

노각나무(*Stewartia koreana* Nakai)의 미숙배로부터 체세포배발생에 의한 식물체 재분화

최은경* · 박학봉 · 김광수¹ · 이용기
전북대학교 원예학과, ¹전남대학교 원예학과

Plant Regeneration from Immature Zygotic Embryos of *Stewartia koreana* Nakai via Somatic Embryogenesis

Eun Gyung CHOI*, Hark Bong PARK, Kwang Soo KIM¹, and Yong Kee LEE

Department of Horticulture, Chonbuk National University, Chonju, 560-756: and

¹Department of Horticulture, Chonnam National University, Kwangju, 500-757. *Corresponding author.

When cultured on MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA alone or 1.0 mg/L 2,4-D and 0.5 mg/L BA, immature zygotic embryos of *Stewartia koreana* formed embryogenic calli and somatic embryos. To investigate effect of sucrose concentration on somatic embryo development, embryogenic calli were transferred to MS basal medium containing 1.5, 3, 6 or 9% sucrose. The greatest frequency of somatic embryos was obtained on medium containing 6% sucrose. However, addition of 1.5 or 9% sucrose to medium inhibited somatic embryo germination and development into normal plantlet. After 5 weeks of hardening cultures on medium containing 6% sucrose, somatic embryos were transferred to half-strength MS medium supplemented with 0.1% charcoal, wherein these embryo developed into the normal plantlets.

Key words: embryogenic callus, somatic embryos

차나무과에 속하는 노각나무(*Stewartia koreana* Nakai)는 내음성이 강하고 공해에 잘 견디는 수종으로 7-8월 동백꽃 모양의 백색꽃과 황색단풍 특히 홍황색의 광택이 나는 비단과같은 얼룩무늬수피를 가지고 있어 멀리서 보아도 눈에 띄일 정도로 아름다워 조경 및 원예적으로 가치가 높은 수종이다. 뿐만 아니라 목질이 단단하고 결이 고와서 고급가구재나 장식재료로 이용되고 있는 유용수종으로서 전세계적으로 동아시아와 북미지역에 8종이 분포하나 우리나라 품종이 가장 아름다운 것으로 인정되고 있다(Kim and Song, 1981; Shim et al., 1992, 1993). 우리나라에서는 가야산, 소백산, 지리산 등 전남과 경남지역에 주로 분포하고 있으나 동일지역에서도 개체간의 형태적 특성의 변이가 커서 신품종 육성 가능성이 높다(Kim and Song 1981; Shim et al., 1992). 그러나 노각나무는 생육속도가 느리고 번식이 어려워 우리나라에서는 아직 널리 보급되지 않고 있으나 미국에서는 1917년에 Wilson이 우리나라 노각나무 종자를 채집하여 국내 도입한 이후 내한성이 강한 Ballet 4품종을 육

종하였으며 현재 미국내에 Princeton Nursery 등 11개 종묘회사에서 조경수목으로 재배하여 판매하고 있다. 노각나무는 실생번식의 경우 종자의 이중휴면으로 발아에 2년 정도의 장기간이 소요되고 임실율과 발아율이 낮을 뿐만 아니라 GA 3000 mg/L과 25°C와 5°C를 각각 3개월씩 변온처리하여도 42%의 저조한 발아율을 나타내며 여러 가지 종자처리방법에 의해서도 종자 발아가 불균일하다. 따라서 주로 삼목번식에 의하여 묘목을 얻고 있으나 발근촉진을 위하여 3000 mg/L IBA처리와 70% 차광막과 미스트 시설을 필요로 하고 이러한 처리방법에 의해서 최고 90%로 높은 발근율을 보이나 삼수채취시기에 따라 그 발근율이 현저히 저하하며 삼수 발근후 이식하면 고사하는 등 번식상 많은 어려움을 가지고 있다(Lee, 1991; Shim et al., 1993).

따라서 본 연구는 우리나라의 향토수종이며 우수한 유전자원으로 인정되고 있는 노각나무의 미숙종자를 채취하여 미숙배를 기내배양함으로써 유도된 배발생캘러스로부터 식물체 재분화 체계를 모색하여 노각나무의 기내번식방법을

제시하고자 하였다.

