

## 상수리나무 器內培養에서의 Pulse處理에 의한 줄기증殖 및 Peat Plug를 이용한 참나무類 기내줄기의 器外插木<sup>1</sup>

文興奎<sup>2</sup> · 尹 陽<sup>2</sup> · 孫聖鎭<sup>2</sup> · 李錫求<sup>2</sup> · 李在善<sup>3</sup>

### ***In vitro* Shoot Proliferation by Pulse Treatment from Shoot Cultures of *Q. acutissima* and *Ex vitro* Root Induction Using Peat Plug Systems in *Quercus* spp.<sup>1</sup>**

Heung Kyu Moon<sup>2</sup>, Yang Youn<sup>2</sup>, Sung Ho Son<sup>2</sup>, Suk Koo Lee<sup>2</sup>, and Jae Seon Yi<sup>3</sup>

#### 要 約

상수리나무 幼苗로부터 器內증殖된 줄기를 材料로 BA 단독 혹은 BA와 zeatin이 混合添加된 滅菌水和 WPM 液體培地에 BA 혹은 BA와 zeatin이 混合添加된 溶液의 pulse 處理에 의한 줄기증殖 效果를 檢討하였다. 또한 器內증殖中인 상수리나무, 굴참나무, 졸참나무 및 신갈나무를 材料로 peat plug를 이용한 器外插木을 實施하였다. BA 혹은 BA와 zeatin이 混合된 滅菌水 處理에는 앞서 기술한 液體培地和 함께 처리한 것보다 증殖效果는 減少되었으나 줄기생장은 다소 良好하였다. 處理는 1시간 처리하였을때 有效하였으며, 處理時間이 길어질수록 줄기발생 및 生長이 減少되며 유리화 현상이 나타났다. BA의 單獨處理는 BA와 zeatin의 混合處理보다 증殖에 效果的인 반면 건전한 줄기의 유도는 BA와 zeatin의 混合添加가 主效하였다. Peat plug를 이용한 器外插木에서 상수리나무와 굴참나무는 높은 發根力이 유지되어 實用的 應用이 可能하였으나, 졸참나무와 신갈나무는 頂端壞疽로 枯死되어 發根力이 低調하였다. 本 研究는 pulse 處理에 의한 줄기증殖 및 peat plug를 이용한 器外插木의 效果和 그 問題點 等を 檢討하였다.

#### ABSTRACT

Methods for shoot proliferation via pulse treatment onto the microshoots of *Quercus acutissima*, and *ex vitro* root induction using peat plug systems of the microshoots of 4 oak trees were described. Pulsing solution was prepared by the addition of BA and/or BA plus zeatin onto the aqueous WPM and sterilized distilled water. Using the solution, pulsing time was adjusted at different levels (0, 1, 2, 5, 9, and 24 hours). Although the effect of pulsing solution prepared by the addition of cytokinins onto the sterilized distilled water was slightly lower in shoot proliferation rate, a little higher in shoot elongation was observed compared with that of aqueous WPM. One hour of pulse treatment revealed best in shoot proliferation and its elongation, whereas the increment of pulsing time slightly suppressed the response. In addition, prolonged pulse time resulted high frequency of hyperhydric shoot appearance. Single treatment of BA was better in shoot proliferation than that of BA combination with zeatin, whereas the latter treatment usually showed rapid and healthy shoot growth.

For *ex vitro* root induction using peat plug systems, black oaks (*Q. acutissima* and *Q. variabilis*) revealed excellent rootability compared with white oaks (*Q. serrata* and *Q. mongolica*). Shoot-tip necrosis of white

<sup>1</sup> 접수 1992년 12월 23일 Received on December 23, 1992.

<sup>2</sup> 임목육종연구소 Forest Genetics Research Institute, Suwon P.O. Box 24, Korea.

<sup>3</sup> 강원대학교 임과대학 College of Forestry, Kangweon National University, Chuncheon, Korea.

oaks was one of the big problems for survival. In this study, we described the effect of pulse treatment, successful *ex vitro* rooting system by the incorporation of peat plug, and the possibilities for the overcoming the obstacles on micropropagation of oaks.

