

4배체 현사시나무 (*Populus alba* L. X *P. glandulosa* Uyeki)의 약배양에 의한 식물체 재분화

손성호* · 김정희¹ · 문흥규 · 노은운 · 이윤희 · 김미희 · 박진선 · 이용욱 · 윤 양 · 이석구
임목육종연구소 생물공학과, ¹Michigan Technological University, USA

Plant Regeneration by Anther Culture of Tetraploid *Populus alba* L. X *P. glandulosa* Uyeki

Sung Ho SON*, Jung-Hee KIM¹, Heung Kyu MOON, Eun Woon NOH, Yun Hee LEE, Mee Hee KIM,
Jin Seon PARK, Yong Wook LEE, Yang YOUN, and Suk Koo LEE

Division of Biotechnology, Forest Genetics Research Institute, Forestry Administration, Suwon, 441-350; and
¹School of Forestry, Michigan Technological University, 1400 Townsend Drive, Houghton, MI 49931-1295, USA.

*Corresponding author.

Diploid plants were obtained by anther culture of tetraploid poplar (*Populus alba* L. X *P. glandulosa* Uyeki). The effect of 2,4-D on callus formation from anther culture was greater than any other auxins tested. The highest average number of multiple shoots per callus was obtained when zeatin was used at levels of 6-8 μ M. Regenerated shoots were excised and transferred to MS basal medium. Rooted plantlets were subsequently transferred to pots containing artificial soil mix. Finally 100 plants were transplanted in nursery located in Forest Genetics Research Institute. For the 300 anther-clones growing in greenhouse for 6 months after transplanting, 33% were slow-growing, 47% were rapid-growing, and 20% had huge leaf size with rapid-growing characteristics. Chromosome study showed a narrow range of variation from diploid to tetraploid. DNA polymorphism studies using various RAPD markers revealed some extend of differences among the anther-clones in their band pattern.

Key words: anther-clones, hybrid poplar, morphological and/or genetic variation, tree breeding program

임목육종연구소에서 십수년간 계속된 포플러육종 계획 중 대표적인 잡종 포플러의 하나로서 현사시 나무(*Populus alba* L. X *P. glandulosa* Uyeki)를 들 수 있다. 이 수종은 은 백양(*Populus alba*)을 모수로, 수원사시나무(*Populus glandulosa*)를 화분수로 한 교잡종으로, 우리나라 전 지역에 이미 식재된 바 있다(Noh and Kim, 1980). 특히 biomass 생산면에 있어서 현사시 잡종 1세대를 헥타당 40,000그루의 밀도로 식재하여 3년간 포지에서 성장시켰을 경우 1헥타당 약 18.80톤의 건물질 생산이 가능하며(Lee and Hyun, 1980), 포플러의 biomass를 이용한 고체 및 액체연료의 생산법이 개발됨에 따라 에너지 수종으로 인식되기도 하였다. 또한 산지용 속성 포플러로서 더욱 개량된 개체 육종을 위하여 양친수의 집단을 확대하여 새로운 개체간의 교잡을 실시한

후 이들 F1에 대한 지역시험중에 있으며, 우량개체에 대한 조직배양법을 이미 보고한 바 있다(Kim et al., 1981). 이 수종을 육종의 재료로 사용하기 위하여 콜키친처리에 의한 4배체 현사시나무를 만들어 임목육종연구소내에 식재한 바 있으나 이들은 2배체 현사시 나무에 비하여 성장특성이 아주 불량할 뿐만 아니라 병충해에도 약한 것으로 나타났다.

본 연구는 이들 4배체 포플러의 약배양에 의하여 2배체 식물을 유도하였을 경우 교잡에 의한 2배체와 어떠한 차이가 있는지를 알아보기 위한 기초 연구로서 주로 식물체의 재분화와 토양에 이식한 후 초기의 형태적인 특성에 관하여 조사하였다.