재료 및 방법

배발생캘러스 배양

노각나무(*Stewartia koreana* Nakai)의 개화후 6주된 미숙 종자를 채취하여 70% 에칠알콜에서 10초간 침지한 후, 7% calcium hypochlorite 수용액에서 8분간 표면소독하고 무균수로 3-4회 수세하여 해부현미경하에서 2-3 mm 크기의 미숙 배만 채취하여 시험관(22 mm × 150 mm)에 1개씩 접종하여 10반복으로 하였다. 배지는 MS 기본배지에 0.2-1.0 mg/L 24-D, BA, thidiazuron (TDZ)이 여러 농도로 처리되어진 배지에 3% sucrose를 첨가한 후 pH는 5.8로 조정하여 0.8% 한천을 넣고 121°C에서 15분간 고압살균하여 사용하였다. 배양온도는 25±2°C, 2000 lx, 16시간 광주조건 하에서 5개월간 배양한 후, 각각의 생장조절제 처리에 의한 캘러스 발생정도 및 배발생캘러스, 줄기수, 뿌리 발생수를 조사하였다.

체세포배 발생 및 식물체재분화

미숙배로부터 얻어진 배발생캘러스를 선발하여 MS 기본배지에 3% sucrose와 0.8% 한천을 첨가하여 고압살균한 배지에 계대배양하였고 체세포배를 경화하고 고빈도의 체세포배를 얻기 위하여 배발생캘러스를 1.5, 3, 6, 9% sucrose가 첨가된 배지를 10 mL씩 함유한 시험관(22 mm × 150 mm)에 1개씩 계대배양하여 20반복으로 체세포배 발생 정도와 그 양상을 비교 조사하였으며 MS, 1/2 MS, 1/2 MS 기본배지에 0.1% charcoal를 혼합처리한 각각의 배지에서 체세포배로부터 식물체로 발달양상을 비교 관찰하였다.

결 과

기관분화와 체세포배 발생에 미치는 생장조절제의 영향

미숙배는 배양 3-4주후 치상체의 갈변없이 전처리구에서 갈색의 유연한 캘러스를 발생하였으며 특히 이러한 캘러스 발생은 NAA나 24-D와 TDZ을 조합한 처리구에서 가장 왕성하였고, 0.2 mg/L NAA 단독처리와 0.2 mg/L NAA와 1.0 mg/L BA 또는 TDZ 처리구에서는 캘러스 발생이후 그 표면으로부터 줄기 또는 뿌리가 발생하였다(Table 1). 1.0 mg/L 24-D와 0.5 mg/L BA 처리구에서도 33.3%의 줄기분화를 나타내었으나 줄기 신장이 저조하고 비정상적인 반면, 0.2 mg/L NAA와 1.0 mg/L TDZ 처리구에서는 줄기분화를

Table 1. Effect of growth regulators on embryogenic callus formation from immature zygotic embryos of *S. koreana*.

Growth regulators (mg/L)	No. of cultured explants	Fresh weight of (mg/test tube) ^a		No. of explants with somatic embryos (%)	No. of explants with organs (%)
		callus	embryogenic callus		
NAA 0.2	8	35.9±5.8	32.4±5.3	4(50)	*S 2(25)
24-D 0.2	6	97.3±30.5			^b R 2(33.3)
BA 0.2	10	184.8±51.2			S 4(40)
TDZ 1.0	6	82.9±5.5			
0.2	8	156.4±43.2			
1.0	8	39.2±6.8			
0.2	6	73.3±16.0	13.8±2.1	2(33.3)	
1.0	8	376.7±44.0			

^aMean±S. E.

^bS: shoot

^cR: root

Table 2. Effect of growth regulators on somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *S. koreana*.