Key words : *Quercus* spp. shoot culture, pulsing of cytokinins, *ex vitro* rooting

## 緒 言

種子結實의 풍흉, 種子貯藏의 問題點 및 種實害蟲의 被害 등으로 참나무류에 있어서 無性繁殖의 필요성이 많이 강조되어 왔다<sup>5,8,10</sup>. 더우기 選拔木의 無性繁殖은 選拔에 의한 改良效果를 크게 할 수 있다는 점에서 큰 長點을 가진다<sup>2)</sup>. 그러나 참나무류에 대한 從來의 接木이나 挿木繁殖法은 接木不和合性, 낮은 發根力, 增殖率의 低下 및 과다한 人件費 등으로 實用的인 측면에서 適切하지 못하였고, 이 때문에 組織培養 技法에 의한 增殖技術이 近年에 들어 다각도로 適用되고 있다<sup>3,4,7,9,14,15)</sup>.

組織培養 技術을 상업적으로 應用하기 위해서는 무엇보다 經費節減 및 培養技法의 簡素化가 要求되는데, Ahuja<sup>1)</sup>는 포플러류의 器內培養에서 初代培養, 줄기增殖, 發根 및 環境馴化의 4단계로 이루어지는 器內植物體 再生의 일반적 방법을 1) 初代培養으로부터의 줄기증식, 2) 器外挿木으로 發根 및 環境馴화를 시키는 2단계 培養技法을 開發하였으며, Son<sup>7)</sup>은 雜種포플러를 材料로 이러한 2단계 植物體 再生技法을 實用化시킨 바 있다. 이러한 器內培養 技法을 適用하는데 있어서 중요한 요인으로는 다경줄기의 유도를 위한 적절한 방법과 增殖된 줄기의 效率인 發根 및 環境馴화에 대한 技術適用을 들 수 있다.

보통 기내연속 증식을 위해서는 3-4주의 일정한 간격으로 培養體를 계속 새로운 培地로 繼代培養하여야 하며, 이 期間에 배지조제 및 繼代培養에 많은 경비와 인건비가 소요하게 되어 이러한 2단계의 배양기법은 실제 商業化에 應用可能하다는 점에서 매우 고무적인 사실이다. 배양절차를 簡素化하기위해 기내줄기에 液體培地 혹은 BA 등으로 pulse 處理하는 方法도 하나의 代案으로 제시되고 있으며<sup>6,19)</sup>, Zimmerman과 Fordham<sup>21)</sup>은 사과나무의 器內培養에서 peat plug를 이용한 效率인 發根과 環境馴화를 報告하였다. 또한 文 等<sup>8,9,10,11,12,13)</sup>은 그간의 研究結果

에서 참나무類 無性繁殖의 實用化 可能性을 檢討한 바 있으며, 특히 器內培養의 技術適用에 있어서는 培養技法의 簡素化를 強調한 바 있다.

本 研究은 참나무類 器內培養의 自動化 시스템 開發을 위한 기초자료로 活用과 아울러 省力化를 위한 重要要因으로서 pulse 처리 및 peat plug를 이용한 器外挿木의 效果를 調査하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 液體培地의 pulse 處理 效果

腋芽培養으로 器內增殖中인 상수리나무 줄기를 切片體하여 0.2mg/l의 BA가 添加된 WPM 培地<sup>6)</sup>에서 18개월간 增殖하였다. 그 후 1% 活性炭이 添加된 WPM 배지에서 4주간 배양하고, 腋芽가 1-2개씩 볼도록 調整하여 WPM control 培地에 배양병(8×15cm)당 4개씩 置床하였다. 植物生長調節物質의 效果를 검토하기 위해 BA 2.0 mg/l 혹은 BA와 zeatin이 2.0 및 3.0mg/l 含有한 滅菌水와 WPM 액체배지를 절편체가 잠기도록 분주하였다. 처리는 0, 1, 2, 5, 9, 24 시간으로 하였으며 분주한 液體를 제거한 뒤 25±2°C, 16時間 일장 및 3,000Lux로 照明되는 培養室에서 培養 5주 후에 다경줄기 형성 및 生長을 調査하였다.