재료 및 방법

공시재료는 임목육종연구소 포지에 있는 현사시나무 4배체 식재군의 첫번째 개체를 대상으로 하였으며, 이들로부터 꽃눈을 수집하여 배양 재료로 이용하였다. 이때 꽃눈 및 약(anther)의 크기는 각각 10-20 mm, 0.2-1 mm 정도였다. 시료의 소독은 70% 에탄올로 약 30초간, 0.2% 차아염소산용액으로 약 10분간 실시하였으며, 적출된 약은 4가지 auxin (2,4-D, NAA, IAA, IBA)을 11가지 농도(0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 μM)로 처리한 배지에 10개의 약을 10반복으로 치상하였다. 이때 플라스틱 Petri dish (12 × 15 cm)를 사용하였으며, 배양배지로는 1/2MS 배지를 사용하였다. 배양체는 20°C로 조절된 항온실에서 암상태로 유지시켰으며, 유도된 캘러스는 2,4-D가 4.5 μM 함유된 동일배지에서 4주 간격으로 3회 계대배양하였다. 증식된 캘러스로부터 식물체 재분화를 유도하기 위해서 MS 배지에 cytokinin (BA, 2iP, kinetin, zeatin)을 농도별로(2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 μM) 처리하였으며, 이때에는 하루에 16시간의 명상태를 유지시켜 주었다. 기내에서 분화된 식물체는 MS 기본배지에서 발근을 유도하였으며, 기내에서 4주 간격으로 2회 계대배양한 후, 이들 식물체는 습도를 조절할 수 있는 배양상에 peat plug system을 이용하여 약 4주간 순화시킨 다음 포트에 이식하였다. 포트묘는 지속적인 생장을 위하여 유리온실로 옮겼으며 이식한 후 한달동안은 지하수를 공급하다가 그 이후부터는 1주에 한번씩 시비(20-10-20)를 하였다.

염색체의 수는 오전 10시경 포트묘의 뿌리 정단부위를 잘라서 아세토키아민에 염색한 후 검경하였으며(Son et al., 1993), 형태적인 특성은 6개월간 포트에 생장시킨 묘목을 대상으로 관찰하였으며, 생육정도는 삼목묘의 성장 index를 참고하여 비교하였다.

유전적인 변이성을 검정하기 위해서 RAPD(random amplified polymorphic DNA) marker를 이용하여 이를 PCR(polymerase chain reaction)로 증폭시킨 후 밴드의 형태적인 차이를 관찰하였다. PCR을 위해서 genomic DNA를 sample당 10 μg 정도 넣어주었으며, 반응액은 sample 당 총 volume이 30 μl 가 되게 하였다. 이때 annealing 온도는 37°C로 하였으며, 증폭회수는 40회로 하였다. 전기영동은 1.5% agarose gel(Sigma)을 사용하였으며, 완충액으로는 TBE를 사용하였으며 80 volts로 전개한 다음 ethidium bromide로 염색한 후 관찰하였다. Molecular size marker로는 pGEM DNA marker를 이용하였다.

결과 및 고찰

본 실험에 사용된 4배체 현사시나무의 꽃눈은 2년에서 3년마다 한 번씩 형성되었으며, 여러 개체로부터 약배양을

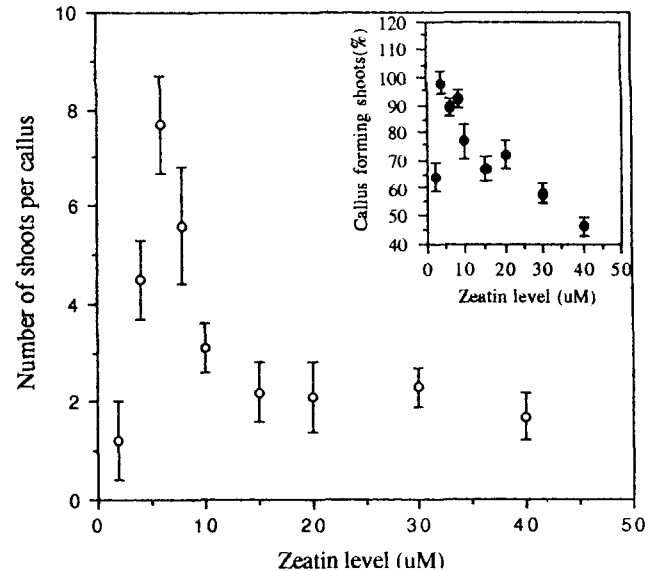


Figure 1. Effect of zeatin concentration on multiple shoot induction from anther derived callus of tetraploid poplar (*Populus alba* L. X *P. glandulosa* Uyeki). Each point represents the mean of 15 replications. Vertical bars denote standard deviation.