Growth regulators (mg/L)	No. of explants	Frequency of somatic embryo formation (%)					No. of total embryos
		No. of globular embryos	No. of heart-shaped embryos	No. of torpedo-shaped embryos	No. of plantlets	No. of total embryos	
NAA 0.2	4	3(11.1)	6(22.2)	15(55.5)	3(11.1)	27	
24-D 1.0	2	2(18.1)	6(54.5)	3(27.2)		11	

이 40%로 가장 좋은 결과를 나타내었고 BA 처리구에서는 뿌리가 발생하였으나 TDZ 처리는 뿌리 발생없이 줄기만 분화하였다. 배양 5개월후 1.0 mg/L 24-D와 0.5 mg/L BA가 첨가된 배지에서는 갈색의 유연한 캘러스로부터 유백색의 자엽기로 진행되어진 체세포배가 관찰되었고 저농도의 0.2 mg/L NAA가 단독첨가된 배지에서도 배지의 접촉부위에서 노란색의 배발생캘러스와 초기 체세포배가 발생되었다. 그러나 1.0 mg/L 24-D와 0.5 mg/L BA처리구에서는 배발생캘러스 발생없이 직접 체세포배를 발생하였으나 0.2 mg/L NAA가 첨가된 배지에서는 배발생캘러스를 얻을 수 있었다. 유도된 배발생캘러스를 동일배지에 계대배양하여 계속적으로 증식유지하는 한편, MS 기본배지에 선발, 배양함으로써 체세포배를 획득할 수 있었다(Fig. 1).

Sucrose 농도에 따른 체세포배의 발달과 형태적 특성

0.2 mg/L NAA처리와 1.0 mg/L 24-D와 0.5 mg/L BA가 복합처리된 배지로부터 얻어진 배발생 캘러스 및 체세포배를 MS 기본배지에 계대배양하여 2주후에 관찰한 결과

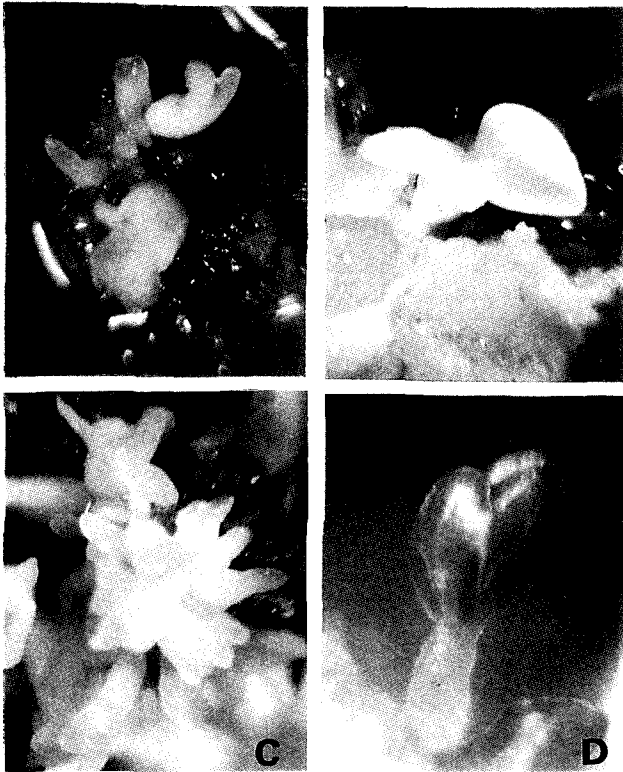


Figure 1. Somatic embryos derived from immature zygotic embryos of *S. koreana* on MS medium with 0.2 mg/L NAA. A: Torpedo-shaped somatic embryos; B: Cotyledon-shaped somatic embryos; C: Multiple somatic embryo D: Germination of somatic embryos.

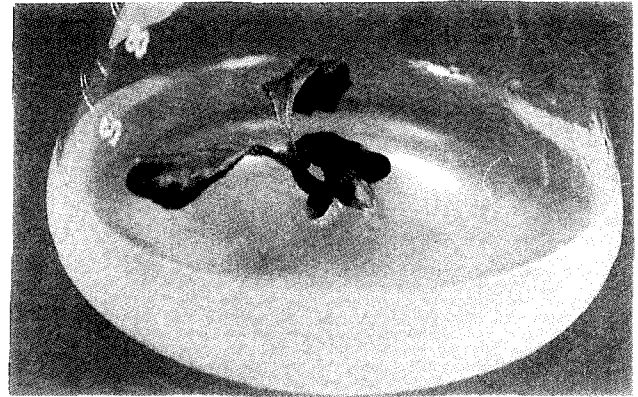


Figure 2. Plant regenerated from somatic embryos in *S. koreana*.