### 2. Peat plug를 이용한 器外挿木

0.2mg/l BA가 添加된 WPM 培地에서 器內增殖中인 상수리나무, 굴참나무, 줄참나무 및 신갈나무를 供試材料로 하였다. 供試材料는 4주 간격의 繼代培養으로 18주간 增殖한 후 器外挿木을 실시하였다. 줄기는 길이 3cm 이상되는 것을 재료로 하였으며 절단 즉시 기부를 2% IBA powder로 粉衣하고 peat plug에 器外挿木하였다. 挿木後 충분히 灌水해주고 간헐적인 급수를 하며 溫度 25±2°C, 1일 16時間 500Lux로 照明되는 培養室에서 4주간 배양하였다. 그 후 成績 調査를 實施하여 뿌리가 1개이상 나온 것을 발근

개체로 조사하였다.

**結果 및 考察**

**1. 液體培地の pulse 處理效果**

표 1은 멸균수와 WPM에 BA를 첨가한 용액의 pulsing에 대한 결과를 나타내었다. 液體培地の pulse 처리는 BA가 함유된 滅菌水 處理로서도 增殖效果가 있으며, 培地와 더불어 處理하는 경우보다 그 效果가 減少되지 않았다. 따라서 기내출기의 증식은 한천배지를 지지물로 이용하여

BA 등의 cytokinin 액체처리로서도 증식이 기대될 수 있었다. 그러나 BA 0.2mg/l 첨가된 WPM 固體培地에서의 增殖效果(文等未發表資料, 1992)보다는 低調하였다. 한편 處理時間에 따라서는 줄기유도나 길이생장에 顯著한 差異가 있었다. Pulsing은 1시간 처리시 가장 양호하였고 그 이상의 처리는 줄기증식이나 신장생장을 阻害하였다. Vermeer와 Evers<sup>19)</sup>는 *Q. robur*의 胚培養에서 液體培地の pulse 處理로서 연속적으로 發根을 위한 줄기생산이 可能하다고 하였으며, 배지의 영양소 濃度를 다르게 하여 처리한

**Table 1.** Effect of BA pulse treatment on shoot proliferation and elongation of *Q. acutissima* microshoots<sup>a</sup>. Values are means ± SD.

Pulse type <sup>b</sup>	Treatment hours	No. of shoots cultured	Mean no. of shoots	Mean length of shoots(cm)
I	0	14	1.0±0.0	0.3±0.1
	1	26	3.9±1.5	1.4±0.9
	2	42	3.6±1.4	1.5±1.2
	5	45	3.8±1.8	1.2±0.9
	9	42	3.3±1.6	1.2±0.9
	24	60	3.4±1.5	1.1±0.9
II	1	24	3.0±1.2	1.7±1.1
	2	26	3.6±2.6	1.6±1.1
	5	21	3.1±1.0	1.4±1.0
	9	15	3.4±1.7	0.9±0.5
	24	17	2.1±1.0	0.7±0.5

<sup>a</sup> Data were taken after 5 weeks in culture.

<sup>b</sup> 2.0mg/l of BA was added to aqueous WPM and sterilized distilled water for I and II treatment, respectively.

**Table 2.** Effect of BA and zeatin pulse treatment on shoot proliferation and elongation of *Q. acutissima* microshoots.<sup>a</sup> Values are means±SD.

Pulse type <sup>b</sup>	Treatment hours	No. of shoots cultured	Mean no. of shoots	Mean length of shoots(cm)
I	0	17	1.0±0.8	0.7±0.5
	1	19	3.7±1.5	1.9±1.6
	2	18	3.1±1.8	1.6±1.3
	5	14	2.7±1.8	1.3±1.0
	9	15	2.5±1.2	1.3±1.1
	24	9	2.7±1.3	1.3±0.9
II	1	16	3.8±1.3	1.9±1.5
	2	14	2.2±1.0	1.6±1.0
	5	16	1.8±0.9	1.2±0.6
	9	4	1.5±0.8	1.3±1.1
	24	9	1.3±0.7	0.8±0.3

<sup>a</sup> Data were taken after 5 weeks in culture.