실시할 경우 식물체 재분화를 유도한 다음 변이성 검정시 개체간의 변이성을 제외시키기가 어려워 한나무를 공시목으로 정하였으므로, 수집 가능한 약의 수가 적어서 소포자의 발육단계가 캘러스 형성에 미치는 영향을 조사한다는 것은 별 의미가 없는 것으로 사료되었기 때문에 수집된 꽃눈을 모두 모아서 캘러스 유도를 위한 시료로 사용하였다. 배양배지에 첨가한 식물생장조절물질 중에서 2,4-D 4.5 μM 이 적당한 것으로 나타났으나, 총배양된 약의 수가 4,000개로서 이로부터 캘러스가 얻어진 것은 약 100개 정도에 지나지 않았기 때문에 약배양에 의한 캘러스 유기에 적절한 auxin의 형태나 농도를 구명하기가 어려웠다.

얻어진 캘러스로부터 식물체 재분화에 영향을 미치는 식물생장조절물질의 효과를 조사하기 위하여 4가지 형태의 cytokinin을 사용한 결과 zeatin의 경우 배지내 6 μM 을 첨가하였을 때 캘러스 당 7.7개의 기내줄기를 형성하였다(그림 1). 분화된 줄기로부터의 뿌리유도는 식물생장조절물질이 함유되지 않은 1/2MS에서 거의 100% 얻을 수 있었으나 그 중에 약 8%는 줄기가 유리질화되는 것을 관찰할 수 있었다. 기내에서 정상적인 생장을 보이는 줄기는 뿌리를 제거한 후 동일 배지에 4-6주 동안 계대배양 함으로써 새로운 굵은 뿌리를 유도할 수 있었으며 이를 peat plug로 옮겨 포트묘로 육성하였다.

포트에 이식된 묘목은 형태적으로 아주 큰 차이를 보였으며, 생장면에서는 약 1/3이 2배체 현사시 삼목묘에 비하여 다소 떨어졌으나 나머지는 아주 빠른 성장상태를 보여주었다. 특히 동일연령의 삼목묘에 비하여 직경이 5배 이상 되는 거대한 잎을 가진 묘목이 약 20% 정도 생산되었으나(그

