

## 작약의 미세번식에서 배지성분이 배양의 변색과 괴사에 미치는 영향

최상진\* · M.M. Meyer, Jr.<sup>1</sup>

목포대학교 원예육종학과, <sup>1</sup>미국 일리노이주립대학교 원예학과

### Effects of Medium Components on Discoloration and Necrosis of Cultures in Peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) Micropropagation

Sang Jin CHOI\* and M.M. MEYER, JR.<sup>1</sup>

Department of Horticultural Plant Breeding, Mokpo National University, Muan, 534-729; and

<sup>1</sup>Department of Horticulture, University of Illinois, IL 61801, USA. \*Corresponding author.

Stem and petiol explants of peony culture turned to brownish black soon after placing onto medium and degenerated to death. Discoloration was caused mainly by ferrous and calcium chloride. Nitrate was a main factor for the death of culture. The culture damage was increased with the increment of the medium salt strength. A few latent axillary buds were elongated to shoots without forming callus.

**Key words:** axillary bud, salt strength

작약(芍藥)은 우리나라와 일본이나 중국에서 한약재로 많이 사용되고, 일부는 정원에 심어 관상용으로 사용되지만 아직 원예적 위치는 낮다. 서양에서는 수세기 동안, 동양의 작약을 관상용으로 개발하여 근래에는 우리 나라와 일본에 수출하고 있다.

원예용 작약의 번식은 뿌리의 머리 부분에 형성되는 노두(蘆頭)를 뿌리의 일부와 함께 분리하여 심는다. 약용으로 재배할 때는 종자번식도 하지만 이것은 타화수분으로 심히 잡종화되어 균일한 개체를 얻을 수 없으므로 화훼용이나 품종 유지를 위해서는 무성번식, 즉 뿌리를 번식체로 이용하여야 한다. 뿌리에 의한 번식 속도는 1년에 평균 모주의 2배밖에 안되므로 우량 품종의 번식을 신속히 하기 위해서 조직배양법을 이용할 수 있다. 지금까지 작약 식물체의 일부를 번식체로 이용한 연구 결과는 몇 가지 있다.

Hosoki 등(1989)은 뿌리에 형성된 눈의 끝부분 2-3 mm를 절취하여 MS + GA<sub>3</sub> 1 mg/L + BAP 0.5 mg/L에 배양한 결과 여러 개의 소식물체가 재생되었으며, Vidasoba 등(1988)은 이름을 밝히지 않은 화합물 No. 33, No. 44, Bif-2, EBF-5와 Kartolin 등의 배지에서는 IBA와 NAA이 들어간 것보다 우수한 반응을 보였다고 하였다. 그러나 이들이 그

후 온전한 식물체로 성장할 수 있었는지는 알 수 없다. 또 Kunneman과 Albers(1989)는 0.2 mg/L의 IBA나 IAA에서 식물체가 재생되기는 하였으나 실용성 있는 식물체를 생산하지 못하였다고 하였다.

작약을 기내에서 번식시키려고 할 때 흔히 나타나는 문제는 접종 후 절편과 배지가 흑갈색으로 변하여 결국에는 배양이 죽기까지 하는 것이다. 이 원인은 절편의 단편으로부터 삼출되어 나오는 페놀성 물질 때문이다(Preece and Compton, 1991). 이것은 많은 경우 배양의 실패를 가져오는 주 원인이 되므로 이 피해를 경감시키기 위한 방법도 여러 가지 제시되었다(崔相鎭, 1993). 그러나 본인의 경험으로는 이 모든 방법이 작약의 미세번식에서는 효과가 없었다. 본 연구는 이 현상이 작약의 기내배양에서 배지의 어떤 기본 성분에 의해서 어느 정도 조절될 수 있음을 밝혔다.

#### 재료 및 방법

식물재료의 준비

배양 재료로 사용한 작약 품종은 겹꽃에 속하는 First Lady, Charles White 및 Nancy Nicholls이었고 포장에서 이미 저온처리 기간을 거쳐 휴면 타파가 된 뿌리를 채취하여 일부는 5°C의 냉장실에 보관하여 두고 눈을 사용하였고, 일부는 온실에 심어 식물체로 키워서 줄기와 엽병을 이용하였다. 시료채취를 위한 식물체의 생육시기는 실험목적에 따라서 차이를 두었다. 즉 배지성분의 영향을 보기위하여는 잎이 완전 전개된 후 개화 이전의 식물체에서 상부의 줄기와 엽병을 채취하고 식물체 재생을 위한 실험에서는 노두에 형성된 1-2 cm 길이의 눈과 뿌리를 토양에 심어서 10 cm 정도까지 자란 어린 식물체를 이용하였다.

