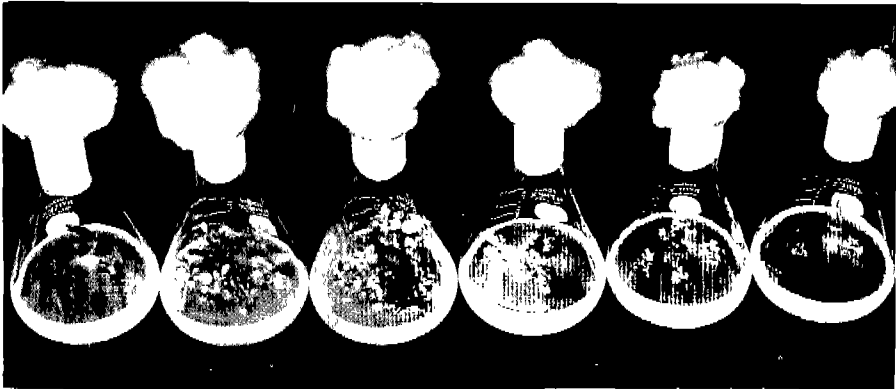


Fig. 1. Effects of various concentrations of BAP (from left to right: 0, 1, 5, 10, 30 and 50 μ M) on shoot multiplication of *A. hirsuta*.



Fig. 2. Multiple shoot formation of *A. hirsuta* on multiplication medium with 5 μ M BAP after 4 weeks of culture.

shoot의 성장과 더불어 절간 부위와 밑동 부위에서 액아와 부정아가 계속적으로 발달하여 계대배양이 계속됨에 따라 shoot 증식율은 점점 증가하였다(Fig. 2). 이처럼 칼루스를 형성하지 않고 부정아의 형성이나 액아의 발달을 통해 shoot가 직접 유도되는 것은 *Alnus glutinosa*(Périnrt and Lalonde, 1983), *A. crispa*(Tremblay et al., 1984), *A. cordata*(Barghchi, 1988) 및 *Elaeagnus angustifolia*(Bertrand and Lalonde, 198) 등의 결과와 유사하다.

Shoot 증식에 미치는 무기염류 조성 과 탄소원의 영향. MS 무기염류 과 NT 무기염류 과 3%의 sucrose, 3%의 glucose 또는 6%의 glucose 과 조합한 배지에서 5번의 계대배양을 실시한 결과, 하나의 shoot가 NT 무기염류 배지에서는 48-

54개로 증가한데 비해 MS 배지에서는 4-19개로 증가하여 NT 무기염류가 MS 무기염류에 비해 3-12배의 증식을 나타내었다(Figs. 3 and 4). 이러한 결과는 물오리나무의 칼루스 형성에 미치는 NT 무기염류의 영향과 일치하며(Kim and An, 1990), 그 이유는 MS 배지의 경우 NH_4NO_3 , KNO_3 , $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 등이 NT 배지보다 2배 더 많이 첨가되어 있어 과량의 이온들이 물오리나무 조직에 저해요인으로 작용하기 때문인 것으로 사료된다. 이와 관련된 보고로 Périnet과 Tremblay(1987)는 질소함량을 60 mM에서 31.3 mM로 줄인 MS 배지를 사용하여 *A. incana*, *A. japonica*, 및 *A. rubra*를 상업적으로 기내증식시켰다.

한편 NT 무기염류에서는 glucose의 농도를 3%, 6%로 달리하거나 3%의 sucrose로 대체하였을 때 shoot 증식에 큰 차이가 나타나지 않았는데(Figs. 3 and 4) 이 결과가 물오리나무가 당원에 대한 선호도가 없음을 의미하는지 아니면 *in vitro* conditioning의 영향을 보여주는 것인지는 명확히 판단할 수 없었다. 왜냐하면 *A. cordata*의 경우 초기에는 glucose가 선호되나 6번의 계대배양을 거친 후에는 sucrose나 glucose에 대한 차이를 보이지 않아 기내배양을 계속함에 따라 *in vitro* conditioning이 일어날 수 있기 때문이다(Barghchi, 1988). MS 무기염류에서는 glucose의 농도가 3%일 때 shoot 증식이 가장 높은 반면 6%일 때 매우 저조하였다.