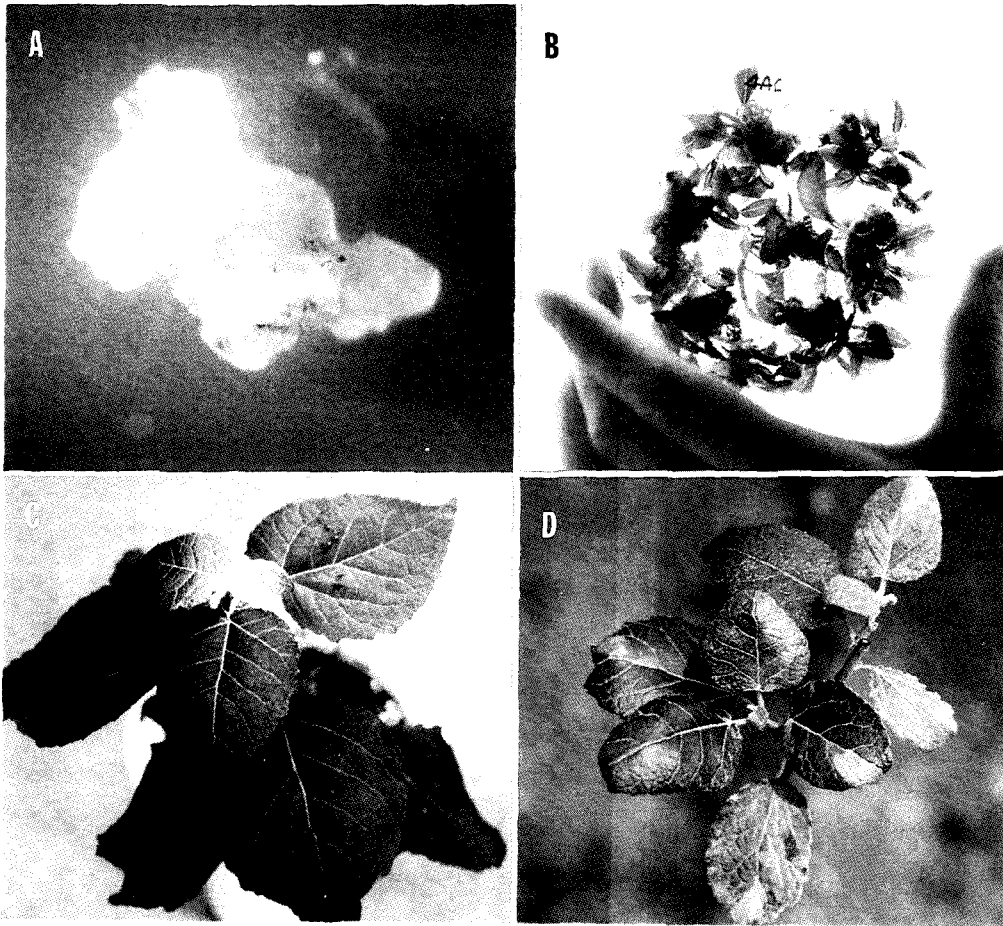


Figure 2. Plant regeneration by anther culture of tetraploid poplar (*Populus alba* L. X *P. glandulosa* Uyeki). A: Callus induced by anther culture; B: Shoot regeneration from the callus; C: Regenerant with broad leaves; D: Variant in leaf color and morphology.

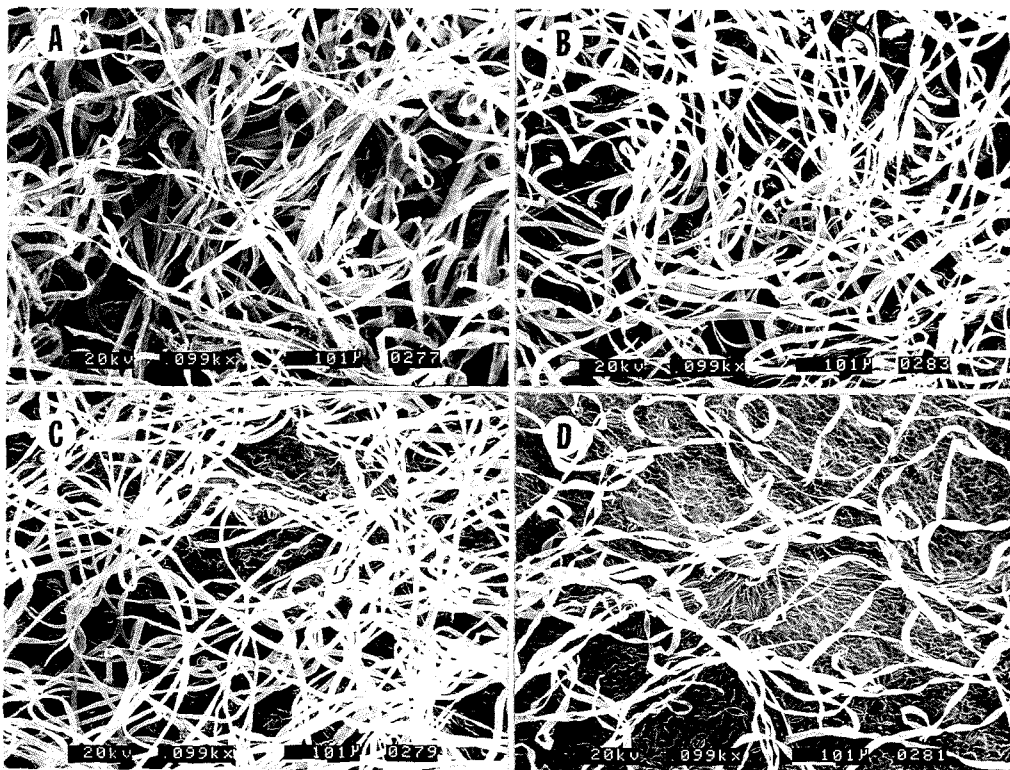


Figure 3. Variance in white hairs intensity on the underside leaves of anther derived plants. A: Intensive in white hairs similar to *Populus alba*; B-C: Moderately intensive in white hairs similar to *Populus alba* x *P. glandulosa*; D: Rare in white hairs in their intensity.