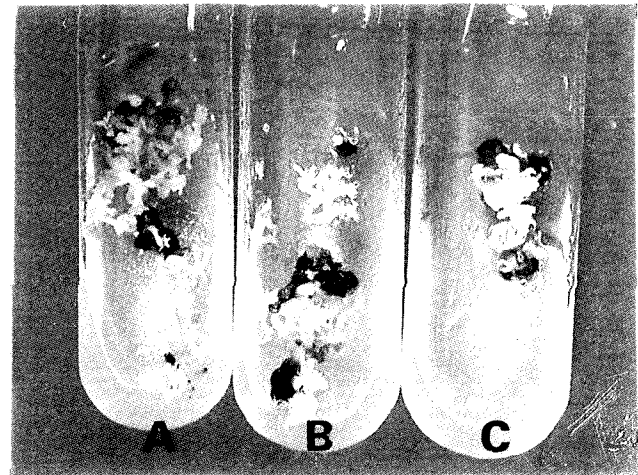


Figure 3. Effect of sucrose concentration on somatic embryogenesis of *S. korana*. A: 6% sucrose; B: 3% sucrose; C: 9% sucrose.

(Table 2), 전체 체세포배 발생수는 0.2 mg/L NAA 처리에서 체세포배 발생을 및 발달정도가 더욱 양호하였고 배양 2 주후에 이미 심장형이나 어뢰형의 후기 발달단계의 체세포배가 전체 77.7%와 81.7%를 차지하였으며 전체 체세포배중 11.1%는 정상적인 자엽과 유근을 가진 식물체로 발달하였다(Fig. 2). 다량의 체세포배를 얻기 위하여 배발생캘러스를 0.2 mg/L NAA가 첨가된 배지에서 증식하여 배발생캘러스의 세포괴를 획득하였으며 이 캘러스를 선발하여 1.5, 3, 6, 9%의 sucrose가 첨가된 배지에 5주 정도 배양하였을 때 1.5%와 9%의 지나친 저농도와 고농도 sucrose처리구에서는 체세포배 발생이 저조하였으나 배지내 3% 이나 6% sucrose 첨가에 의해서는 체세포배 발생이 더욱 양호하였다. 뿐만 아니라 9% sucrose처리구에서 얻어진 체세포배는 배양기간이 경과하여도 자엽부위가 엷록소를 띄지 않은 백색체이였으나 3%, 6% sucrose 처리구의 체세포배는 자엽 전개후 엷록소를 형성하였으며 뿌리와 줄기의 생육이 더욱 진살하였다(Fig. 3).

체세포배로부터 발아된 식물체발달

3, 6%의 sucrose가 첨가된 배지에서 5주동안 배양함으로써

정상적으로 발달되어진 체세포배를 MS, 1/2 MS와 0.1% charcoal이 첨가된 1/2MS 배지에 각각 계대배양하여 식물체로 발달양상과 발달되어진 식물체의 형태적 특성을 조사한바, 6% sucrose에서 얻어진 체세포배는 줄기와 뿌리가 동시에 정상적으로 발달되었으며(Fig. 2) 3% sucrose첨가구에서 배양되어진 체세포배는 줄기의 발달은 저조하였으나 뿌리로 발달은 왕성하여 대부분의 체세포배가 짧은 근모를 가진 뿌리로 발달되었으며 자엽은 전개되지않은 채 비대되거나 갈변되었다. 그러나 식물체 발달을 위한 배지의 조성에 따라서도 차이를 나타내어 3%, 6% sucrose 첨가구에서 경화되어진 체세포배는 모두 MS, 1/2MS보다 1/2 MS에 0.1% charcoal이 첨가된 배지에서 뿌리와 줄기의 정상적인 발달이 더욱 효과적 이었다(Fig 4). 특히 6% sucrose처리하에서 5주 동안 경화된 체세포배는 3% sucrose 처리구보다 모든 배지에서 줄기 발달에 높은 효율을 보였고 1/2 MS배지에 0.1% charcoal이 첨가된 배지에서 68%로 모두 26개체를 획득하여