<sup>b</sup> 2.0mg/l of BA and 3.0mg/l zeatin were added to aqueous WPM and sterilized distilled water for I and II treatment, respectively.

경우 줄기增植에 있어서 처리간 차이는 없었지만 BA 濃度에 따라서는 差異가 있다고 하였는데, 이는 本 實驗의 結果와 一致한다. 그러나 BA 농도별 및 처리시간에 따른 pulse 처리 효과는 앞으로 검토되어야 할 과제이다. BA와 zeatin의 混合處理는 BA의 單獨處理보다 줄기의 증식면에서는 효과적이지 못하였으나(표 2) BA와 zeatin의 共助處理의 경우 BA의 單獨處理보다 전진줄기의 形成에는 효과가 있어 앞으로 多樣한 濃度구배의 共助處理 效果에 대한 檢討가 必要하다. 처리시간은 1시간 처리시 두가지 pulse 형태에서 가장 양호하였으며 처리시간이 길어질수록 줄기형성수 및 신장생장의 減少는 상기한 BA의 單獨處理와 같은 傾向이었다.

以上の 結果로 볼때 液體培地의 pulse 처리는 BA만의 단독처리로서도 增植效果가 있다고 思料되며, 時間은 2.0mg/l BA 濃度에 1時間 처리가 主效하다고 判斷된다. Pulse 처리는 배양병을 이용 증식된 줄기에 大量으로 처리할 수 있다는 점에서 繼代培養 등에 요구되는 經費 및 人力의 節減效果가 크다고 생각되지만 增植效果는 固體培地에서 보다 다소 떨어지므로 pulse 처리는 증식된 재료의 發根誘導나 器外插木材料 등의 증식에 앞서 1회 처리함이 적절할 것으로 사료된다. 한가지 問題點은 pulse 처리시 줄기가 배지속에 잠기게 되므로 처리후의 生長에 유리화 현상이 나타나는 점이다. 유리화는 특히 處理 時間이 경과될수록 현저하였는데 유리화된 增植줄기는 發根力이 저조하며, 環境馴化에도 어려움이 있어 pulse 처리시 考慮해야될 內容으로 判斷되며, BA의 농도를 高濃度로 하여 처리시간을 短縮시키는 方法도 하나의 解決方案이 될 수 있을 것이다.

## 2. 器外插木

Peat plug를 이용한 器外插木은 增植된 줄기의 發根 및 土壤活着을 직접 床土에 適用할 수 있다는 점에서 매우 效率的이었다(Fig. 1). 상수리나무는 100%, 굴참나무는 98.0%로서 매우 높은

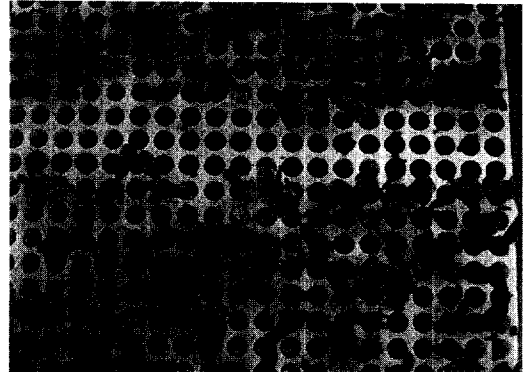


Fig. 1. Acclimatization of microshoots of *Quercus acutissima* using the peat plug systems under intermittent misting and partially shaded growth chamber.

Fig. 2. Root induction development from the microshoots of *Q. acutissima* at 3 weeks after transplantation into peat plugs.

Table 3. Effect of peat plug systems for the *ex vitro* root induction from microshoots of *Quercus* species.<sup>a</sup>

Species	Rooting substances	No. of microshoots cutted	Rooting rate (%)	Mean no. of roots
<i>Q. acutissima</i>	2% IBA	200	100.0	3.6
<i>Q. variabilis</i>	"	200	98.0	2.3
<i>Q. serrata</i>	"	150	42.0	1.7
<i>Q. mongolica</i>	"	150	30.0	1.5

<sup>a</sup> Data were taken after 4 weeks in culture.