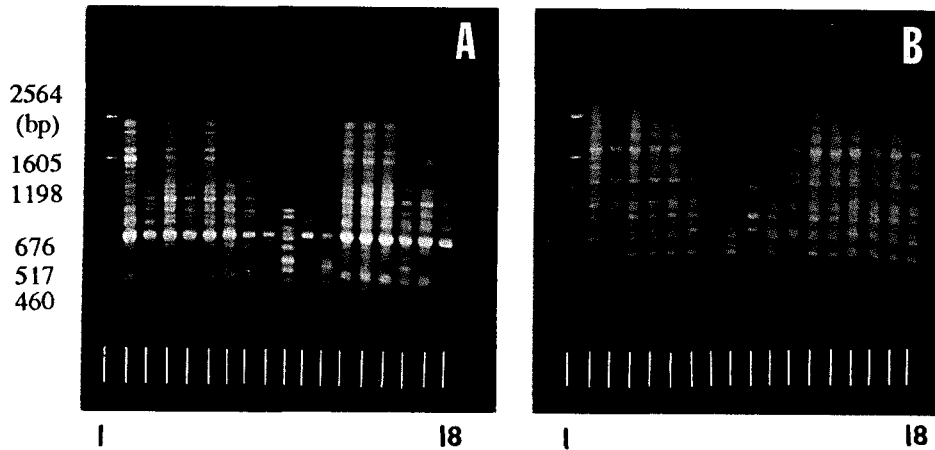


Figure 4. DNA polymorphisms detected by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers (A) PI-1, (B) PI-2. Lane 1: pGEM DNA marker; Lane 2: Diploid hybrid; Lane 3: Tetraploid, Lanes 4-18: Anther derived plants.

림 2-C), 정아를 포함한 몇 개의 잎만 남겨두고 나머지 잎을 제거한 다음 포지로 이식하여 1년간량 생장시킨 결과 대부분이 2배체 삼목묘와 비교하였을 때 정상적인 크기의 잎으로 돌아오는 것을 관찰 할 수 있었다. 이러한 원인은 유전적인 변이라고 보기보다는 조직배양묘가 외부 환경에 순화하는 과정에서 초기에 형성된 잎들만 지속적으로 비대생장을 하였을 것으로 추정된다.

포플러류에 있어서는 염색체 검경이 아주 어렵기 때문에 대상 묘목 전체에 대한 염색체 검경은 하지 않았으나 대체로 2배성 혹은 4배성을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 동일 개체에서 채집된 뿌리 정단세포에 있어서도 서로 다른 염색체 수를 관찰할 수 있었는데 이는 4배체 현사시나무의 약배양에 의하여 얻어진 묘목에 있어서 체세포 분열이 일정한 양식에 따르지 못하거나 불안정한 상태에 있는 것으로 생각된다. 이들 중 한 개체는 잎이 노란색과 푸른색의 키메라 형태로 나타났는데(그림 2-D), 이 묘목에 있어서도 비료(20-10-20)를 지속적으로 주었다는 점과 이러한 현상이 위쪽이나 아래쪽에서부터 형성되지 않고 모든 잎에서 동시에 나타나는 것으로 보아 transposal element에 의한 것이 아닌가 생각된다. 잎의 형태에 있어서도 모수인 은백양과 비슷하며 잎 뒷면 잔털의 밀도가 아주 높은 것에서부터 화분수인 수원사시와 비슷하거나 잎 뒷면에는 엉성하지만 여전히 잔털을 보이는 여러 가지 변이체가 나타났다(그림 3). 이러한 차이점을 모두 고려해 볼 경우 생산된 묘목에 있어서 어느 하나 완전히 같다고 볼 수 없을 정도로 변이가 심하게 일어났다.