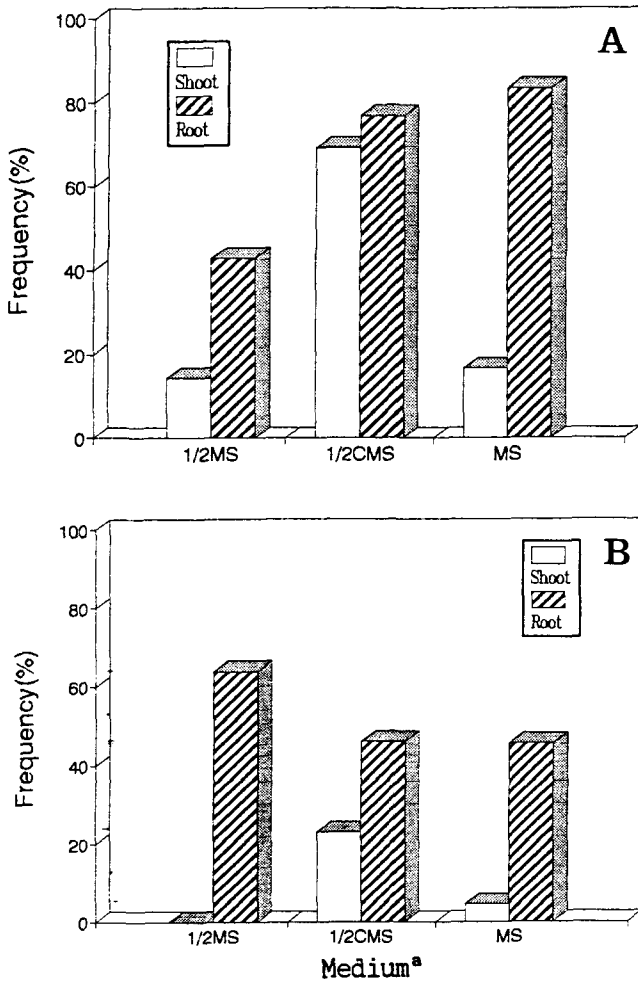


Figure 4. The frequency of plant regeneration from somatic embryos cultured on various media after 5 weeks of culture. Media containing 3% sucrose(A) and 6% sucrose(B).
 *MS: Murashige and Skoog (1962); 1/2CMS: 1/2MS containing 0.1% charcoal.

가장 좋은 결과를 나타내었다. 삼목번식시 주로 사용되는 NAA나 IBA의 효과를 알아보기 위하여 체세포배를 1.0 mg/L NAA, IBA를 각각 단독으로 그리고 0.5 mg/L BA를 조합처리하여 배양한 결과, 대부분의 세포배는 갈변 또는 캘러스화하였고 1.0 mg/L IBA와 0.5 mg/L BA처리는 오히려 줄기를 비대시켜 비정상적인 기형 줄기를 형성하였다.

고 찰

노각나무는 종자번식의 경우 파종후 1년에서 3년에 걸쳐 발아하기 때문에 주로 산에 자생하는 유목을 채취하여 보급하고 있는 실정이나 지금까지의 연구는 노각나무의 자생지 분포상태와 번식방법에 관한 연구가 이루어져 있을 뿐이다. 그러나 최근 Shim 등 (1993)은 노각나무 종자번식의 경

우 주요 분포지인 소백산의 노각나무는 임실률이 35% 이하로 매우 저조하고 9월말에서 10월초에 채종한 종자를 건조하지 않게 검정비닐에 포장한 후, 25°C에서 GA 3000 mg/L를 24시간 처리하고 25°C에서 3개월간, 5°C에서 3개월간 저온처리함으로써 파종후 7개월만에 최고 42%의 발아율을 나타내었다고 보고하였다. 노각나무는 이종 휴면종자로서 3-5개월간의 고온처리와 3개월간의 저온처리가 발아에 요구되며(Dirr and heuser, 1987) 그밖에도 채종후 건조방지와 GA 처리가 발아에 효과가 있다고 한다(Shim et al., 1993). 본 실험에서 노각나무의 종자 채취시기는 8월중순경으로 개화후 6주된 미숙종자로 MS 기본배지에 NAA, 2,4-D, BA, TDZ을 단독 또는 조합된 배지에 배양하여 0.2 mg/L NAA와 1.0 mg/L TDZ 처리구에서 캘러스로부터 40%의 줄기분화를 관찰할 수 있었는데 diphenylurea계통의 cytokinin 유사물질인 TDZ는 줄기분화와 multiple 줄기형성에 효과가 있을 뿐만 아니라(Lim et al., 1994) 두릅나무의 경우 체세포배 발생에도 TDZ의 효과가 보고되었다. 그러나 높은 cytokinin 활성으로 농도에 따라 기형적인 줄기발생이 높고 뿌리 발생은 억제하는 경향을 나타내며(Jhang et al., 1994; Park and Choi, 1992) 노각나무의 경우에도 NAA와 BA처리구에서는 뿌리가 분화되었으나 TDZ처리구에서는 뿌리발생은 관찰되지 않았다. 그러나 배지내 TDZ을 여러 농도로 처리하고 적정 배양부위를 배양하므로써 기관분화에 따른 기내대량번식도 가능하리라고 추정되어진다.