### 식물재료의 살균

눈을 이용할 때는 뿌리에 형성된 2 cm의 것을 기부로부터 절취하여 수세하고 10%의 하이포아염소산나트륨( $\text{Na}(\text{OCl})_2$ )으로 표면 살균하였다. 핀셋과 메스를 이용하여 여러 겹의 껍질을 제거하고 내부에 형성된 1-2 cm 정도의 어린 싹을 노출시켰다. 내생세균의 오염을 제거하기 위하여 gentamycin sulfate 500 mg/L과 streptomycin sulfate 300 mg/L이 첨가된 액체배지에 넣고 24시간 진탕기 위에서 170 rpm으로 교반하면서 배양한 후 꺼내어 수세하고 세로로 4등분하여 한천배지에 옮겼다. 줄기나 엽병과 같은 기타 식물체 재료는 표면 살균된 것을 0.5 cm 길이로 절단하여 위와 같이 배양하고 한천배지에 접종하였다. gentamycin은 배지의 고압중기살균 전에 첨가하고 streptomycin은 살균 후에 첨가하였다.

### 배 지

배지성분의 영향을 보기위한 배지는 MS의 기본배지를 이용하였다. 수크로오스가 첨가된 상태에서 우선 대량염류 (MS I), 미량염류 (MS II), 철분급원 (MS III) 및 유기물 (MS IV) 별로 반응을 조사하였고, 다음에는 변색과 배양의 피사에 영향을 크게 미치는 군에 대하여는 유기물과 수크로오스만 첨가된 상태에서 각각의 성분별로 반응을 조사하였다. 한편 기관분화와 식물체 재생을 기대하는 배지는 1/4 MS 배지에 NAA, BA, GA<sub>3</sub> 및 TDZ를 농도별로 첨가하여 효과를 조사하였다. 고체배지에는 한천 0.8%를 첨가하였다.

모든 배양용기는 직경 25 mm의 시험관을 이용하였고 여기에 10 ml씩의 배지를 분주하고 이곳에 절편을 고체배지에서는 1개씩을 액체배지에는 크기에 따라 2-3개씩 넣었다. 처리당 배양의 수는 배지성분의 영향을 보는 경우 10개 이상이었으며 분화와 재생을 목적으로 한 때는 수 십 내지 수 백 개씩이었다.

### 조사방법

배양의 변색과 피사정도의 판정은 육안으로 보아 영향이 없는 것을 0으로 하고 아주 심한 것을 5로 하여 구분하였다. 여기서 변색은 갈색 내지 흑색으로 변한 것을 의미하고 조직의 피사는 검게 변하고 더이상 캘러스가 형성되지 않는 상태의 것이었다.

## 결과 및 고찰

### 내생 오염의 발생과 이의 제거

내생 오염 정도는 품종에 따라 차이가 있었다. Charles White는 거의 모든 절편에서 오염이 나타나지만 First Lady는 그 정도가 낮고, Nancy Nicholls는 오염이 거의 없었다. 식물체 부위별로 눈과 줄기는 심하고 엽병은 오염률이 줄기보다 훨씬 낮았는데, 이것은 줄기의 구조적 차이인 듯하다. 오염이 안 되는 줄기는 속이 단단하였으며, 그렇지 않은 것은 줄기 내부에 공간이 많았으나, 엽병은 모든 품종에서 조직이 단단하였다. 이것은 줄기속에 공간이 있고 연하면 박테리아가 쉽게 뿌리로부터 줄기까지 올라오는 것으로 생각된다. 이것을 항생제로 제거하기 위하여 gentamycin과 streptomycin을 첨가하였을 때 모든 줄기에서 오염이 나타나지 않았다. gentamycin은 살균작용이 강하고 streptomycin은 억제 작용이 강한 것으로 알려져 있으므로 살균이 안된 세균의 성장도 억제되어 오랫동안 배양에 세균 오염이 나타나지 않았다.

### 기본 배지의 반응

작약 절편을 접종하면 줄기 부분은 30분후부터 어린 눈은 수 시간 혹은 수 일후부터 배지가 암갈색 내지 흑색으로 변하였고, 이 정도가 심하면 배양물까지 죽었다. 본 실험에서는 배양의 변색에 영향을 미치는 배지 성분을 찾기 위하여 우선 MS배지를 대량 무기영양소와 미량 무기영양소, 철분급원 및 유기물 별로 구분하고 이들 만으로 된 액체와 고체 배지에 성숙된 줄기 절편을 접종하였다. 접종 5일 후 액체 배지와 2개월 후 고체배지에 나타난 결과는 Table 1과 같다.