發根力を 나타냈으며 뿌리의 發達도 良好하였다. 그러나 줄참나무 및 신갈나무는 各各 42.0%, 30.0%로 낮은 發根력을 나타냈다(표 3). 이 두 樹種은 발근되기 以前에 나타나는 정단괴저로 대부분 枯死되는 것으로 觀察되었다. 따라서 이 樹種들의 發根力 및 活着率을 높이기 위해서는 괴저방지를 위한 실험이 요구된다. 이러한 괴저현상은 줄기유도시 첨가된 BA 등의 減少, Ca의 缺乏 및 양료의 不足 등으로 나타나므로 挿木後에 BA 등의 液體撒布나 液肥의 灌水 등이 要求된다<sup>16,20</sup>. 이와 함께 무엇보다 건진하게 줄기를 增殖시키는 技術이 발근시 나타나는 問題點의 解決方案이 될 수 있을 것이다.

發根苗는 2-5個의 1次不定根과 측근발달이 양호하였다(Fig. 2). 따라서 peat plug를 이용하여 直接發根시킴으로서 省力化와 더불어 좁은 面積에서 大量取扱이 가능하고, 管理가 용이하여 器內培養을 통한 實用化에 매우 有用한 方法으로 생각되었다. 발근묘는 측근발달이 양호하여 차후 移植묘의 環境馴化 및 土壤活着에도 어려움이 없었다. Tomita와 Kondo<sup>18)</sup>는 상수리나무 성숙목 줄기의 器內發根에서 기저부에 생기는 켈러스의 부패로 활착률이 매우 저조하다고 보고하였는 바 본 실험에서와 같이 peat plug를 이용 직접 삽목 발근 시킬 경우 토양활착의 어려움은 없을 것으로 推定된다. 반면 peat plug는 보습력이 매우 높아 발근상이 과습하지 않도록 적절한 통기유지가 필요하였다. 발근된 유묘는 溫室에서 直接 環境馴化가 가능하였으며, 지속적인 생장을 위해서는 低溫處理와 液肥의 灌水가 要求되었다.

### 結 論

植物生長調節物質이 添加된 滅菌水 혹은 液體培地를 상수리나무 器內줄기에 pulse 處理하여 繼代培養에 대한 省力化를 가져올 수 있었으며 앞으로 組織培養 自動化 시스템 개발을 위한 基礎資料로 활용이 가능하다. 그러나 液體培地の pulse 처리는 連續培養에 있어 既存의 固體培地를 사용하는 것보다 增殖效果가 다소 떨어졌다. 따라서 pulse 處理는 기내증식 줄기에 대한 發根材料 등의 확보에 앞서 1回 處理함이 좋을 것으로 判定되었다. Pulsing은 處理時間이 經過될수록 增殖 및 줄기伸長 效果가 減少되고 유리화된

상태의 비정상적 줄기 발달이 현저하였다. 두가지 싸이토키닌의 混合處理區에서 뚜렷한 효과는 관찰되지 않았으나 앞으로 種類別, 濃度別 및 處理時間에 대한 檢討가 必要하다고 思料된다. Peat plug를 이용한 참나무류의 器外挿木은 2년에 開花되는 樹種인 상수리나무와 굴참나무는 양호하였으나, 1년에 開花되는 줄참나무와 신갈나무는 頂端壤疽로 枯死되어 發根率이 低調하였다. Peat plug의 利用은 器內줄기를 床土에 直接適用할 수 있다는 점과, 作業이 간편하고, 좁은면적에 大量의 苗木을 產出할 수 있다는 점에서 매우 有用하였으나, 壤疽防止를 위한 實驗과 挿木床이 過濕해지지 않도록 주의가 要求된다.