한편 노각나무의 미숙배를 MS에 치상하여 배양 5개월후 0.2 mg/L NAA처리구와 1.0 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L BA 조합처리구에서 배발생캘러스를 유기하였고 이 배발생캘러스를 MS 기본배지에 계대배양함으로써 배양 2주후 체세포배와 식물체를 관찰할 수 있었다. 기내배양에 의한 식물체 재분화 기간은 실생종자의 변온처리 기간인 7개월보다 발아 소요기간을 50여일 정도 단축할 수 있었으며 0.2 mg/L NAA처리구에서 유기된 배발생캘러스를 계속적으로 증식함으로써 체세포배 발생에 의한 기내번식이 가능하였다. 그러나 노각나무의 미숙배로부터 얻어진 체세포배는 MS 기본배지에서 체세포배의 발아 및 식물체로 전환율이 비교적 저조하였고 뿌리 발생만 왕성하였다. 따라서 체세포배발생과 식물체재분화를 위하여 배지내 1.5, 3, 6, 9%의 sucrose를 첨가하였을때 1.5, 9% sucrose첨가는 체세포배 발생과 식물체로 발달을 억제하였고 뿐만 아니라 9% sucrose 처리는 백색체 출현을 증가시킨 반면, 6% sucrose처리에는 체세포배에 경화효과를 나타내어 오히려 1/2MS에 0.1% charcoal를 첨가한 배지에 계대배양하였을 때 3% sucrose 처리구에서 유도된 체세포배보다 높은 식물체 재분화를 나타내었다. Kim 등(1987)은 샬러리의 체세포배 발생에서 6% sucrose는 체세포배의 발생과 경화에 효과가 있으나 9% 이상 고농도 sucrose는 오히려 배의 발아와 식물체로 발달을 억제시키며 비정상적인 체세포배의 발생을 촉진시킨다고 하였다.

*Medicago sativa*에서도 체세포배 성숙을 위한 배지에 6, 9% sucrose를 일정시기동안 처리하여 체세포배의 질을 향상시키는 효과를 나타내었는데(Kandiah and Bryan, 1990) 이와 같은 결과는 노각나무에서도 유사하였다. Sucrose이외 삼투압조절제와 에너지원으로서 두릅나무의 경우에는 1/4 MS배지에 1.5% sucrose와 0.5%, 1% inositol을 각각 혼합처리한 배양액에서 가장 양호한 체세포배 발생을 보고하여 노각나무에서도 inositol의 혼용처리 효과는 검토해 볼 필요가 있다고 생각된다(Jhang et al., 1994). 그밖에도 ABA처리, 배지내 proline첨가, 저온처리 활성탄 첨가는 체세포배의 발아와 식물체로 발달에 효과를 나타내고 있으며 기내배 발생에서 GA처리 및 저온처리는 작약의 화분에서 유래된 배에서 자엽출현시기에 0.3 mg/L GA가 첨가된 배지에 배양하여 4°C에서 8주동안 저온처리함으로써 33.3%에서 73.3%까지 배발아율이 향상되었으며 식물체 생육도 양호하였다. 뿐만 아니라 포도의 약배양에서 형성된 배는 4에서 2주간 저온처리와 GA, cytokinin조합에 의해서 1%에서 20-30%까지 배발아율이 향상되어 기내배의 저온 및 GA처리 효과를 인정하게 하였다. 따라서 본 실험에서 채취한 미숙종자는 25 ± 2°C에서 계속적으로 배양되었으므로 미숙종자로부터 얻어진 체세포배에 일정기간의 저온과 GA처리에 의해서 체세포배의 발아율을 높일수 있으리라고 추정된다.