발근 및 뿌리 발달에 미치는 무기염류의 농도, 탄소원 및 IBA의 영향. 1/2 농도의 NT, MS 무기염류 과 3%, 6% glucose 또는 3% sucrose를 조합하여 발근에 적합한 무기염류 조성 및 탄소원을 예비실험을 통해 조사하였다. 그 결과 무기염류는 NT 무기염류가 MS 무기염류에 비해 적합하였으며, 탄소원은 3%의 glucose나 sucrose가 적합하였고 이들 간의 차이는 별로 없었으므로(자료는 제시하지 않았음) 발근의 기본배지로는 1/2 농도의 NT 무기염류 과 3%의 sucrose를 사용하였다.

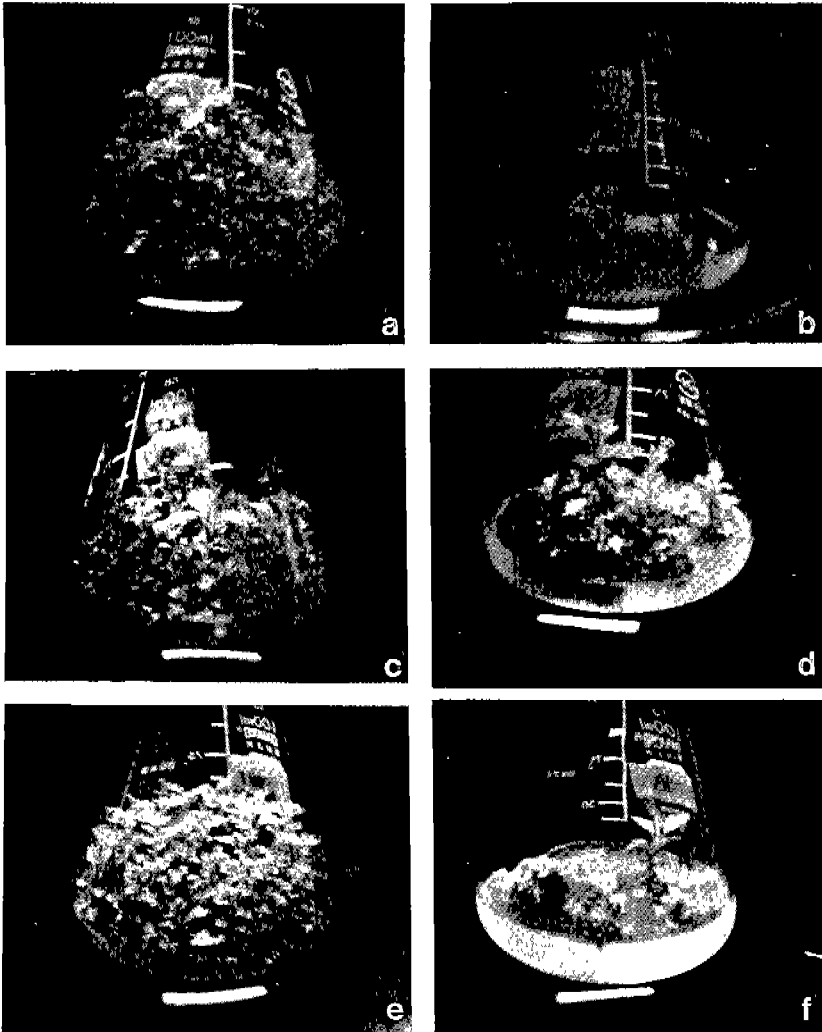


Fig. 3. Shoot multiplication of *A. hirsuta* on 6 different multiplication media after 5th subculture (bar=2 cm). (a) NT mineral medium containing 6% glucose, (b) MS mineral medium containing 6% glucose, (c) NT mineral medium containing 3% glucose, (d) MS mineral medium containing 3% glucose, (e) NT mineral medium containing 3% sucrose, (f) MS mineral medium containing 3% sucrose.