### 引用 文 獻

1. Ahuja, M. R. 1987. *In vitro* propagation of poplar and aspen. In: Bonga and Durzan (eds.), Cell and Tissue Culture in Forestry, Vol. 3, Martinus, Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster, p.207-223.
2. Bonga, J. M. 1982. Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity, and rejuvenation. In: Bonga and Durzan(eds.), Tissue Culture in Forestry, Martinus Nijhoff, Dr W Junk Pub. The Hague, p. 387-412.
3. Favre, J. M. and B. Juncker. 1987. *In vitro* growth of buds taken from seedlings and adult plant material in *Quercus robur* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 8: 49-60.
4. Juncker, B. and J. M. Favre. 1989. Clonal effects in propagating oak trees via *in vitro* culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 19: 267-276.
5. Kleinschmit, J. 1986. Oak breeding in Germany, Experience and Problems. In: IUFRO Conf. 13-17, Oct., Williamsburg, Virginia, p.250-258.
6. Lloyd, G. and B. McCown. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.

- 30 : 421-427.
7. Manzanera, J. A. and J. A. Pardos. 1990. Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 21 : 1-8.
  8. 文興奎 · 朴裕憲 · 李龜淵 · 金元雨. 1987. 發根促進劑 및 培養土에 따른 상수리나무의 插木發根. 林育研報 23 : 38-46.
  9. 文興奎 · 金在憲 · 朴在仁. 1987. 상수리나무 器內 axillary bud의 置床部位에 따른 多莖 및 發根誘導 效果. 韓國林學會誌 76 : 370-375.
  10. 文興奎 · 朴文漢 · 李龜淵 · 朴裕憲. 1988. 참나무屬 主要樹種의 幼齡半熟枝 및 상수리 秀型木 接木苗의 插木發根. 林育研報 24 : 42-46.
  11. Moon, H. K. and M. H. Park. 1989. The induction of sprouts and the subsequent rooting of cuttings by BAP spray with the top-pruned *Quercus acutissima* seedlings. Res. Rep. Inst. For. Gen. 25 : 188-192.
  12. Moon, H. K., Y. H. Park, K. Y. Lee, and B. S. Lee. 1991. Effect of cutting length, nodal position, leaf trimming type, and blanching on rooting from cuttings of *Quercus acutissima* seedlings. Res. Rep. Inst. For. Gen. 27 : 80-84.
  13. Moon, H. K., Y. Youn., Y. I. Hyun, and S. K. Lee. 1991. *In vitro* shoot proliferation from seedlings of half-sib families of sawtooth oak (*Quercus acutissima* C.) Res. Rep. Inst. For. Gen. 27 : 75-79.
  14. San-Jose, M. C., A. Ballester, and A. M. Vieitez. 1988. Factors affecting *in vitro* propagation of *Quercus robur* L. Tree Physiol. 4 : 281-290.
  15. San-Jose, M. C., A. M. Vieitez, and A. Ballester. 1990. Clonal propagation of juvenile and adult trees of sessile oak by tissue culture techniques. Silvae Genetica 39 : 50-55.
  16. Sha, L., B. H. McCown, and L. A. Peterson. 1985. Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110 : 631-634.
  17. Son, S. H. 1991. *In vitro* culture systems of hybrid aspen as tools for tree improvement programs and commercial applications. Ph-D Dissertation Paper. Iowa State Univ. 172 pp.
  18. Tomita, M. and T. Kondo. 1991. Factors affecting *in vitro* plantlet regeneration from axillary buds of *Q. acutissima* derived from stump sprouts. Res. Rep. For. Tree Breed. Inst. Japan, p.33-41.
  19. Vermeer, E. and P. Evers. 1987. Induction of branching and nutrient replenishment in embryo culture of *Quercus robur*. p. 260-263. In : Symposium of Plant Micropropagation on Horticultural Industries. Arlon, Belgium, 289pp.
  20. Vieitez, A. M., C. Sanchez, and C. San-Jose. 1989. Prevention of shoot-tip necrosis in shoot culture of chestnut and oak. Sci. Horti. 41 : 151-159.
  21. Zimmerman, R. H. and I. Fordham. 1985. Simple method for rooting apple cultivars *in vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110 : 34-38.