적 요

노각나무의 미숙배를 절편체로 사용하여 배양한 결과, 0.5 mg/L NAA 단독처리와 1.0 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L BA 혼용처리구에서 배발생캘러스 및 체세포배를 관찰할 수 있었으며 특히 0.5 mg/L NAA처리가 체세포배 발생을 더욱 촉진하였고 얻어진 배발생캘러스를 MS 기본배지에 계대배양하여 배양 2주후 정상적인 식물체를 관찰할 수 있었다. Sucrose 농도에 따른 배발생캘러스로부터 체세포배 발생율은 6% sucrose 처리구에서 가장 높았고 9% sucrose 첨가는 체세포배 발생을 오히려 억제하였고 백색체 발생을 증가시켰다. 식물체 재분화를 위하여 MS, 1/2MS와 1/2MS에 0.1% charcoal를 첨가한 배지에서 배양하였던 바, 3, 6% sucrose 처리구 모두 MS, 1/2MS 기본배지에서는 자엽의 발달은 억제되었고 뿌리 발달만 왕성하였으나 1/2MS에 0.1% charcoal 처리구에서는 정상적인 줄기와 뿌리를 가진 식물체를 얻을 수 있었다.

인 용 문 헌

- Dirr MA, Heuser CW (1987) The reference manual of woody plant propagation. Varsity Press Inc., Georgia. p 293
- Jhang HH, Park CH, Lee YS, Shin YB (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of *Aralia elata* S. Korean J Plant Tissue Culture 21: 167-171
- Kim YH, Chang TY, Choi WY (1987) Effect of sucrose and ABA on somatic embryogenesis in celery (*Apium graveolens* L.) Korean J Plant Tissue Culture 14: 123-130
- Kim CM, Song HC (1981) A study of distribution and communities *Stewartia koreana* (1) Temple Huibang and Mt. Sogri. Res Rep Agri Sci Tech Cunnam Univ Korea 8: 11-17
- Kandiah A, Bryan DM (1990) Manipulating the desiccation tolerance and vigor of dry somatic embryos of *Medicago sativa* L. with sucrose, heat shock and abscisic acid. Plant Cell Reports 9: 451-455
- Lim HT, Yeoung YR, Song YN, Han KP, Kim JH (1994) Influence of growth regulators and potassium humate on in vitro multiplication of Apple rootstock M.26. Korean J Plant Tissue Culture 21: 131-136
- Park HB, Choi EG (1992) Plant regeneration and somatic embryogenesis from immature embryo of Japanese Apricot (*Prunus mume* Sieb et Zucc). Korean J Plant Tissue Culture 19: 261-266
- Shim KK, Seo BK, Cho, NH, Kim KH, Shim SC (1993) Study on the Korea native *Stewartia* (*Stewartia koreana*). II. Seed germination and soft wood cutting of Korean native *Stewartia* (*Stewartia koreana*). J Kor Soc Hort Sci 34: 160-166
- Shim KK, Seo BK, Lee KW, Cho, NH, Shim SC (1992) Study on the Korean native *Stewartia* (*Stewartia koreana*) 1. Study on the native distribution of *Stewartia koreana* in Mt. Sobaek. J Kor Soc Hort Sci 33: 413-424
- Soh. WY, Yeo UD, So SS, Cho DY (1994) Protein synthesis during somatic embryo development and artificial seed germination of *Apium graveolens* L. after abscisic acid or cold treatment. Korean J Plant Tissue Culture 21: 15-22
- Sohn JK, Kim KS, Kim KM (1994) Development of pollen-derived embryos and polidy level of their regenerated plants in *Paeonia lactiflora* Pall. Korean J Plant Tissue Culture 21: 215-219
- Vilaplama-Marshall M, Mullins MG (1986) Establishment of grapevines from somatic embryos. HortScience 21: 182

(1995년 1월 25일 접수)