NT 무기염의 농도에 따른 발근율을 조사한 결과(Figs. 5 a and 6), 1/4 및 1/2 농도일 때 약 100% 발근하였고 뿌리 발달도 양호하였으나 1, 2배로 농도를 높이면 거의 발근되지 않았으며 특히 2배의 농도에서는 shoot의 정단 부위가 고사하였다. 무기염을 전혀 제공하지 않은 배지에서도 60% 정도의 발근율을 보였으나 뿌리 및 shoot의 발달이 이루어지지 못했다. 이러한 결과는 다른 오리나무종의 경우와 일치한다(Seguín and Lalonde, 1990).

Sucrose의 농도에 따른 발근율을 살펴본 결과, sucrose의 농도가 30 g/l까지 증가함에 따라 100%까지 발근율이 증가했으나 50 g/l에서는 약 60%로 낮아졌으며 또한 suc-

rose의 농도가 낮아질수록 뿌리가 늦게 생성되었다(Fig. 7). 기내배양된 shoot는 광합성을 할 수 있다 하더라도 발근 단계는 많은 에너지를 필요로 하는 과정이므로(Haissing, 1974; Thorpe, 1982) 배지에 적합한 탄소원을 제공하는 것이 필수적이며(Bhojwani and Razdan, 1983). 본 실험 결과는 이에 부합되었다.

발근에 미치는 IBA의 영향을 조사한 결과, 농도가 높아짐에 따라 뿌리 형성이 촉진되었고 뿌리수가 많아졌으며 뿌리가 굵어졌으나, 뿌리의 길이 생장 및 shoot의 생장은 고농도에서 저해되는 것으로 나타났다(Figs. 5b and 8). Périnet와 Lalonde(1983)는 *A. glutinosa*의 경우 IBA를 전혀

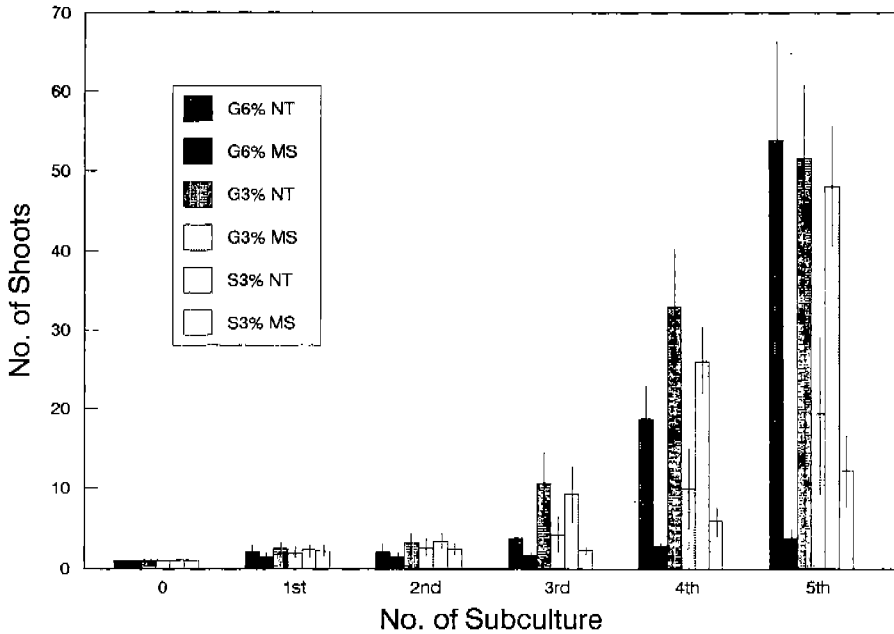


Fig. 4. Effects of carbon sources and mineral formulas on the multiplication of *A. hirsuta* shoots. The bars represent the standard deviation.