형태적으로 차이가 특히 심하다고 여겨지는 개체들을 16개 그룹으로 나눈 다음 각각의 그룹으로부터 임의로 한 개체씩 선발하여 이들에 대한 유전적인 변이성을 검정해 보았다. 손쉬운 방법으로 DNA polymorphism을 보기 위하여 각각의 개체로부터 DNA를 추출한 후 여러 가지 RAPD marker를 이용하여 이를 PCR로 증폭시킨 다음 개체간 밴드 형태의 차이점을 관찰한 결과 본실험에 이용된 대부분의 primer에 대

해 2배체 삼목묘나 4배체 모수 및 약배양묘 간에는 차이를 나타내지 않았으나 PI-1(5'-TCCGCAGCTTGCATGTTT-3')과 PI-2(5'-TCACTAGTTGCAGTAG-3') primer의 경우 약배양 유래의 개체 중 일부가 2배체 삼목묘나 4배체 모수에 비해 다소 차이나는 밴드 형태를 나타내었다(그림4). 이 결과는 여러 가지 다른 primer를 디자인하여 사용함으로써 변이성에 대한 차이를 좀더 명확히 나타낼 수 있다는 점에 있어서는 고무적이지만 지금까지의 결과로는 형태적인 차이와 유전적인 차이를 결부하여 설명할 수는 없을 것 같다. 현사시 4배체 약배양에 의하여 얻어진 개체들이 형태적인 면뿐만 아니라 유전적으로도 어느 정도 차이가 있을 것으로 추정되어 이들 중 100개체를 임목육종연구소내 포지에 이식하였다. 특히 기내, 온실 및 포지의 환경이나 혹은 생장이 진행됨에 따라 변이성이 다르게 나타남으로 폭넓은 유전검정 및 지속적인 관찰에 의하여 유용한 품종의 육종이 가능할 것으로 여겨지며, 이들 변이체를 시료로 하여 세포배양에 의한 식물체 유도를 할 경우 기존에 나타난 변이의 폭을 더욱 넓힐 수 있을 것으로 생각됨으로 이들은 차세대 교잡육종을 위한 재료로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

현사시나무 4배체의 약배양에 의하여 2배체 식물을 얻을 수 있었다. 약배양에 의한 캘러스 유도에는 2,4-D가 효과적인 것으로 나타났다. 증식된 캘러스로부터 식물체 재분화를 위해서는 16시간의 광조건하에 6-8 μM의 zeatin 처리가 가장 좋은 반응을 보였는데 이때 얻어진 줄기수는 평균 7.7개였다. 재분화된 식물체는 MS 기본배지에서 쉽게 뿌리를 유기기킬 수 있었으며, 이들 식물체는 포트묘로 육성하여 온실 및 포지로 이식하였다. 약배양유래의 300 클론에 대한 생육상태를 조사한 결과 삼목묘에 비하여 33%는 생장이 저해됨을, 47%는 생장이 더 좋은 것으로 나타났으며, 그중

20%는 삼목묘에 비해 직경이 5배 이상되는 거대 엽(葉)을 가지고 있었다. 염색체 수는 대체로 2배체성 혹은 4배성을 띠고 있었으며, RAPD marker를 이용하여 DNA polymorphism을 본 결과 약배양 유래의 몇몇 식물체에 있어서 밴드 형태적인 차이를 나타내는 개체를 발견할 수 있었다.

인 용 문 헌

Kim JH, Lee SK, Chun YW (1981) Mass propagation of tree species

through in vitro culture. I. Bud culture of *Populus alba* X *P. glandulosa* F1. Res Rep For Gen Res Inst Korea 17: 57-63

Lee DK, Hyun SK (1980) Woody biomass products as an energy source. Res Rep For Gen Res Inst Korea 16: 78-86

Noh ER, Kim YW (1980) Inter- and intra-specific hybridization in poplar in Korea. Res Rep For Gen Res Inst Korea 16: 3-19

Son SH, Moon HK, Hall RB (1993) Somaclonal variation in plant regenerated from callus culture of hybrid aspen (*Populus alba* L. X *P. grandidentata* Michx.). Plant Sci 90: 89-94

(1995년 3월 20일 접수)