액체배지에서는 특히 철분이 들어간 곳에서 암갈색을 내었고, 기타는 모두 엷은 황색을 띠어서 조직삼출물과 배지성분사이에 반응의 차이가 있음을 보였다. 절편을 가장 많이 변색시킨 것은 철분이었고 다음이 대량염류였으며 미량염류는 야간만을, 그리고 유기물은 전혀 절편의 변색에 영향을 미치지 않았다.

고체배지에서 미량염류만 들어간 배지에서는 캘러스 형성과 조직의 생존율이 100%였으나 대량염류와 철분만 들어간 배지에서는 캘러스 형성이 전혀 이루어지지 않았고 생

Table 1. Discoloration and growth response of peony stem-culture on different nutrient groups of MS media.

Group of nutrients	Liquid medium		Solid medium	
	Color of medium	Darkening degree of explant	Callusing frequency	Survived explants after 8 weeks
MS major salt	Yellow	3 (0-5)	0 (%)	13 (%)
MS minor salt	Yellow	0-1	100	100
MS iron	Brown	4	0	25
MS organic	Yellow	0	38	0

Table 2. Effects of MS medium salts on discoloration and death of peony stem-tissue.

Medium components in MS	Exclude all salts	Exclude major salts	Exclude minor salts	Exclude iron
Degree of discoloration in liquid medium (0-5)	0	1	5	2
Degree of death-tissue in solid medium(0-5)	0	1	5	3

존율도 각각 13%와 25%씩으로 낮은 편이었다. 유기물만 들어간 배지에서도 캘러스 형성률이 38%밖에 안되었고 조직은 전혀 생존하지 못하였다.

앞의 결과에서 대량염류와 철분의 영향은 이들의 단독효과이었으므로 다시 염류의 상호작용을 알기 위해서 유기물을 정상으로 첨가하고 염류의 성분만을 화시켜 Table 2와 같은 결과를 얻었다.

MS 액체배지에서 배지에 염류를 완전히 제거시키면 배지의 변색이나 조직의 괴사가 전혀 없으나 대량염류를 제외시키면 약간 나타났고 미량염류를 제외시키면 이것이 가장 심하였으며 철분을 제외시키면 이보다 낮으나 대량염류를 제외시킨 것보다는 높게 나타났다. 이것은 제외되지 않은 다른 요소의 영향인 것이 분명하므로 배양의 변색과 괴사에 가장 크게 관여한 성분은 대량염류이었고 다음이 철분이었다.

다음은 MS 대량염류 중에서 배양을 변색시키는 성분을 찾기 위하여 5개 성분을 비교하였을때 Table 3과 같은 결과를 얻었다. 여기서 배지와 조직의 색깔을 변화시키는데 가장 큰 작용을 한 성분은 CaCl<sub>2</sub>이었고, 이것은 조직단면을 검게하여 이로부터 새로운 조직의 형성(callusing)을 방해하기도 하였다. 그러나 시간이 지난 후 조직을 죽이는데 작용을 한 성분은 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>와 KNO<sub>3</sub>였고 특히 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>가 크게 작용하였다. KNO<sub>3</sub>도 독성이 높는데 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 독성이 약한 것을 보면 K보다 NO<sub>3</sub>에 원인이 있음을 알 수 있다. 따라서 MS 대량염류에서 배양의 착색은 CaCl<sub>2</sub>로부터 오고 독성은 주로 NO<sub>3</sub>에서 오는 것을 알 수 있다.

그 다음은 철분 군으로 사용된 화합물 중에서 어떤 원소가 변색에 영향을 미치는 가를 알기 위해서 MS 철분 급원으로 여러 가지 화합물을 사용하였을 때 Table 4와 같이 이

Table 3. Effects of major salts on discoloration and death of peony stem culture showing in degree(0-5).

Components of medium	Discoloration of media	Darkening of tissue	Dead tissue
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2	2	5
KNO <sub>3</sub>	3	1	4
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	4	4	0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2	2	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	0	0

들에 철분이 들어간 곳에서는 어느 경우에도 배지가 검게 변하였으나 다른 원소는 영향을 미치지 않았다. 그리고 황산철이 Na<sub>2</sub>EDTA와 함께 사용하였을 때는 단독으로 사용되었을 때보다 색깔이 더욱 검어졌다.

이상의 Table 3과 4에서 배지와 조직의 변색에 큰 영향을 끼치는 것은 Fe와 CaCl<sub>2</sub>이고 조직의 사멸은 질산태질소(NO<sub>3</sub>)이므로 배양에 암모니아태(NH<sub>4</sub>)만으로 된 성분을 공급할 수도 있으나 이미 만들어진 대부분의 배지들은 암모니아태보다 질산태 질소의 양이 훨씬 더 많고, 또 조직이 이것을 더 선호하는 것으로 되어 있다(崔, 1993).