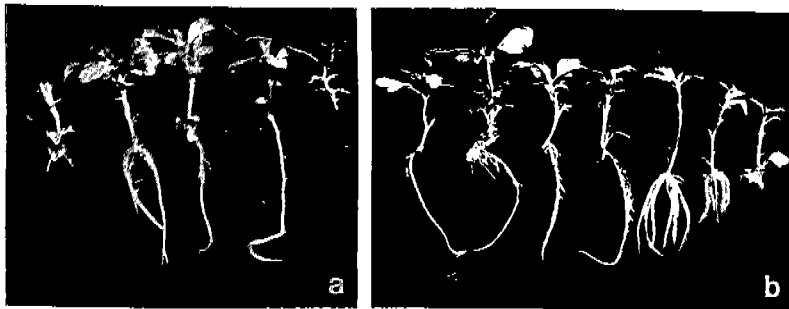


Fig. 5. Plantlets of *A. hirsuta* growing on rooting media with different concentration (from left to right: 0, 1/4, 1/2, 1 and 2) of NT inorganic salts (a) and (from left to right: 0, 1, 2, 4, 8, 16 and 32 μ M) of IBA (b).

처리하지 않아도 100%의 발근율을 보이고 2.5 μ M, 5 μ M의 IBA를 처리한 경우에는 작은 크기의 칼루스가 생성됨을 보고하였으나 물오리나무의 경우는 5 μ M보다 높은 농도에서는 칼루스가 생성되지 않았으며 호르몬이 전혀 첨가되지 않은 배지에서는 발근율은 33%로 상당히 낮았다(Fig. 8).

따라서 물오리나무의 발근배지로는 1/4-1/2 농도의 NT 무기염에 3% sucrose, 그리고 1-8 μ 의 IBA가 첨가된 배지가 최적의 것으로 판단되었다.

토양으로의 이식. 발근된 개체를 토양에 이식한 후 습도를 점차적으로 감소시키면서 토양에 적응시키는데는 10일이면 충분하였고 거의 100%의 생존율을 나타내었다

(자료는 제시하지 않았음). 광배양실에서 1개월 배양한 개체를 큰 화분에 옮겨 심은 후 온실에서 재배한 결과 생장이 모두 양호하였다(Fig. 9).

이상의 연구로 물오리나무의 기내증식에 적합한 조건이 확립되었으므로 *Frankia*와의 공생관계를 비롯한 관련연구에 기내배양된 물오리나무를 이용할 수 있을 것이다.

적 요

발아시킨 물오리나무(*Alnus hirsuta*)의 하배측 부위를 절단하여 얻은 떡잎이 포함된 상부를 6% glucose, MS(Mu-

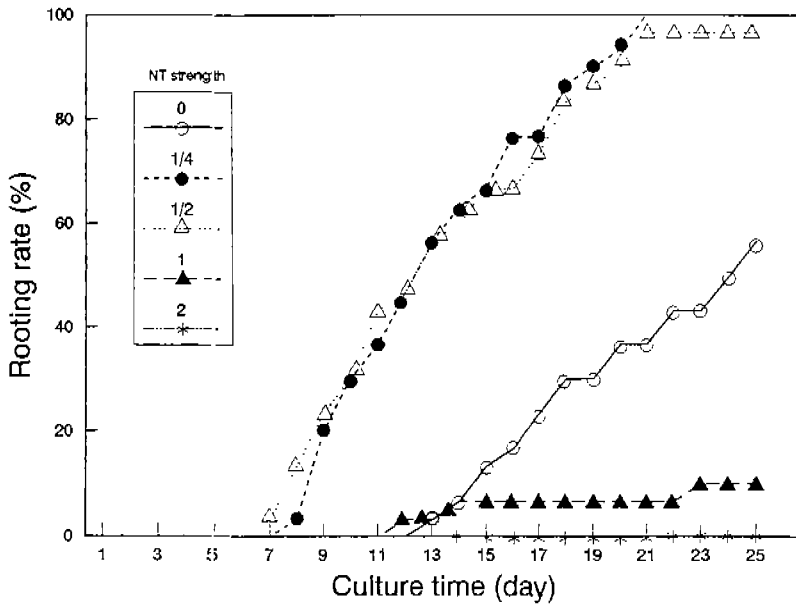


Fig. 6. Effects of various concentrations of NT mineral salts on rooting of micropropagated shoots of *A. hirsuta*.

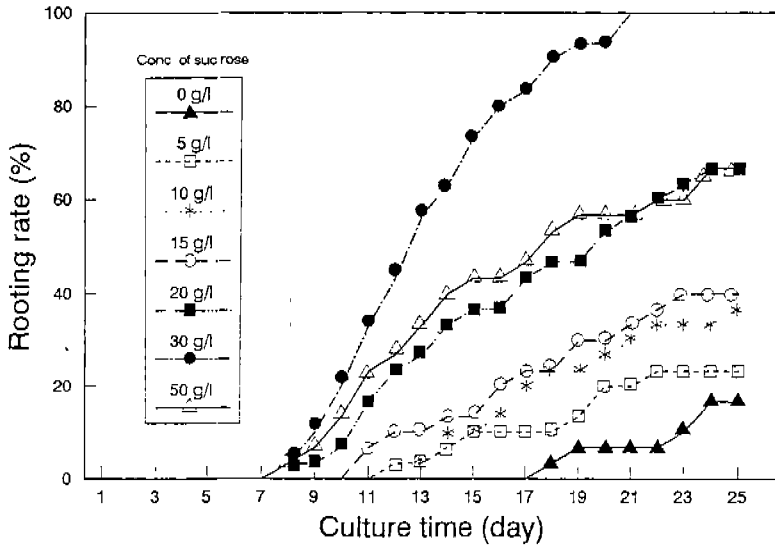


Fig. 7. Effects of various concentration of sucrose on rooting of micropropagated shoots of *A. hirsuta*.

rashige and Skoog, 1962) 비타민 혼합제, PVP(polyvinylpyrrolidone) 및 0-50 μM 의 BAP(6-benzylaminopurine)를 첨가한 NT(Nagata and Takebe, 1971) 무기염배지에서 배양한 결과, 5 μM 의 BAP가 shoot 증식에 가장 적합한 것으로 나타났다. 따라서 이 배지에서 shoot 증식을 계속하여 실험에 사용할 200여개의 shoot를 확립하였다. Shoot 증식에 미치는 무기염류와 탄소원의 영향을 조사한 결과 탄

소원에 무관하게 NT 무기염이 MS 무기염에 비해 3-12배의 증식을 나타냈으나 NT 무기염배지에서 탄소원은 특별한 차이를 보여주지 않았다. 발근에 미치는 NT 무기염, sucrose, IBA의 농도에 따른 영향을 조사한 결과 1/4-1/2 농도의 NT 무기염, 3%의 sucrose, 1-8 μM 의 IBA에서 100% 가까운 발근율을 보였으며 뿌리발달도 양호하였다. 발근된 개체를 토양에 이식하고 습도를 점진적으로 낮추면서 적