위와 같은 결과를 토대로 배양 조직에 배지의 독성을 최소로 하면서 균형된 양분을 공급하기 위해서 MS와 이보다 강도가 낮은 1/2 MS 및 1/4 MS를 사용하였을 때 배양의 변화는 Table 5와 같이 나타났다. 여기서 MS의 농도가 낮아짐에 따라 피해는 적어져서 1/4 MS가 가장 낮았고 이보다 더 농도가 낮은 1/8 MS로 되면 배양의 생육에 필요한 양분 공급에 차질이 있을 것으로 예상되었다.

Table 4. Effects of several ferrous compounds on discoloration of peony culture.<sup>a</sup>

Compounds	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O+ Na <sub>2</sub> · EDTA	Na <sub>2</sub> · EDTA	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	KFe · EDTA	Control (exclude MS III)
Color of medium	black	light yellow	black	black	light yellow
Degree of darkening(0-5)	3	-	2	3	-

<sup>a</sup>Checked 8 hours after inoculation.

Table 5. Effects of MS medium strength on discoloration and death of peony culture showed in degree (0-5).<sup>a</sup>

MS strength	Browning of medium	Yellowing of medium	Discoloration of tissue	Darkening on cut surface in tissue	Death on solid media
MS	5	3	4	4	5
1/2 MS	3	3	3	2	3
1/4 MS	1	3	2	1	2

<sup>a</sup>Data were collected after 2 months of culture.

### 절편의 재생

줄기나 엽병절편으로부터 캘러스는 형성되었으나 이로부 터 어떤 기관의 분화나 식물체 재생은 없었다. 다만 엽병의 기부가 포함된 줄기 절편에서는 엽병의 액(腋)에서 식물체가 출현하였으나 이것은 외부에 노출되지 않은 잠재 액아가 발달된 것으로 보였다. 이러한 형태의 절편은 50%정도가 작은 액아를 형성하였고 이중에 1-2%는 다시 식물체로 발달되었으나 성장속도가 아주 느렸고, 이것을 절단하여 계대배양하면 생존하지 못하였다. 이때 사용된 배지는 BA 1 mg/L 와 GA<sub>3</sub> 2 mg/L가 함유된 1/4 MS배지였다. 이곳에 NAA 첨가는 캘러스를 형성할 뿐이었다.

### 적 요

작약절편을 접종하면 배지와 절편이 흑갈색으로 변하고 수 일후부터 배양이 죽기 시작하는데 배지성분 중에 이를 조장하는 물질이 있음을 발견하였다. 즉 변색의 주 원인은 철분과 염화칼슘(CaCl<sub>2</sub>)이었고, 절편을 괴사시키는데 가장 큰 영향을 미친 것은 NO<sub>3</sub>이었다. 이 결과를 토대로 피해가 비교적 적은 1/4 MS를 번식용 배지로 이용하여 식물체의 모든 부분을 배양하였을 때 조직으로부터 재생은 전혀 일어나지 않았다. 다만 줄기절편에서 이미 형성된 액아가 유 식물체로 성장하기도 하였으나 건전한 것으로 계속 성장하지 못하였으며 이것을 다시 번식체로 이용할 때는 초기 배

양의 절편에서 나타나는 현상과 같은 원인으로 인하여 생존하지 못하였다.

### 인 용 문 헌

- 崔相鎭(1993) 植物의 組織 細胞培養. 大韓教科書株式會社, pp. 2-6, 45-102.
- Hosoki T, Ando M, Kubara T, Hamada M, Itami M (1989) In vitro propagation of herbaceous peony(*Paeonia lactiflora* Pall.) by a longitudinal shoot-split method. *Plant Cell Reports* 8: 243-246.
- Kunneman BPAM, Albers MRJ (1989) Tissue culture of peony is not yet producing plants. *Weefselweel pioen gaat nog niet over rozen. Bloembollencultuur* 100:16-17.
- Preece JE, Comptom ME (1991) Problems with explant exudation in micropropagation. In YPS Bajaj, ed, *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol 17. High-tech and Micropropagation I. Springer-Verlag, Berlin, pp. 168-189.
- Vidasova ET, Ippolitova NY, Trushchkin V (1988) [Rapid vegetative propagation of promising peony cultivars.] *Doklady Vseoyuznoi Ordena Lenina Ordena Trudovogo Krasnogo Znameni Akademii Seliskkokhozyaistvennykh Nauk imeni VI. Lenina* No. 5, 24-26 (Ru, 11ref.) NIZI Sadovodstva Nechernozemnoi Polesy, Moscow, USSR.

(1994년 4월 8일 접수)