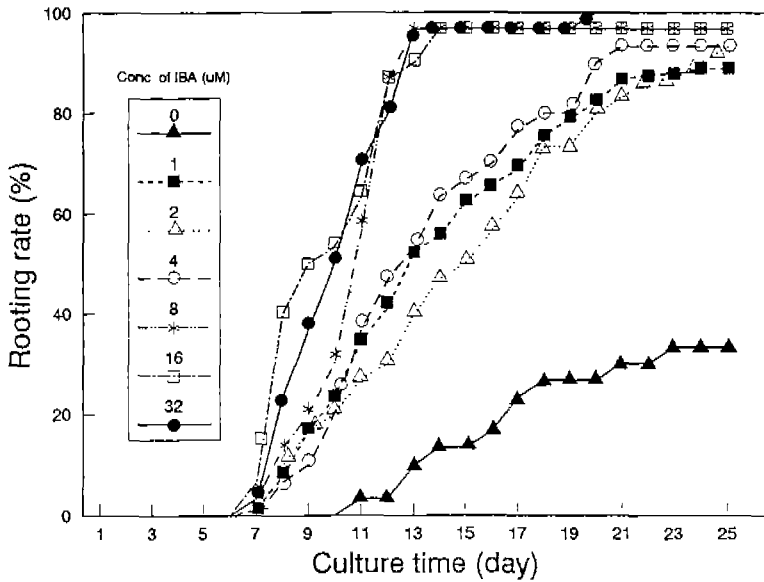


Fig. 8. Effects of various concentration of IBA on rooting of micropropagated shoots of *A. hirsuta*.



Fig. 9. Clones of *A. hirsuta* 6 months after being transferred to soil and grown in the greenhouse.

응시키면 거의 100%의 생존율을 나타내었다.

참 고 문 헌

Barghch, M. 1988. Micropropagation of *Alnus cordata* (Loisel.) Loisel. *Plant. Cell. Tissue Organ Cult.* 15: 233-244.
 Bertrand, L.J. and M. Lalonde. 1985. *In vitro* propagation

and nodulation by *Frankia* of actinorhizal Russian Olive (*Elaeagnus angustifolia* L.). *Plant and Soil* 87: 143-152.
 Bhojwani, S.S. and M.K. Razdan. 1983. *Plant tissue culture: Theory and practice.* Elsevier Sci. Pub. pp. 313-372.
 Dodds, J.H. and L.W. Roberts. 1985. *Experiments in Plant Tissue Culture.* Cambridge Univ. Press. pp. 113-121.
 Garton, S., M.A. Hosier, P.E. Read and R.S. Farnham. 1981. *In vitro* propagation of *Alnus glutinosa* Gaertn. *Hort*

Science **16**: 758-759.

Haissing, B.E. 1974. Origins of adventitious roots. *NZ. J. For. Sci.* **4**: 299-310.

Kim, H.H. and C.S. An. 1990. Induction of callus from *Alnus hirsuta* and culture of protoplast isolated from cotyledon cell suspensions. *Korean J. Bot.* **34**: 253-257.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.

Nagata, T. and I. Takebe. 1971. Plating of isolated tobacco mesophyll protoplast under agar medium. *Planta* **99**: 12-20.

Périnet, P. and M. Lalonde. 1983. *In vitro* propagation and nodulation of the actinorhizal host plant *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Plant Sci. Lett.* **29**: 9-17.

Périnet, P. and F.M. Tremblay. 1987. Commercial micropropagation of five *Alnus* species. *New Forest* **3**: 225-230.

Périnet, P., G. Vallée and F. M. Tremblay. 1988. *In vitro*

propagation of mature trees of *Alnus incana* (L.) Moench. *Plant Cell, Tissue, Organ Cult.* **15**: 85-89.

Séguin, A. and M. Lalonde. 1990. Micropropagation, tissue culture, and genetic transformation of actinorhizal plants and *Betula*. In, *The Biology of Frankia and Actinorhizal plants*, C.R. Schwintzer and J.D. Tjepkema (eds.). Academic Press. pp. 215-238.

Thorpe, T.A. 1982. Carbohydrate utilization and metabolism. In, *Tissue Culture in Forestry*, J.M. Bonga and D.J. Durzan (eds.). Martinus Nijhoff Publ. pp. 325-368.

Torrey, J.G. 1978. Nitrogen fixation by actinomycete-nodulated angiosperms. *Bioscience* **28**: 586-592.

Tremblay, F.M., X. Nesme and M. Lalonde. 1984. Selection and micropropagation of nodulation and non-nodulating clones of *Alnus crispa* Pursh. *Plant and Soil* **78**: 171-179.

(1992. 4. 16 接受)